



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL PLAQUETARIA POR  
*ORTO-CARBONILHIDROQUINONA* CONJUGADO CON FOSFONIO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: SOLEDAD ANDREA SALGADO SALGADO  
PROFESOR GUÍA: DR. TM. EDUARDO FUENTES QUINTEROS**

**TALCA, CHILE  
2021**

## 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, 2022



## ÍNDICE

	Páginas
AGRADECIMIENTOS .....	5
1. RESUMEN .....	6
2. INTRODUCCIÓN .....	7
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1. Enfermedad cardiovascular (ECV).....	9
3.2. Plaquetas .....	11
3.3. Activación plaquetaria (vías de activación y agonistas) .....	13
3.4. Mitocondrias .....	16
3.5. Función mitocondrial en plaquetas.....	17
3.6. Hidroquinonas .....	20
3.7. Cation Trifenilfosfonio TPP+.....	21
4. HIPÓTESIS .....	26
5. OBJETIVOS .....	27
5.1. Objetivo general .....	27
5.2. Objetivos específicos .....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
6.1. Compuesto D4.....	28
6.2. Preparación de buffer Tyrodes sin calcio.....	28
6.3. Preparación de plaquetas humanas .....	29
6.4. Ensayo de citotoxicidad LDH .....	29
6.5. Marcador de activación de P-selectina .....	29
6.6. Potencial de membrana mitocondrial .....	30
6.7. Niveles de especies reactivas del oxígeno .....	30
6.8. Análisis estadístico .....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1. Ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) .....	32
7.2. Marcador de activación: P-selectina.....	32
7.3. Potencial de membrana mitocondrial .....	33
7.4. ROS intracelular .....	34
8. DISCUSIÓN .....	36
9. CONCLUSIÓN.....	42

10. BIBLIOGRAFÍA .....	43
------------------------	----

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papel del estrés oxidativo en la hiperreactividad plaquetaria durante el envejecimiento.....	10
Figura 2. Rol de las plaquetas en la hemostasia y trombosis. ....	12
Figura 3. Rodamiento, anclaje, adherencia firme y transmigración de leucocitos promovida por la deposición de plaquetas en sitios de lesión vascular.....	14
Figura 4. Los mecanismos y las respuestas inflamatorias de la activación plaquetaria.....	15
Figura 5. Metabolismo mitocondrial.....	17
Figura 6. Descripción general de la producción de ROS mitocondriales. ....	18
Figura 7. Representación esquemática de la conversión de quinona en semiquinona e hidroquinona.....	21
Figura 8. Acumulación de MitoQ en células y mitocondrias. ....	23
Figura 9. Efecto del compuesto D4 sobre la liberación de LDH (viabilidad celular). ....	32
Figura 10. Efecto del compuesto D4 sobre la expresión de P-selectina. ....	33
Figura 11. Efecto del compuesto D4 sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). .....	34
Figura 12. Efecto del compuesto D4 sobre los niveles de ROS intracelular. ....	35

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos de buffer Tyrodes sin calcio.....	28
--	----

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Proyecto ANID/FONDECYT N°1180427, quien financió esta tesis, 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 el derivado de hidroquinona.

## 1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son consideradas una de las principales causas de muerte en el mundo, y las plaquetas toman un papel importante en estas patologías, ya que son las que se unen al endotelio cuando este está dañado formando trombos. Hoy en día la necesidad de nuevos fármacos antiagregantes plaquetarios llevan al estudio de nuevas moléculas que cumplan esta función. Como las plaquetas son anucleadas, la vida media de ellas está determinada en gran medida por la salud de sus mitocondrias, y como es en las mitocondrias donde se produce la mayor cantidad de daño oxidativo, diferentes estudios han demostrado que las ubiquinonas protegen a las mitocondrias de este daño, dado a sus efectos antiplaquetarios, antioxidantes y antiinflamatorios. Pero actualmente hay una falta de evidencia sobre la actividad antiplaquetaria de las hidroquinonas y es por esto que en la siguiente investigación se evaluará la inhibición plaquetaria del compuesto D4 y su efecto sobre la bioenergética mitocondrial, por lo que la metodología a utilizar será la extracción de plaquetas de individuos sanos donadas previamente a la cual se evaluará la potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad citotóxica que genera el compuesto, para dilucidar su posible mecanismo de acción, ya que según estudios previos este compuesto demostró que tiene efectos antiagregantes. Finalmente se concluye que el compuesto presenta efectos sobre la función mitocondrial de las plaquetas.

