



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ACTIVIDAD ANTIPLAQUETARIA
DE DERIVADOS DE HIDROQUINONAS CONJUGADAS CON FOSFONIO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNA: GABRIELA AVILÉS BUSTAMANTE
PROFESOR GUÍA: TM. DR. EDUARDO FUENTES QUINTEROS

TALCA-CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto FONDECYT N°1180427, cuyo investigador principal es el TM. Dr. Eduardo Fuentes.

Al Dr. Ramiro Araya-Maturana del Instituto de Química de Recursos Naturales de la Universidad de Talca, por facilitar los derivados de hidroquinonas.

A Diego Méndez Gutiérrez, por su dedicación y paciencia durante el trabajo experimental.

INDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO	9
3.1 Enfermedades cardiovasculares	9
3.2 Hemostasia	10
3.3 Estructura y fisiología plaquetaria	11
3.4 Agregación plaquetaria	14
3.5 Disfunción de la plaqueta	16
3.6 Respuesta pobre a la terapia antiplaquetaria	18
3.7 Hidroquinonas	19
3.8 Hidroquinonas conjugadas con fosfonio	20
4. HIPOTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
6.MATERIALES Y METODOS	23
6.1 toma de muestra	23
6.2 obtención de plaquetas lavadas	23
6.3 agregación plaquetaria	24
7. RESULTADOS	25
8. DISCUSION	31
9.CONCLUSION	36
10. BIBLIOGRAFIA	37

INDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 MECANISMO DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	14
Figura 2 OBTENCION DE ACILHIDROQUINONA	19
Figura 3: ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO	25
Figura 4: PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD LDH EN LOS COMPUESTO D4 C6 Y C11	26
Figura 5: PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA AGREGACION PLAQUETARIA DE COMPUESTOS CONTRA COLAGENO Y TRAP-6	30

INDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1 AGONISTAS MAS COMUNES QUE INDUCEN RESPUESTA PLAQUETARIA	15
Tabla 2 PORCENTAJE DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR COLÁGENO, EN CONTROLES	27
Tabla 3 PORCENTAJE DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR TRAP, EN CONTROLES	27
Tabla 4 PORCENTAJE DE AGREGACIÓN, AREA BAJO LA CURVA Y PENDIENTE PARA LOS COMPUESTOS D4 C6 Y C11 INDUCIDAS POR COLÁGENO	28
Tabla 5 PORCENTAJE DE AGREGACIÓN, AREA BAJO LA CURVA Y PENDIENTE PARA LOS COMPUESTOS D4 C6 Y C11 INDUCIDAS POR TRAP	29

1. RESUMEN

Las plaquetas son componentes altamente reactivos del sistema circulatorio, que ejercen no solo la actividad hemostática sino que también contribuyen a la modulación de diversas condiciones patológicas. Por lo tanto, la activación defectuosa de las plaquetas provoca un sangrado incontrolado y, a la inversa, la activación de estas causa trastornos trombóticos.

Las mitocondrias en las plaquetas regulan su función pro-trombótica no solo a través de la generación de energía, sino también de la señalización redox y el inicio de la apoptosis. Sin embargo, el exceso de generación de ROS en la disfunción mitocondrial plaquetaria actúa como mediador de la activación plaquetaria y como un mecanismo clave responsable de una respuesta deficiente a los fármacos antiplaquetarios. Por lo tanto, la inhibición de la disfunción mitocondrial plaquetaria podría utilizarse potencialmente como una nueva estrategia para el desarrollo de fármacos con actividad antiplaquetaria.

Se ha demostrado que los derivados de hidroquinona protegen las mitocondrias del daño oxidativo, pero solo una pequeña proporción del compuesto administrado externamente es absorbida por las mitocondrias.

En esta tesis se quiere demostrar que los derivados de hidroquinonas conjugadas con fosfonio; D4 C6 y C11 dirigidas a las mitocondrias tienen actividad antiplaquetaria a través de la inhibición de la agregación plaquetaria.

2. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas que se originan del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, siendo su concentración sanguínea entre 150 y 400 mil por μL . Si bien en extendidos de sangre periférica se observan como fragmentos citoplasmáticos de 2 a 3 μm de diámetro, son células complejas, activas desde el punto de vista metabólico que interactúan con su ambiente y desencadenan la hemostasia.

En los últimos años se ha postulado que las plaquetas podrían utilizarse como biomarcadores de un gran número de patologías sistémicas no relacionadas con la hemostasia, tales como enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, entre otras enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial.

Para permitir niveles óptimos de funcionalidad, las plaquetas dedican más del 50% de su función mitocondrial a la síntesis de ATP. Las mitocondrias son orgánulos intracelulares que alojan en su membrana interna o cresta cinco complejos de fosforilación oxidativa, estas son responsables de mantener la homeostasis celular y producir energía celular (ATP) a través de la fosforilación oxidativa.

La activación defectuosa de las plaquetas provoca un sangrado incontrolado y, a la inversa, la activación de las plaquetas causa trastornos trombóticos.

La evidencia acumulada demuestra que las mitocondrias en las plaquetas regulan su función pro-trombótica no solo a través de la generación de energía, sino también de la señalización redox y el inicio de la apoptosis.

En este contexto, la inhibición de los complejos I o V en la mitocondria plaquetaria inicia la apoptosis en estas células al aumentar la cantidad de producción de las especies reactivas de oxígeno mitocondrial (ROS) y aumenta el riesgo de sangrado no quirúrgico. El daño de las mitocondrias plaquetarias también puede exacerbar la peroxidación de los lípidos.

La terapia antiplaquetaria representa el pilar del tratamiento para la prevención de la activación plaquetaria, aunque muchos pacientes tratados con estos fármacos continúan sufriendo eventos recurrentes de activación plaquetaria. Sin embargo se ha estudiado que la inhibición de la disfunción mitocondrial plaquetaria podría utilizarse potencialmente como una nueva estrategia para el desarrollo de fármacos con actividad antiplaquetaria. Dentro de esto encontramos las quinonas que son una gran clase de compuestos que se derivan de compuestos aromáticos, la síntesis de compuestos con nuevos mecanismos de acción antiplaquetaria es un objetivo de gran interés en el desarrollo de fármacos, sobre esta base, se ha descrito que algunos derivados de hidroquinona presentan un gran efecto antiplaquetario.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de mortalidad en todo el mundo (1,2), dentro de esta categoría se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV) (3) en donde casi el 30% de todas las muertes en todo el mundo se le atribuyen como causa, además se acompaña de un impacto económico perjudicial significativo en las economías nacionales y dentro del hogar (4).

Las ECV son las enfermedades del corazón, enfermedades vasculares del cerebro y las enfermedades de los vasos sanguíneos, en donde entre los factores de riesgo se presentan, entre otras, el consumo de tabaco, sedentarismo, hipertensión, sobrepeso y obesidad (5) y también enfermedad renal (6).

Las ECV son la primera causa de muerte en Chile (7), en donde las tasas de infarto agudo al miocardio y enfermedad cerebrovascular son de 94,9 y 93,5 por cada 100.000 habitantes respectivamente (8).

Varios factores de riesgos de ECV como, por ejemplo, la obesidad y la hipertensión son influenciados directamente con la alimentación (9) pero bien, con una buena alimentación se

pueden generar efectos favorables contra las ECV, en donde las frutas y hortalizas cumplen un importante rol hemostático al describirse que poseen un efecto antitrombótico (10).

3.2 Hemostasia

El sistema hemostático es el responsable de mantener el equilibrio frente a una injuria y también en el proceso de generación de un trombo, el cuál este último está implicado en la mayoría de las ECV. Este sistema es una compleja interacción entre la vasculatura, componentes celulares y proteínas plasmáticas que interactúan para mantener la hemostasia en el cuerpo sano (11). La hemostasia es un proceso complejo que permite prevenir, de forma continua la pérdida espontánea de sangre y detener la hemorragia causada por daños al sistema vascular, implica la hemostasia primaria, la hemostasia secundaria y la fibrinólisis (12).

La hemostasia primaria se refiere a las primeras etapas de la hemostasia cuando la coagulación aún no se ha desarrollado para desempeñar su papel en la prevención de la pérdida de sangre (13). Aquí la participación de las plaquetas es fundamental, las cuales son células anucleadas que circulan en la sangre como centinelas de la integridad vascular (14), normalmente existen de 150.000 a 400.000 plaquetas por microlitro de sangre en adultos sanos, son producidas por los megacariocitos en la médula ósea (15). Las etapas de la hemostasia primaria son la vasoconstricción local y la fase endotelial-trombótica (12), En los sitios de la lesión, después de la vasoconstricción local se generan agonistas químicos generados localmente con los cuales las plaquetas pueden activarse, se adhieren al endotelio y luego se agregan entre ellas (16).

La hemostasia secundaria se refiere al sistema de coagulación en el cual participan una serie de proteínas plasmáticas denominados factores de la coagulación, estas una vez activadas formarán la fibrina que es la que mantiene firme el tapón plaquetario (17), en donde esta última proviene de una molécula llamada fibrinógeno, el cuál es una proteína trinodular presente en altas concentraciones en el plasma (2-4 mg/mL) (18).

Los factores de la coagulación son zimógenos exceptuando al anteriormente descrito fibrinógeno, que son convertidos a proteasas por activación por contacto (vía intrínseca) o por estimulación del factor tisular (ruta extrínseca) que actúan en forma de cascada para promover la formación del trombo de fibrina (19).

Para disolver el trombo se aplica el sistema fibrinolítico (20), el cual está compuesto de moléculas como el plasminógeno, activadores del plasminógeno, plasmina, inhibidores de los activadores del plasminógeno y la antiplasmina (21).

3.3 Estructura y fisiología plaquetaria

Las plaquetas son células enucleadas de 1–2 μm de tamaño, generadas en la médula ósea por fragmentación de los bordes de los megacariocitos, que se acumulan en el lugar donde el endotelio está disfuncional o dañado dentro de la pared arterial, lo que inicia la formación

del trombo (22). Un adulto sano produce cada día una media de alrededor de 1×10^{11} plaquetas. La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días.

Las plaquetas contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos: los gránulos densos, los gránulos α y los lisosomas. La liberación de los gránulos densos en las plaquetas ocurre por exocitosis, y desde ellos se liberan difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros.

La adhesión plaquetaria se lleva a cabo cuando al presentarse una injuria se exponen en el espacio subendotelial del vaso sanguíneo factores de adhesión como el factor von Willebrand, colágeno, fibronectina, laminina, entre otros que se unirán a la plaqueta a través de sus receptores presentes en su membrana, de manera que el receptor GPIIb se une al complejo formado entre el FvW/colágeno y el receptor GPVI se une al colágeno expresado en la lesión vascular (23).

La activación plaquetaria se efectúa cuando un efector agonista se une a la superficie plaquetaria desencadenando reacciones bioquímicas en cascadas de señalización intracelular a través de segundos mensajeros. Tras la activación, la *fosfolipasa C* (PLC) actúa sobre el *fosfatidil inositol 4,5 difosfato* generando *1,2 diacilglicerol* (DAG) e *inositol 1,4,5 trifosfato* (IP3). El DAG activa a la *proteína quinasa* (PKC) y el IP3 se une a receptores específicos en el sistema tubular denso y libera al citosol calcio (24). El calcio actúa como mensajero promoviendo señales que inician una serie de procesos en los cuales se destacan: Cambio de

forma en la cual la plaqueta activada sufre un cambio morfológico donde se originan pseudópodos los que facilitan la interacción con otras plaquetas, la agregación plaquetaria en donde el responsable es el complejo GP IIb/IIIa que fija al fibrinógeno que se encuentra en el plasma formando puentes que unión entre las plaquetas, la contracción del citoesqueleto y la secreción en donde los filamentos centran los gránulos citoplasmáticos y los liberan al exterior (25).

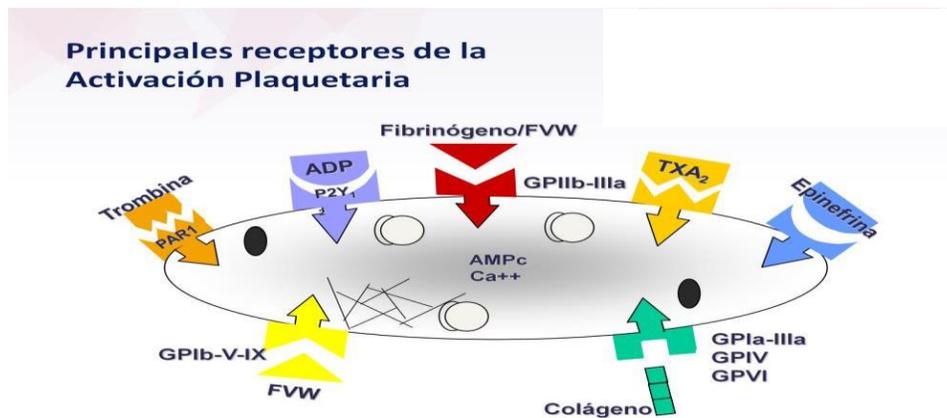


Figura 1: MECANISMO DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.

Después de activarse, las plaquetas sufren importantes cambios morfológicos, con la producción de pseudópodos, volviéndose además muy adhesivas. La respuesta funcional de las plaquetas implica cuatro procesos, adhesión, agregación, secreción y actividad procoagulante. Extraído de Gómez y cols(26).

3.4 Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria consiste en la unión de las plaquetas entre sí para la formación de un trombo. Para esta agregación se necesitan agonistas que gatillen el proceso, generalmente los realizan por la vía de la PLC.