**Palabras claves:** mitocondria, hidroquinona, especies reactivas de oxígeno, membrana mitocondrial, TTP+.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) tienen un impacto significativo en la salud, ya que, a pesar de los avances en el tratamiento, las ECV se asocian con una morbilidad y mortalidad significativas, ya que en un evento cardiovascular, la rotura de la placa aterosclerótica conduce a la activación, adhesión y agregación plaquetaria, debido a que existe una amplia variedad de receptores de superficie y moléculas intraplaquetarias que apoyan y regulan esta activación, y, los cuales, son factores vitales en la formación temprana de un trombo (1). La activación plaquetaria es un evento complejo de respuesta a la lesión vascular y la enfermedad aterotrombótica, por lo tanto, son objetivos potenciales de la terapia antiplaquetaria para la prevención y el tratamiento de la trombosis arterial (2). Los agentes antiplaquetarios son fundamentales para la prevención de complicaciones y eventos isquémicos cardiovasculares recurrentes (3, 4).

Las plaquetas son células anucleadas formada por una membrana plasmática y un citoplasma, que son producto de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea, tienen forma de disco u ovaladas en reposo y permanecen en circulación durante 7 a 10 días en condiciones normales. Contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos: los gránulos densos que liberan difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros; los lisosomas plaquetarios que contienen elastasas y otras proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular, además de crear un ambiente ácido que favorecerá la acción de estas enzimas; y los gránulos  $\alpha$  que liberan principalmente factor 4 plaquetario, TGF beta 1, fibronectina,  $\beta$ -tromboglobulina, FvW, fibrinógeno, y factor V y VIII (5, 6). Las plaquetas desempeñan funciones importantes en la hemostasia, la trombosis, la cicatrización de heridas y la aterosclerosis (7). La función fisiológica primaria de las plaquetas es formar trombos hemostáticos que previenen la pérdida de sangre y mantienen la integridad vascular, y esta función debe estar estrictamente regulada debido a que la formación de trombos de manera anormal (trombosis) causa el bloqueo de los vasos sanguíneos, lo que se desencadena en isquemia (8).

Por tanto, las plaquetas en circulación normal están en un estado de reposo no adherente y se activan en los sitios de lesión vascular después de la exposición a proteínas

adhesivas inmovilizadas o agonistas plaquetarios solubles, como por ejemplo factor tisular. Por lo tanto, la activación plaquetaria es un proceso complejo que implica múltiples ciclos de retroalimentación y el acoplamiento entre diferentes vías, en este caso, las plaquetas se basan en mecanismos de amplificación de señales secundarias endógenas y su regulación para lograr un nivel relevante de respuesta a la lesión vascular (8, 9).

La función mitocondrial participa en varios mecanismos de supervivencia y muerte celular, donde la permeabilización de la membrana mitocondrial es un evento considerado como el punto de no retorno en la activación de la señalización de muerte celular apoptótica intrínseca y no apoptótica (10, 11). Las mitocondrias son una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que se han reconocido como un importante mensajero secundario y se han identificado varios sitios mitocondriales donde se producen estas ROS, como la cadena transportadora de electrones (CTE), la cual es la más caracterizada. El ROS dominante en la matriz mitocondrial es el  $H_2O_2$ . El acoplamiento entre reacciones redox y la síntesis de ATP varía entre los tipos de células sanguíneas y en condiciones fisiopatológicas donde hay disfunción mitocondrial, como cáncer, diabetes, envejecimiento y ECV, lo que conduce a diferentes patrones de metabolismos energéticos (10, 11).

Durante las últimas dos décadas, ha prosperado la investigación centrada en la señalización celular dependiente de mitocondrias y la muerte celular. El desarrollo de fármacos terapéuticos capaces de restaurar la función mitocondrial es muy importante y necesario, ya que la focalización mitocondrial específica conduce a fármacos más precisos y eficaces. Las investigaciones actuales se basan, en parte, en la premisa de que la mitigación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por antioxidantes o agentes dirigidos a las mitocondrias inhibe la muerte celular. Aunque aún no se comprenden los mecanismos exactos con los que los agentes dirigidos a las mitocondrias o cationes dirigidos a mitocondrias afectan la función mitocondrial, publicaciones recientes revelan nuevos e interesantes mecanismos de señalización redox inducidos por esta clase de compuestos en células neuronales y cancerosas (12).