Los más estudiados y por ende los que tienen mayor importancia fisiológica son la trombina, ADP, adrenalina, colágeno y ácido araquidónico (27). El ADP es un importante activador de la agregación plaquetaria, induce la agregación de estas al activar al receptor específico P2Y₁₂ situado en la superficie externa de la membrana de la plaqueta, sus efectos en tanto son aumentar la concentración intracelular de calcio y la expresión del receptor de fibrinógeno en la superficie de la plaqueta GPIIb/IIIa. (28).

El colágeno es un potente agonista en altas concentraciones, en las cuales participan 2 receptores plaquetarios, uno de ellos es el receptor GPIa/IIa que participa en la adhesión plaquetaria mientras que el otro es el GPVI los cuales poseen actividad sinérgica (29). La trombina activa la agregación plaquetaria a través de los receptores PAR1 y PAR4 (27).

Tabla 1: AGONISTAS MAS COMUNES QUE INDUCEN RESPUESTA PLAQUETARIA

Activador	Receptor	Efecto
ADP	P2Y₁, P2Y₁₂	Cambio de forma, agregación, expression of P-selectin, liberación de TXA ₂ , reclutamiento de plaquetas en la lesión
TX A₂	TPα, TPβ	Redutamiento y agregación
Serotonina	5HT-2A	Redutamiento
Epinefrina	α_{2a}	Suplementario del receptor de ADP
Colágeno	GPIa/IIa, GPVI	Activación de GPIIb/IIIa, liberación de ADP y TXA ₂ , agregación y liberación de Ca ⁺⁺
Trombina	PAR-1, PAR-4	Agregación, liberación de ADP, TXA ₂ , serotonina y epinefrina, activación de P-selectina y CD40

3.5 Disfunción de la plaqueta

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares que alojan en su membrana interna o cresta cinco complejos de fosforilación oxidativa los cuales son complejo I NADH: ubiquinona oxidoreductasa, complejo II succinato oxidoreductasa, complejo III: citocromo c bc₁, complejo IV citocromo c oxidasa y complejo V adenosina trifosfato ATP (30). Las mitocondrias son responsables de mantener la homeostasis celular y producir energía celular (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (31). Las plaquetas derivan del citoplasma de los megacariocitos. Durante esta fase, los megacariocitos transfieren componentes a las plaquetas, incluidos los organelos citoplásmicos, como los gránulos y las mitocondrias (32).

La función principal de las plaquetas circulantes durante el proceso hemostático es detener la pérdida de sangre a través de la formación de coágulos después de un traumatismo tisular (33). Las plaquetas son componentes altamente reactivos del sistema circulatorio, que ejercen no solo la actividad hemostática sino que también contribuyen a la modulación de diversas condiciones patológicas (34). Por lo tanto, la activación defectuosa de las plaquetas provoca un sangrado incontrolado y, a la inversa, la activación de las plaquetas causa trastornos trombóticos (35,36).

Las plaquetas dedican más del 50% de su función mitocondrial a la síntesis de ATP, que es aproximadamente el doble de la cantidad utilizada por los monocitos o linfocitos (37). Mientras tanto, la reserva o la capacidad respiratoria de reserva que potencialmente pueden utilizar las plaquetas para responder al estrés oxidativo es solo aproximadamente el 20% de

La función mitocondrial máxima (38). La fosforilación oxidativa contribuye aproximadamente con el 80% de la producción total de ATP en las plaquetas en reposo, lo que sugiere una posible dependencia de las plaquetas en la función mitocondrial (39). La evidencia acumulada demuestra que las mitocondrias en las plaquetas regulan su función pro-trombótica no solo a través de la generación de energía, sino también de la señalización redox y el inicio de la apoptosis (40).

La disfunción mitocondrial plaquetaria es un jugador clave en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que potencialmente contribuye a la activación plaquetaria (41). Diferentes formas de ROS, incluido el anión superóxido, el radical hidroxilo o el peróxido de hidrógeno, actúan como segundo mensajero en la activación de las plaquetas (42). Además, la disfunción mitocondrial plaquetaria es un paso clave en el inicio de la apoptosis plaquetaria (43). En este contexto, la inhibición de los complejos I o V en la mitocondria plaquetaria inicia la apoptosis en estas células al aumentar la cantidad de producción de ROS mitocondrial y aumenta el riesgo de sangrado no quirúrgico (44)

La disfunción mitocondrial plaquetaria se ha relacionado con una variedad de enfermedades, como las ECV mencionadas anteriormente. Además, la disfunción mitocondrial plaquetaria se ha asociado con el deterioro oxidativo y la destrucción de las plaquetas durante el almacenamiento para transfusiones (45).

3.6 Respuesta pobre a la terapia antiplaquetaria

La activación de las plaquetas y la mantención de su hemostasia son conceptos fisiológicos muy estrechos, los cuales son responsables de varias de las enfermedades crónicas conocidas a nivel mundial. (43-45).

La terapia antiplaquetaria representa el pilar del tratamiento para la prevención de la activación plaquetaria (46). Dentro de estos tratamientos encontramos la aspirina y el clopidogrel, a pesar de conocer y estudiar sus propiedades se sabe que estos medicamentos siguen causando eventos recurrentes de activación plaquetaria (47). Incluso los ensayos clínicos de los últimos años han proporcionado evidencia de que la aspirina, al menos, no tiene un efecto beneficioso sobre la progresión de las enfermedades crónicas e induce la apoptosis plaquetaria a través de la activación de la caspasa-3 (48). La activación plaquetaria y esta pobre respuesta a los fármacos antiplaquetarios se han asociado con un aumento de los niveles de estrés oxidativo (49).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante (50). Mientras tanto, la disfunción mitocondrial es una fuente importante de ROS (51). Además se conoce que las plaquetas en reposo producen ROS pero de manera normal, es decir en concentraciones muy bajas (50,51). Sin embargo, el exceso de generación de ROS en la disfunción mitocondrial plaquetaria actúa como mediador de la activación plaquetaria y como un mecanismo clave responsable de una respuesta deficiente a los fármacos anti plaquetarios (52). Por lo tanto, la inhibición de la disfunción mitocondrial plaquetaria podría utilizarse potencialmente como una nueva estrategia para el desarrollo de fármacos con actividad antiplaquetaria (53).

3.7 Hidroquinonas

Las quinonas son una gran clase de compuestos que se derivan de compuestos aromáticos. Las quinonas se pueden convertir en p-hidroquinonas mediante varios mecanismos de uno y dos electrones, y por lo tanto, las p-hidroquinonas coexisten con las quinonas en los sistemas biológicos (54). Las p-hidroquinonas sustituidas se encuentran entre los antioxidantes para romper cadenas más potentes y son de especial interés con respecto a la química biomédica y alimentaria (55). La pronunciada actividad antioxidante de las p-hidroquinonas como

inhibidores de la peroxidación lipídica está determinada por su capacidad para terminar las reacciones de cadena radical debido a su reactividad con los radicales lipoperoxido (52-55). Mientras tanto, la capacidad de donación de enlaces H de hidroquinonas estructuralmente relacionadas es una propiedad biológicamente importante para convertir ROS (radicales oxilo y peroxilo) potencialmente dañinos en especies no tóxicas (56). Se ha demostrado que los derivados de hidroquinona protegen las mitocondrias del daño oxidativo, pero solo una pequeña proporción del compuesto administrado externamente es absorbida por las mitocondrias (56).

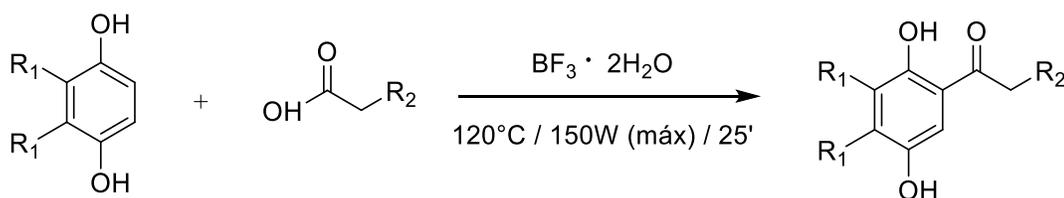


Figura 2: obtención de acilhidroquinonas.

Teniendo en cuenta la situación actual, el arsenal terapéutico de los medicamentos disponibles para controlar la activación de las plaquetas es todavía muy limitado (56). La síntesis de compuestos con nuevos mecanismos de acción antiplaquetaria es un objetivo de gran interés en el desarrollo de fármacos (57). Sobre esta base, se ha descrito que algunos derivados de hidroquinona tienen actividad antiplaquetaria. Los estudios de relación estructura-actividad muestran que el amplio diapasón de la actividad antiplaquetaria por los derivados de hidroquinona se debe a la naturaleza del sustituyente. Por lo tanto, la actividad antiplaquetaria está asociada con la presencia de sustituyentes o disulfuros de metoxi directamente unidos a un anillo de fenilo.

3.8 Hidroquinonas conjugadas con fosfonio

Las mitocondrias han tenido un gran interés como blanco biológico, ya que como sabemos, estos organulos semiautónomos cumplen roles vitales en el metabolismo celular y su disfunción contribuye a varias enfermedades, debido a esto existen estudios que hablan sobre la síntesis de acilhidroquinonas lipofílicas portadoras del catión trifenilfosfonio en el fragmento acílico, característica que permite una mayor incorporación a las mitocondrias.

Una importante vía para dirigir compuestos activos a la mitocondria es la unión de las hidroquinonas al catión lipofílico trifenilfosfonio, el cual se acumula en la membrana interna de ella. Estas muestran un amplio rango de propiedades biológicas tales como, la capacidad antioxidante, inhibición de células tumorales sin aumentar la producción de ROS, entre otras.

4. HIPOTESIS

4.1 Derivados de hidroquinonas conjugados con fosfonio; D4 C6 y C11 inhiben la agregación plaquetaria sin presentar actividad citotóxica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la actividad antiplaquetaria de los derivados de hidroquinonas conjugados con fofonio (D4, C6 y C11).

5.2 Objetivos específicos

- a)** Determinar las actividades citotóxica de los compuestos D4 C6 y C11 en plaquetas lavadas.

- b)** Evaluar la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y TRAP-6 de los compuestos D4 C6 y C11.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Toma de muestra

Se utilizaron voluntarios aparentemente sanos, sin consumo de alcohol ni cigarros el día anterior o las horas previas a la toma de muestra, sin que hubiesen ingerido medicamentos con efectos antiplaquetarios por lo menos diez días antes de la extracción de sangre. A estos individuos se les tomó una muestra sanguínea, previa lectura y firma del consentimiento informado.

Las muestras fueron colectadas en jeringa de 5 ml con anticoagulante ACD, en proporción sangre: ACD; 4:1 mediante el uso de aguja mariposa.

6.2 Obtención de plaquetas lavadas

Para la obtención del plasma rico en plaquetas (PRP) se centrifugó la sangre por 10 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se extrajo el PRP y se centrifugó en microcentrifuga por 8 minutos a 3000 rpm a 4°C. Se resuspendió el pellet de plaquetas en TAF sin calcio: ACD; 9:1. Se centrifugó en microcentrifuga por 8 minutos a 3000 rpm a 4°C. Se resuspendió el pellet de plaquetas en TAF sin calcio, manteniendo el hielo.

Al PRP obtenido se le realizó un recuento de plaquetas en el contador hematológico ajustando la concentración a 250.000-300.000 plaquetas/ μl aproximadamente con PPP.

6.3 Agregación plaquetaria

El método se basa en la monitorización y detección de cambios de transmisión de luz, de PRP ajustado, en una cubeta de reacción incubada a 37°C . Luego de la adición de un agonista, las plaquetas comienzan a agregarse y la transmisión de la luz aumenta progresivamente.

Para esta técnica se utilizó LUMI-AGREGÓMETRO Chrono-Log, Havertown, PA, USA. Este equipo debe ser calibrado con PPP. A la cubeta de reacción que contenía en su interior una barra magnética que permitía que el PRP se mantuviera en constante movimiento. Los 480 μL de plaquetas lavadas fueron preincubado por 5 minutos a 37°C junto con 10 μL de cloruro de calcio, 1 μL de cada compuesto (D4, C6 y C11), en el caso del blanco, éste contenía 400 μL de buffer tyrodes sin calcio, Al cabo de los 5 minutos, se adiciona el agonista, en este caso 1 μL de calcio.

7. RESULTADOS

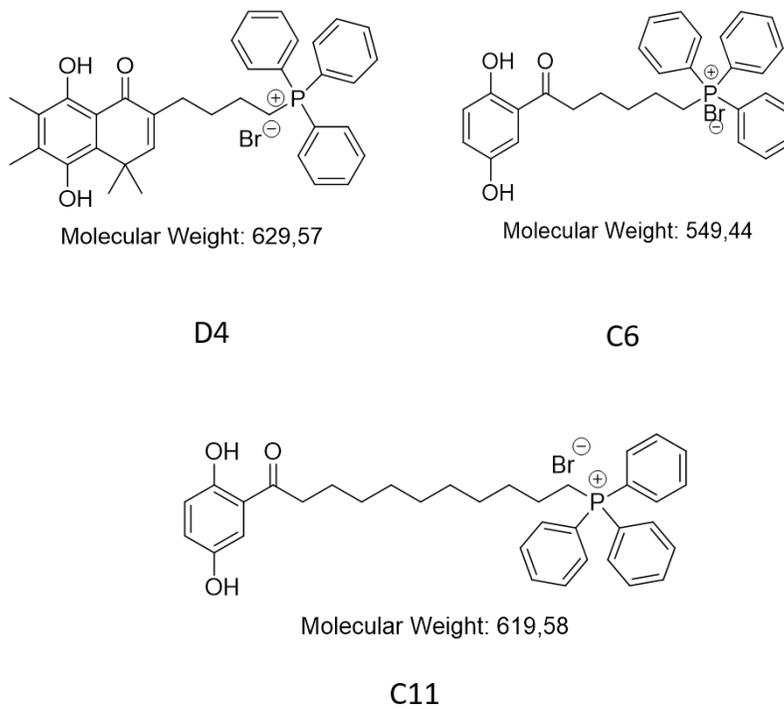


Figura 3: Estructura molecular de los compuestos utilizados en el estudio

El kit de ensayo de citotoxicidad de LDH medido entre 490-520 nm. Mide la muerte celular en respuesta a compuestos químicos. La cantidad de formazán producida es proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio de cultivo como resultado de la citotoxicidad.