En esta investigación se usarán moléculas conjugadas con catión trifenilfosfonio (TPP+) para dirigirlas hacia la mitocondria y evaluar su efecto en la activación plaquetaria.

### 3. MARCO TEÓRICO

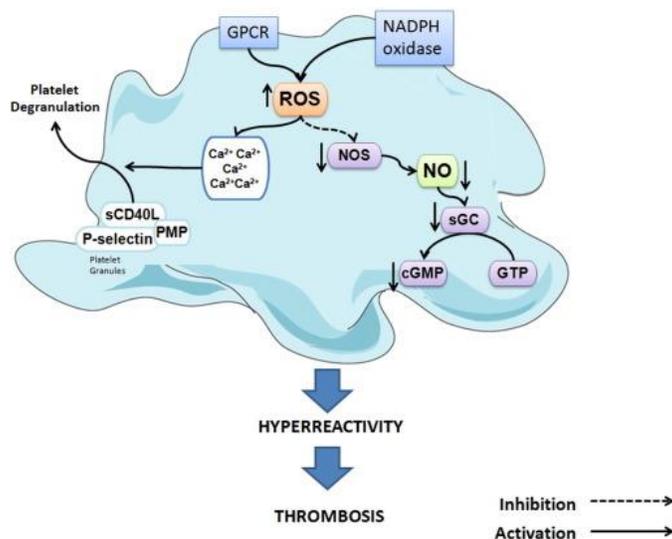
#### 3.1. Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Las ECV son trastornos del corazón y del sistema circulatorio de tipo crónicos que van evolucionando gradualmente a lo largo de la vida y son asintomáticas durante mucho tiempo, cuya causa subyacente de desarrollo es la aterosclerosis, la cual implica una interacción compleja entre las vías metabólicas que gobiernan la deposición de lípidos, las respuestas inflamatorias e inmunes a los lípidos oxidados y la disfunción endotelial, y cuando estos procesos culminan en una trombosis, se produce también infarto de miocardio (IM) y accidente cerebrovascular (1, 2). Por lo general, solo una ECV avanzada causa síntomas o el primer síntoma puede ser la muerte súbita, es por esto que los marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva (PCR), la mieloperoxidasa (MPO) y los niveles de leucocitos son fuertes predictores de muerte cardiovascular, IM y accidente cerebrovascular (2).

Las ECV son causadas por múltiples factores, algunos de ellos son invariables, como la edad, sexo, herencia genética y de manera similar, las personas con afecciones inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (LES) tienen un mayor riesgo de desarrollar una ECV; otros factores son variables como tabaquismo, inactividad física, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, etc. (2, 13). Las ECV aumentan en incidencia en los ancianos, una tendencia que depende de los cambios relacionados con la edad en los sistemas vascular y hemostático, ya que se considera comúnmente que la lesión vascular acelerada por la edad es el resultado de un aumento del estrés oxidativo (figura 1), en estas condiciones, el envejecimiento se asocia con inmunosenescencia y se acompaña de un estado inflamatorio crónico que contribuye al síndrome metabólico, la diabetes y sus consecuencias cardiovasculares (14). Ahora bien, las ECV implica los procesos bidireccionales de trombosis e inflamación, en donde durante estos procesos, las plaquetas se activan, y esta activación va seguida de la adhesión plaquetaria que se caracteriza por la expresión de una variedad de glicoproteínas en la superficie de su membrana (15). En los ancianos, la disfunción endotelial produce cambios en la expresión y los niveles plasmáticos de importantes componentes endoteliales relacionados con la modulación mediada por endotelio en la hemostasia, estos incluyen

alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico y prostanoïdes, endotelina-1, trombomodulina y factor de Von Willebrand (16).

La reducción de la morbilidad y mortalidad por ECV es el objetivo de las estrategias preventivas clínicas y poblacionales, y dado que las ECV son multifactoriales, es necesario monitorear y actuar sobre varios factores de riesgo diferentes al mismo tiempo (13, 17). La aterosclerosis, caracterizada por la alteración de la lesión aterosclerótica con formación de trombos superpuestos, es el proceso subyacente común de numerosas manifestaciones progresivas de síndromes coronarios agudos y muerte cardiovascular. Después de la rotura, fisura o erosión de una placa aterosclerótica; Los eventos aterotrombóticos son esencialmente procesos impulsados por plaquetas (18). Las plaquetas tienen un repertorio funcional dinámico que media la función hemostática, sin embargo, la función plaquetaria está alterada en los adultos mayores, por lo tanto, en el envejecimiento, la correlación entre la agregación plaquetaria en sangre total y las interacciones entre las plaquetas y la pared arterial (*in vitro e in vivo*) pueden contribuir a la ECV (14).

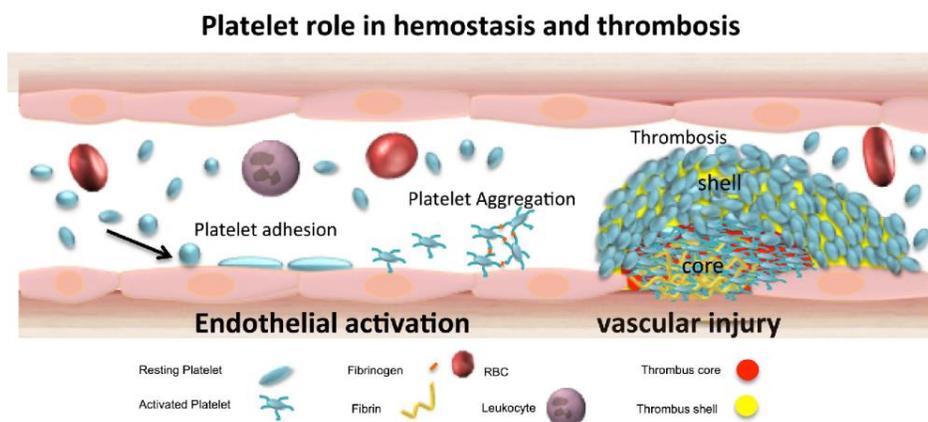


**Figura 1. Papel del estrés oxidativo en la hiperreactividad plaquetaria durante el envejecimiento.**

*Durante el envejecimiento hay aumento del estrés oxidativo en la plaqueta lo que lleva a una hiperactivación de ésta teniendo por consecuencia la producción de trombosis. cGMP: monofosfato de guanosina cíclico; GPCR: receptores acoplados a proteína G; GTP: trifosfato de guanosina; NOS: óxido nítrico sintasa; NO: óxido nítrico; PMP: micropartícula plaquetaria; ROS: especies reactivas de oxígeno; sGC: guanilato ciclase soluble. Adaptado de Fuentes. E, 2016. (14)*

### 3.2. Plaquetas

Las plaquetas son efectores celulares altamente reactivos de hemostasia y trombosis en humanos y otros mamíferos; son células enucleadas de 1–2  $\mu\text{m}$  de tamaño, generadas a partir de megacariocitos, el cual es un proceso sistemático y regulado que se cree que ocurre en la médula ósea o, como se ha demostrado más recientemente, en el pulmón (19). La expectativa de vida de las plaquetas es de 7 a 10 días (5, 20). La lesión de la pared del vaso o la formación de trombos estimula las plaquetas a adherirse a la matriz subendotelial y a someterse a la activación, lo que lleva a la agregación y liberación de mediadores para una mayor agregación, angiogénesis e inflamación (20, 21). Durante su ciclo de vida normal, las plaquetas disminuyen de tamaño de manera que las plaquetas jóvenes son considerablemente más grandes que las más viejas. Al final de su vida en el vaso o después de su activación completa en la incorporación a un coágulo, los neutrófilos y macrófagos los extraen del vaso y los transportan al bazo para su eliminación del cuerpo. En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno. Junto con la visualización de muchas moléculas de adhesión, las plaquetas median el reclutamiento posterior de células inflamatorias y permiten interacciones multidireccionales entre leucocitos, células endoteliales, matriz subendotelial y otras plaquetas, como se observa en la figura 2. Sin embargo, en parte, los mismos procesos causan eventos clínicos adversos asociados con la oclusión de vasos trombóticos. (5, 22)