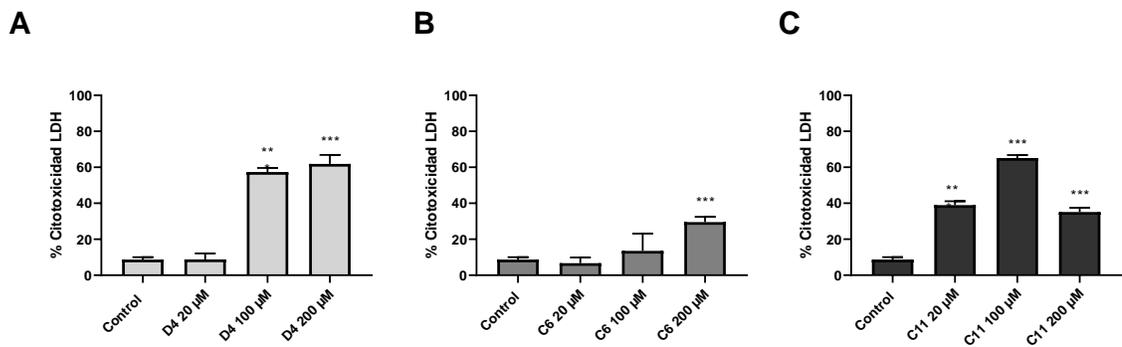


FIGURA 4: porcentaje de citotoxicidad LDH en los compuestos D4, C6 y C11.

Análisis resultados: Se evaluó la citotoxicidad por liberación de LDH en plaquetas lavadas. En la figura 4A se observan diferencias estadísticamente significativas para el compuesto D4 100 y 200 uM al comparar con el control (DMSO 0,2%). Esto significa que a esas concentraciones el compuesto D4 produce destrucción o daño en la membrana de las plaquetas, aumentando la liberación de LDH hacia el medio, causando citotoxicidad. Este mismo efecto se observa en la figura 4B para el compuesto C6 200 uM. En la figura 4C, observamos que el compuesto C11 aumenta significativamente la citotoxicidad en todas las concentraciones testeadas.

TABLA 2: PORCENTAJE DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR COLÁGENO, EN CONTROLES.

% Agregación controles	Slope	Area under
87	94	293,8
78	79	245,8
70	75	247,1
74	57	231,1
71	83	244,7

TABLA 3: PORCENTAJE DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA INDUCIDA POR TRAP-6, EN CONTROLES.

% Agregación controles	Slope	Area under
70	70	263,7
74	70	269,8
76	83	280
77	85	268,2
86	105	330,3
94	149	388,1
77	94	296,5

TABLA 4: PORCENTAJE DE AGREGACIÓN, ÁREA BAJO LA CURVA Y PENDIENTE PARA LOS COMPUESTOS D4 C6 Y C11 INDUCIDAS POR COLÁGENO

COMPUESTOS	200 uM			20 uM			2 uM		
	% Agregación	Slope	Area under	% Agregación	Slope	Area under	% Agregación	Slope	Area under
D4	1	46	2,2	5	55	15	69	53	180,2
				2	46	4,3	77	99	259,8
				1	18	4,2			
	47	50	2,2	4	4	7,4	3	2	2,1
	108	63	6,6	2	53	5			
C6	9	53	27,4	25	31	57,7	73	59	212,7
				9	48	24,7	76	94	272,4
				16	35	51,1			
	3	4	10,4	6	6	18,6	10	11	28,1
	24	37	61,7	4	13	13			
C11	9	55	26,9	25	64	69,7	9	51	23
				20	64	64,4	15	28	39,7
				21	63	66,3			
	6	9	21,9	27	15	36,1	56	61	191,5
	4	11	12,4	38	13	83,3			

TABLA 5: PORCENTAJE DE AGREGACIÓN, AREA BAJO LA CURVA Y PENDIENTE PARA LOS COMPUESTOS D4 C6 Y C11 INDUCIDAS POR TRAP-6

COMPUESTO	200 uM			20 uM			2 uM		
	% Agregación	Slope	Area under	% Agregación	Slope	Area under	% Agregación	Slope	Area under
D4	2	48	5,1	2	50	4,8	77	59	270,5
				0	44	0	85	83	338,5
				1	48	3,6			
	5	7	1,7	2	2	3,5	10	18	9,2
	8	6	25	3	51	5,4	87	90	339,4
	42	39	183,1	4	6	6,4	86	116	351
	45	31	172,6	16	11	55,5	44	55	183,6
C6	4	55	16,7	34	61	88,3	70	61	252,1
				16	50	56,7	65	74	248,1
				50	50	182,2			
	21	11	63,3	6	40	16,5	8	6	18,1
	32	46	69,4	70	53	207,4	79	92	284,2
	5	13	7,3	85	110	326,1	88	142	346,6
	36	15	117,7	57	63	219	79	101	291,9
C11	9	28	28,5	15	9	39,5	63	66	222
				18	70	64,7	72	74	271,4
				25	35	72			
	11	9	23,4	37	22	111,9	8	35	28,8
	1	28	0,5	27	9	63,2	71	64	153,3
	3	15	12,7	52	24	149,5	88	123	364,9
	2	7	4,6	57	28	148,6	42	63	170,5

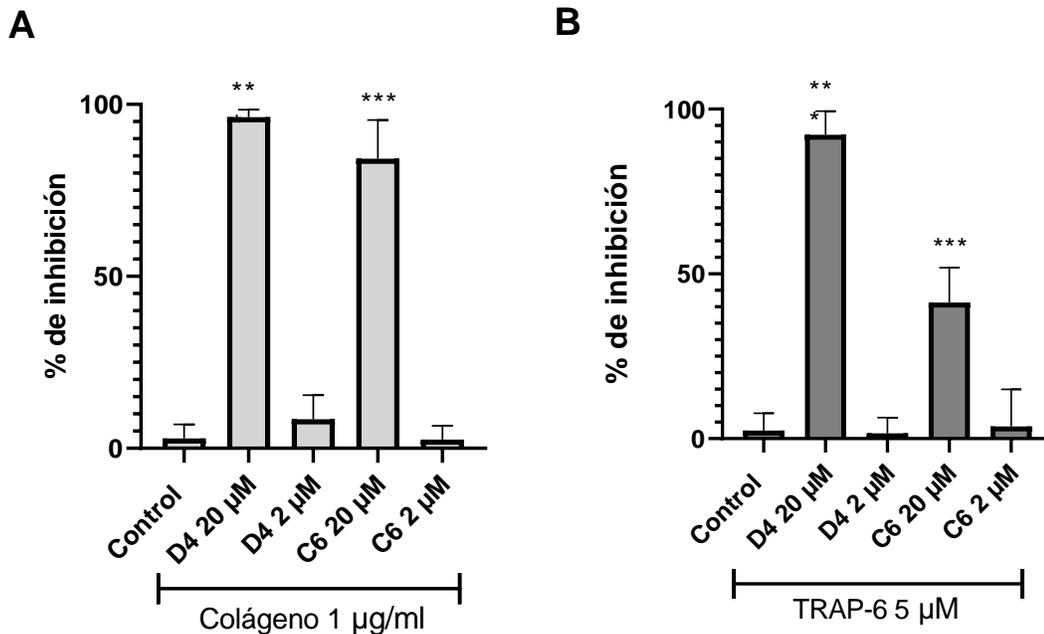


FIGURA 5: porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de compuestos contra colágeno y TRAP-6.

Análisis resultados: Se observan diferencias estadísticamente significativas en la figura 5A para los compuestos D4 y C6 20 uM al comparar con el control. Esto se traduce en una elevada inhibición (entre 80 y 90%) de la agregación normal de las plaquetas estimuladas con Colágeno por efecto de los compuestos. Lo mismo se observa en la figura 5B, donde las plaquetas estimuladas con TRAP-6 fueron inhibidas por los compuestos D4 y C6 20 uM, pero con una menor potencia, especialmente para el compuesto C6 (inhibición de un 40% aproximadamente).

8. DISCUSION

Las enfermedades cardiovasculares se clasifican dentro de las enfermedades no transmisibles (ENT) o crónicas, las cuales son afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta (58). Las ECV son causadas por los trastornos del corazón y vasos sanguíneos, incluyéndose en este grupo la cardiopatía coronaria, accidentes cerebrovasculares, hipertensión, entre otras (59).

Las ECV están fuertemente influenciadas por la función plaquetaria a través de mecanismos trombóticos y aterogénicos, en donde las vías que regulan la actividad plaquetaria y que conducen a la oclusión coronaria son centrales en la patogénesis de los síndromes coronarios agudos, siendo las causas principales de estas patologías el presentar factores de riesgo como el consumo de tabaco, inactividad física y un régimen alimentario insalubre (60).

Uno de los objetivos que persigue hoy en día la salud pública es el evitar las ECV, fomentando la prevención para que estas enfermedades, no se presenten, ya sea por una buena alimentación, o consumiendo productos con propiedades biológicas beneficiosas para dichas enfermedades, en este caso nos referimos principalmente a la terapia antiplaquetaria como tratamiento para la prevención de la activación plaquetaria.

El uso más frecuente de los fármacos antiplaquetarios está la prevención primaria o secundaria de la trombosis arterial, y más específico, preferentemente el infarto agudo de miocardio (IAM), en el que las plaquetas, ante la ruptura o erosión de las placas

Ateroscleróticas en las arterias coronarias, se agregan formando un trombo que obstruye la circulación sanguínea. Un balance favorable entre los efectos benéficos y las complicaciones de la terapia antiplaquetaria se alcanza al tratar pacientes en los cuales el riesgo trombótico está por sobre los riesgos de complicaciones hemorrágicas (61).

Conectando con dicha idea, dentro de esto están los derivados de hidroquinonas, que son los compuestos con los cuales se experimentó para conocer un poco más de su mecanismo de acción antiplaquetaria, con el fin de contribuir al desarrollo de fármacos ya que como sabemos, el arsenal terapéutico de los medicamentos que controlan la activación plaquetaria es muy limitado (62).

La muerte celular puede ocurrir ya sea por apoptosis, una vía altamente regulada que involucra cascadas de transducción de señales, o por necrosis. La necrosis se acompaña de hinchazón mitocondrial y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, mientras que la apoptosis implica una descomposición articulada de la célula en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana (63). Existen numerosas técnicas de detección disponibles que detectan la citotoxicidad y la muerte celular, independientemente del mecanismo. La mayoría de estos ensayos evalúan la viabilidad celular midiendo la permeabilidad de la membrana plasmática.

La lactato deshidrogenasa es una enzima soluble ubicada en el citosol. La enzima se libera en el medio de cultivo circundante tras el daño celular o la lisis. La actividad de LDH en el medio de cultivo puede, por lo tanto, usarse como un indicador de la integridad de la membrana celular y, por lo tanto, una medida de citotoxicidad.

El kit de ensayo de citotoxicidad de LDH utilizado mide daño y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática en respuesta a compuestos químicos o factores ambientales utilizando una reacción acoplada de dos pasos. Lo cual se mide entre 490-520 nm. La cantidad de formazán producida es proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio de cultivo como resultado de la citotoxicidad.

Dentro de la literatura podemos encontrar estudios en donde utilizan esta técnica en distintos modelos celulares tales como; *EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR EFLUENTES HOSPITALARIOS SOBRE Cyprinus carpio* de la universidad autónoma de México en el año 2013, y *CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS QUE MEDIAN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DIFERENTES TIPOS DE ACETOGENINAS DE ANNONACAEAS EN LÍNEAS TUMORALES HUMANAS* artículo de la universidad autónoma de Madrid el año 2010, lo cual nos indica la importancia de demostrar que las concentraciones o compuestos usados en cualquier investigación no deben alterar la integridad celular.

Así mismo existen estudios que se encuentran relacionados a este ensayo debido a que miden la citotoxicidad por liberación de LDH en plaquetas lavadas las cuales se utilizan como screening inicial antes de evaluar compuestos, como es el caso del siguiente estudio; *Synthesis and Biological Evaluation of Thio-Derivatives of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone (Lawsonia) as Novel Antiplatelet Agents. Del año 2020.*

En este estudio se pudo determinar la citotoxicidad de cada compuesto gracias a este kit, según los resultados de la figura 4A podemos decir que el compuesto D4 produce destrucción o daño en la membrana de las plaquetas aumentando la liberación de LDH hacia el medio, causando citotoxicidad a una concentración de 100 y 200 uM. Este mismo efecto se observa en la figura 4B para el compuesto C6 200 uM. En la figura 4C, observamos que el compuesto C11 aumenta significativamente la citotoxicidad en todas las concentraciones testeadas.

Con esta información, se decidió excluir al compuesto C11 de los ensayos posteriores de agregación plaquetaria por su elevada citotoxicidad sobre las plaquetas. Del mismo modo se decidió utilizar los compuestos D4 y C6 desde concentraciones 20 μM , es decir, no citotóxicas.