**Figura 2. Rol de las plaquetas en la hemostasia y trombosis.**

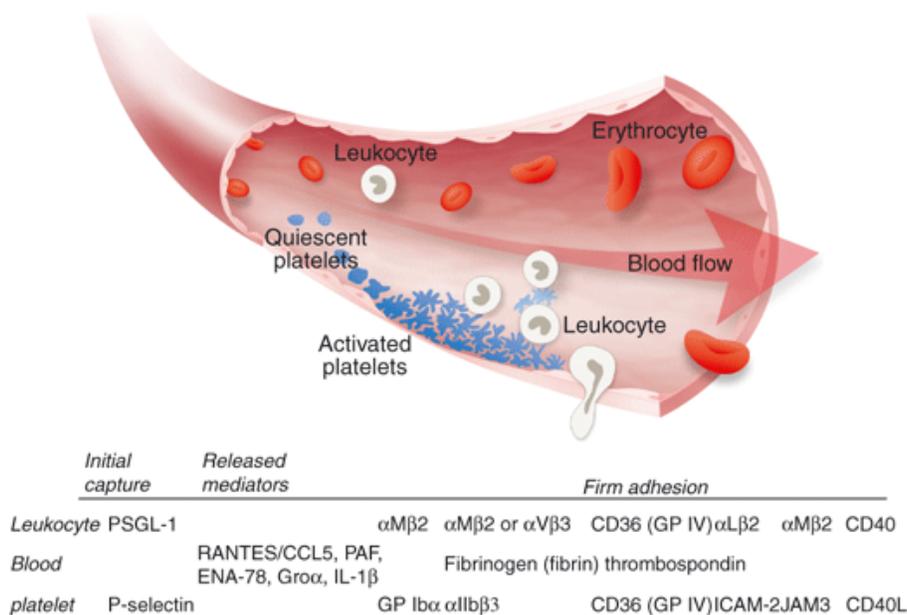
*La activación plaquetaria en el vaso ocurre en varios pasos, comenzando con la unión a la matriz endotelial o subendotelial seguida de una adhesión firme, aplanamiento de las plaquetas y transducción de señales intraplaquetarias. El tapón plaquetario inicial formará un núcleo en la región de la lesión que es rico en fibrina, P-selectina y densamente empaquetada. Las plaquetas más sueltas en el caparazón del trombo rodearán el núcleo y son más sensibles a las terapias antiplaquetarias como la inhibición del receptor COX-1 y P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>. Adaptado de Holinstat. M, 2017. (19)*

Además, las plaquetas contienen diferentes tipos de gránulos desde los que al ser activadas liberan diferentes factores almacenados en ellos y que a su vez estimulan más la actividad de la propia plaqueta. Estos factores tienen también efectos biológicos sobre otras células del entorno plaquetario. (5, 19)

Los gránulos  $\alpha$  son reservorios de proteínas que van desde factores de crecimiento hasta moléculas de adhesión o receptores que utiliza la plaqueta para interactuar con otras células. Entre estos receptores se incluyen las glucoproteínas (GP) Ib y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Otra de las moléculas de adhesión contenidas en estos gránulos es la P-selectina, que permite la interacción de las plaquetas con las células endoteliales, los leucocitos y otras células inmunitarias. Los gránulos densos contienen una variedad de moléculas pequeñas como ADP, ATP, GDP, 5-HT (5-hidroxitriptamina), pirofosfato, magnesio y calcio. Históricamente, la liberación de gránulos densos se describió como "rápida" y, de hecho, un estudio reciente mostró que la liberación de serotonina se produjo más rápidamente que el factor plaquetario 4 (PF-4) de los gránulos  $\alpha$ , independientemente del agonista utilizado para estimular las plaquetas. (5, 6, 23)

### 3.3. Activación plaquetaria (vías de activación y agonistas)

Las plaquetas contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos: los gránulos densos, los gránulos  $\alpha$  y los lisosomas, y pueden ser activadas por numerosos agonistas a través de diferentes vías, en donde la GPIb $\alpha$  actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular dañada iniciando el proceso de adhesión plaquetario uniéndose al colágeno y al factor von Willebrand (FvW). La interacción transitoria entre el FvW y la GPIb $\alpha$  permite el rodamiento o “rolling” de las plaquetas en la zona dañada del vaso (2, 20). Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular, fundamentalmente el colágeno, inducirán la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared, de tal manera que el colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo, en el que el FvW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con las plaquetas. Las interacciones plaquetas-leucocitos se estabilizan luego por eventos dependientes de la integrina  $\beta 2$  para promover el reclutamiento eficiente de leucocitos en el sitio de la lesión vascular y la formación de agregados de plaquetas y leucocitos (5, 20, 21). Después de la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere la agregación plaquetaria. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas debida a su secreción desde las plaquetas ya adheridas a la pared del vaso, en donde las más comunes son la trombina y ADP, ya que la activación plaquetaria óptima inducida por estos agonistas a menudo requiere sinergia o cooperación entre diferentes vías de receptores (figura 3). El calcio liberado por la plaqueta es necesario para la formación de fibrina, mientras que los polifosfatos actúan como elementos reguladores en la coagulación y en el sistema fibrinolítico reaccionando con el factor XII, entre otros. (2, 5, 20)