Una vez obtenidos los porcentajes de agregación de inhibición y la citotoxicidad de cada compuesto se procedió a calcular el IC50 que es la concentración inhibitoria media máxima, esta es una medida de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica, en este caso de la agregación plaquetaria. IC50 nos permite conocer de forma cuantitativa qué cantidad de una sustancia inhibidora particular ya sea D4 o C6 se necesita para inhibir, *in vitro*, la agregación plaquetaria a nivel mitocondrial dado en un 50%. El cual se expresa en concentración molar.

Tras los resultados graficados en la figura 5A podemos decir que se traducen en una elevada inhibición entre 80 y 90% de la agregación normal de las plaquetas estimuladas con Colágeno por efecto de los compuestos. Lo mismo se observa en la figura 5B, donde las plaquetas estimuladas con TRAP-6 fueron inhibidas por los compuestos D4 y C6 20 μM , pero con una menor potencia, especialmente para el compuesto C6 se observa una inhibición de un 40% aproximadamente. Dentro de los estudios realizados hasta la fecha se han evaluado la actividad biológica de quinonas, estos compuestos aceptan electrones, por la atracción conferida por los sustituyentes de los residuos quinoides, los cuales modulan las propiedades redox responsables de estrés oxidativo, mecanismo implicado en la inhibición del crecimiento viral y de células cancerígenas (64). Sin embargo las hidroquinonas son compuestos de los cuales también se han realizado estudios debido a sus propiedades REDOX y potencial como agentes antioxidantes. Las propiedades REDOX de las hidroquinonas han demostrado actividad contra células tumorales, mostrando acciones específicas en la fosforilación oxidativa de las células cancerosas a partir de derivados de estos compuestos (65).

Dentro de estos estudios podemos destacar la memoria denominado “*síntesis de sales de fosfonio, de acilhidroquinonas, inhibidoras de la proliferación celular*” de la universidad de Chile en el 2014 en donde se trabajó la síntesis y caracterización de una serie de acilhidroquinonas lipofílicas, portadoras de un átomo de bromo o del catión trifenilfosfonio en el fragmento acílico, características que permiten una mayor incorporación a las mitocondria. Lo cual lo podemos comparar con las estructuras de los compuestos trabajados en esta memoria.

Si bien los compuestos D4 y C6 presentan una efectiva actividad antiagregante sin producir efectos citotóxicos en las plaquetas lavadas, no conocemos con exactitud su mecanismo de acción, pero si existe la posibilidad que estos compuestos ejerzan su acción antiagregante por algún efecto dentro de la mitocondria, tal como se destaca en los estudios realizados con mitoquinonas (MitoQ) “la cual produce despolarización y disminución de la secreción de ATP y que probablemente esté asociado con su efecto antioxidante mitocondrial.”(66). Tomando en cuenta esto se podrían realizar ensayos posteriores de funcionalidad mitocondrial, lo cual sería de gran utilidad para ampliar el conocimiento de estos derivados.

9. CONCLUSION

Tras los resultados obtenidos podemos concluir que el compuesto C11 presenta una elevada citotoxicidad, por lo que tuvo que ser excluido de los ensayos de agregación. El compuesto D4 no altera la integridad (citotoxicidad) de las plaquetas desde la concentración 20 μM . El compuesto C6 no produce citotoxicidad en las concentraciones 20 y 100 μM .

Los compuestos D4 y C6 producen una inhibición de la agregación de las plaquetas estimuladas con Colágeno y TRAP-6 en la concentración 20 μM , pero pierden el efecto a la concentración 2 μM .

Tomando en cuenta esto se podrían ampliar los resultados de agregación para los compuesto en concentraciones intermedias entre 2 y 20 μM .

Se necesitan estudios adicionales para evaluar el posible mecanismo de la inhibición de la agregación de las plaquetas. Estos podrían ser estudios de función mitocondrial, debido a que los compuestos están conjugados con TPP⁺ y deberían acumularse al interior de la mitocondria.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. 2010. Global status report on non communicable diseases. Technical report. Series ISBN 978 92 4 156422 9. Ginebra:WHO.
2. Kaushik, M., Sontineni, S. P., & Hunter, C. (2010). Cardiovascular disease and androgens: A review. *International Journal of Cardiology*, 142(1), 8-14.
3. World Health Organization. Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Non-communicable Diseases. WHO; Geneva: 2008. pp. 3–33.
4. Kelly, B. B., Narula, J., & Fuster, V. (2012). Recognizing Global Burden of Cardiovascular Disease and Related Chronic Diseases. [Article]. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 79(6), 632-640.
5. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, 2011.
6. Luft, F. C. (2000). Renal disease as a risk factor for cardiovascular disease. *Basic Research in Cardiology*, 95(1), I72-I76.
7. Ministerio de Salud de Chile. Departamento de Enfermedades no Transmisibles. Disponible:
<http://web.minsal.cl/portal/url/item/787e4765248bc9e0e04001011f0172b5.pdf>, Consultado el 14 de Junio de 2014.
8. Icaza G., Nuñez L. 2006. Atlas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Disponible:
http://www.pieies.otalca.cl/pdf/proyectos/Atlas_de_Mortalidad_por_Enfermedades_Cardiovasculares.pdf, Consultado el 15 de Junio de 2014.
9. Wang L, Manson JE, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. Fruit and vegetable intake and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Am J Hypertens*. 2012;25(2):180-9.

10. Torres U C, Guzmán J L, Moore-Carrasco R, Palomo G I. Efecto antitrombótico, una característica poco conocida de las frutas y hortalizas. *Revista chilena de nutrición*. 2008;35:10-7.
11. Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: Secondary haemostasis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2011;16(6):294-300.
12. Palomo I, Pereira J., Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. 1a ed. Talca. Universidad de Talca. 2005. 460 p.
13. Clemetson KJ. Platelets and Primary Haemostasis. *Thrombosis Research*. 2012;129(3):220-4.
14. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research*. 2007;100(12):1673-85.
15. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia*. 2014;20:15-22.
16. Fullard JF. The Role of the Platelet Glycoprotein IIb / IIIa in Thrombosis and Haemostasis. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10(14):1567-76.
17. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfusion and Apheresis Science*. 2008;38(1):15-23.
18. Palomo I, Pereira J., Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. 1a ed. Talca. Universidad de Talca. 2005. 495 p.
19. Spronk HMH, Govers-Riemslog JWP, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *BioEssays*. 2003;25(12):1220-8.
20. Ueshima S, Matsuo O. Development of New Fibrinolytic Agents. *Curr Pharm Des* 2006 03;12(7):849-57.
21. Palomo I, Pereira J., Palma J. *Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico*. 1a ed. Talca. Universidad de Talca. 2005. 511 p.
22. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv Pathol Anat*. 1985;90:261-332.
23. Scazziota A, Altman R. El mecanismo de la hemostasia. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1994;7:95-109.
24. Altman R, Scazziota A, Rouvier J. El mecanismo de la trombosis. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1994;7:110-7.

25. Pérez Ruíz Andrés O, Castillo Herrera José A, Gortazar González Teresa, Alvarez Fornari Miguel, Douglas Pedroso Roberto, Díaz Rondón Belsys. Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 1997 Dec; 16(2): 150-155. Altman R, Scazziota A, Rouvier J. El mecanismo de la trombosis. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1994;7:110-7.
26. Altman R, Scazziota A, Rouvier J. El mecanismo de la trombosis. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1994;7:110-7.
27. Puras Mallagray E. Antiagregación plaquetaria en la enfermedad arterial oclusiva: clopidogrel. *Anales de Cirugía Vascul.* 2009;23:37-43.
28. Palomo I, Pereira J., Palma J. Hematología, Fisiopatología y Diagnóstico. 1a ed. Talca. Universidad de Talca. 2005. 475-478 p.
29. Zhou L, Schmaier A. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field. *American Journal of Clinical Pathology.* 2005;123(2):172-183.
30. Janssen, R. J.; Nijtmans, L. G.; van den Heuvel, L. P.; Smeitink, J. A., *J Inherit Metab Dis*, (2006) 29, 499.
31. Mimaki, M.; Wang, X.; McKenzie, M.; Thorburn, D. R.; Ryan, M. T., *Biochim Biophys Acta*, (2012) 1817, 851.
32. Dudkina, N. V.; Kouřil, R.; Peters, K.; Braun, H.-P.; Boekema, E. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, (2010) 1797, 664.
33. Kotiadis, V. N.; Duchon, M. R.; Osellame, L. D., *Biochim Biophys Acta*, (2014) 1840, 1254.
34. Antico Arciuch, V. G.; Elguero, M. E.; Poderoso, J. J.; Carreras, M. C., *Antioxid Redox Signal*, (2012) 16, 1150.
35. Harman, D., *J Am Geriatr Soc*, (1972) 20, 145.
36. Santos M; Aranda E; Vallés J; Palomo I, *Editorial Universidad de Talca*, (2005), 459.
37. Richardson, J. L.; Shivdasani, R. A.; Boers, C.; Hartwig, J. H.; Italiano, J. E., Jr., *Blood*, (2005) 106, 4066.
38. Clemetson, K. J., *Thromb Res*, (2012) 129, 220.
39. Freedman, J. E., *Circulation*, (2005) 112, 2725.
40. Borsig, L., *Expert Rev Anticancer Ther*, (2008) 8, 1247.
41. Slattery, D. E.; Pollack, C. V., *West J Emerg Med*, (2009) 10, 163.

42. Jackson, S. P.; Nesbitt, W. S.; Westein, E., *J Thromb Haemost*, (2009) 7 Suppl 1, 17.
43. Chacko, B. K.; Kramer, P. A.; Ravi, S.; Johnson, M. S.; Hardy, R. W.; Ballinger, S. W.; Darley-Usmar, V. M., *Lab Invest*, (2013) 93, 690.
44. Kramer, P. A.; Ravi, S.; Chacko, B.; Johnson, M. S.; Darley-Usmar, V. M., *Redox Biol*, (2014) 2, 206.
45. Akahori, M.; Uedono, Y.; Yamagami, K.; Takeyama, N.; Kitazawa, Y.; Tanaka, T., *Haematologia (Budap)*, (1995) 26, 191.
46. Reuter, H.; Gross, R., *Suppl Thromb Haemost*, (1978) 63, 87.
47. Shrivastava, M.; Vivekanandhan, S.; Pati, U.; Behari, M.; Das, T. K., *Int J Neurosci*, (2011) 121, 149.
48. Zharikov, S.; Shiva, S., *Biochem Soc Trans*, (2013) 41, 118.
49. Avila, C.; Huang, R. J.; Stevens, M. V.; Aponte, A. M.; Tripodi, D.; Kim, K. Y.; Sack, M. N., *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, (2012) 120, 248.
50. Ben-Shachar, D.; Bonne, O.; Chisin, R.; Klein, E.; Lester, H.; Aharon-Peretz, J.; Yona, I.; Freedman, N., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, (2007) 31, 807.
51. Begonja, A. J.; Gambaryan, S.; Geiger, J.; Aktas, B.; Pozgajova, M.; Nieswandt, B.; Walter, U., *Blood*, (2005) 106, 2757.
52. Fuentes, E.; Palomo, I., *Life Sci*, (2016) 148, 17.
53. Wang, Z.; Cai, F.; Hu, L.; Lu, Y., *Platelets*, (2014) 25, 373.
54. Pandey A, Tripathi P, Pandey R, Srivatava R, Goswami S. Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(4):504-12.
55. Dayal, S.; Wilson, K. M.; Motto, D. G.; Miller, F. J., Jr.; Chauhan, A. K.; Lentz, S. R., *Circulation*, (2013) 127, 1308.
56. Watt, J.; Ewart, M. A.; Greig, F. H.; Oldroyd, K. G.; Wadsworth, R. M.; Kennedy, S., *Thromb Res*, (2012) 130, 210.
57. Ferroni, P.; Santilli, F.; Cavaliere, F.; Simeone, P.; Costarelli, L.; Liani, R.; Tripaldi, R.; Riondino, S.; Roselli, M.; Davi, G.; Guadagni, F., *Int J Cancer*, (2017) 140, 696.
58. OMS | Enfermedades no transmisibles: World Health Organization; 2017 [updated 2017-03-13 15:36:32. Available from: http://www.who.int/topics/noncommunicable_diseases/es/.

59. OPS/OMS Chile - Enfermedades Cardiovasculares | OPS/OMS 2018 [Available from:
https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=172:enfermedades-cardiovasculares&Itemid=1005.
60. OMS | Capítulo 6: Epidemias mundiales desatendidas: tres amenazas crecientes: World Health Organization; 2010 [updated 2010-11-02 10:09:09. Available from: <http://www.who.int/whr/2003/chapter6/es/index1.html>.
61. Born G, Patrono C. Antiplatelet drugs. *Br J Pharmacol*. 2006; 147 Suppl 1: S241251.
62. Watt, J.; Ewart, M. A.; Greig, F. H.; Oldroyd, K. G.; Wadsworth, R. M.; Kennedy, S., *Thromb Res*, (2012) 130, 210.
63. Bonfoco, E., Krainc D., Ankarcrona, M., et al. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7162-7166 (1995).
64. Durán M, Gaitán R, Olivero J. Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides. *Revista cubana de información en Ciencias de la salud*. 2013;24(4):416-430
65. Urra F, Córdova-Delgado M, Lapier M, Orellana-manzano A, Acevedo-Arevalo L, et al. Small structural changes on a hydroquinone scaffold determine the complex inhibition or uncoupling of tumoral oxidative phosphorylation. *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 291 (2016) 26-57
66. Diego M, diego A, francisco F, Ramiro A, Ivan P, Marcelo A, David S, Antonio Z, Eduardo F, La mitoquinona (MitoQ) inhibe los pasos de activación plaquetaria al reducir los niveles de ROS. (2020).