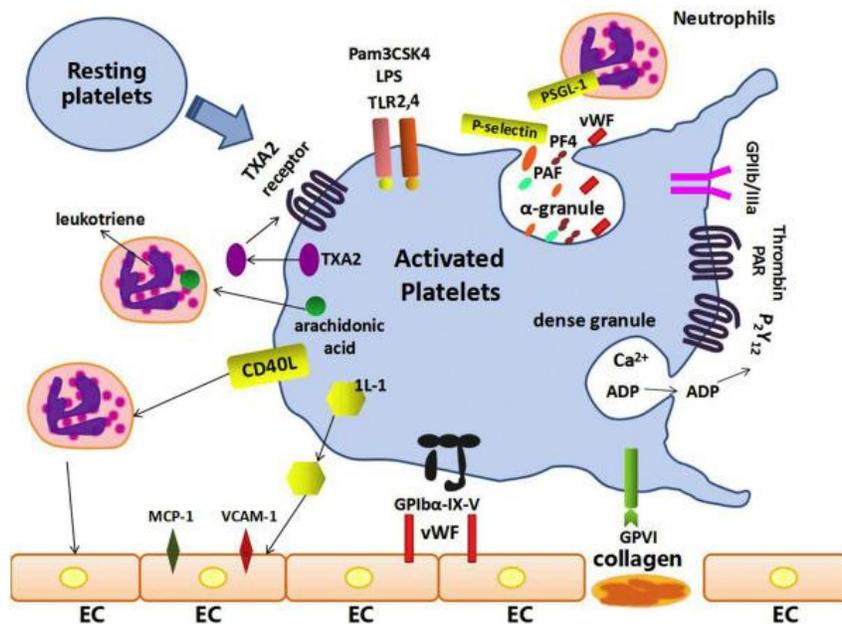
**Figura 3. Rodamiento, anclaje, adherencia firme y transmigración de leucocitos promovida por la deposición de plaquetas en sitios de lesión vascular.**

Las plaquetas se unen al subendotelio expuesto en los sitios de lesión vascular y pueden adherirse al endotelio inflamado y activado. Las plaquetas adherentes activadas pueden reclutar leucocitos a los sitios de lesión o inflamación. Se anotan algunos de los pares de receptores clave que participan en las interacciones inicial y sostenida entre plaquetas y leucocitos. ENA, péptido activador de neutrófilos epiteliales; GP, glicoproteína; Gro, oncogén relacionado con el crecimiento; IL, interleucina; ICAM, molécula de adhesión intercelular; JAM, molécula de adhesión de la unión; PAF: factor activador de plaquetas; PSGL: ligando de glucoproteína de selectina P; RANTES, regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas. Adaptado de SS Smyth y col, 2009. (20)

La activación plaquetaria inducida por trombina implica vías de señalización y receptores aún más complejas, ya que es el agonista plaquetario más potente y activa las plaquetas a través de los receptores activados por proteasa (PAR, por sus siglas en inglés) y GPIb-IX-V. PAR-1 y PAR-4 median la mayor parte de la respuesta plaquetaria a la trombina, en donde PAR-1 es sensible a niveles bajos de trombina, y PAR-4 desencadena la activación y agregación plaquetaria solo a concentraciones altas de trombina. Por otro lado, el ADP, que se libera de gránulos densos es uno de los componentes principales de la liberación de plaquetas activadas, actúa como agonista en 2 de los receptores de plaquetas acoplados a proteína G: el receptor P2Y<sub>1</sub> acoplado a G<sub>q</sub> y el receptor P2Y<sub>12</sub> acoplado a G<sub>i</sub>. La activación de P2Y<sub>1</sub> inicia la agregación plaquetaria inducida por ADP y es responsable

del cambio de forma de las plaquetas. La estimulación de P2Y<sub>12</sub> da como resultado la amplificación y estabilización de la respuesta de agregación (figura 4). (2, 24)

La sinergia de estos diferentes receptores mejora en gran medida la sensibilidad de las plaquetas a concentraciones bajas de trombina, que es importante para la trombosis arterial (25). Los tratamientos antitrombóticos más eficaces que se utilizan actualmente se dirigen específicamente a la cascada de retroalimentación positiva de ADP / P2Y<sub>12</sub>, bloqueando los receptores P2Y<sub>12</sub> y limitando así la activación y agregación plaquetaria y los riesgos de trombosis patológica, en particular en el tratamiento de la enfermedad coronaria. (6)

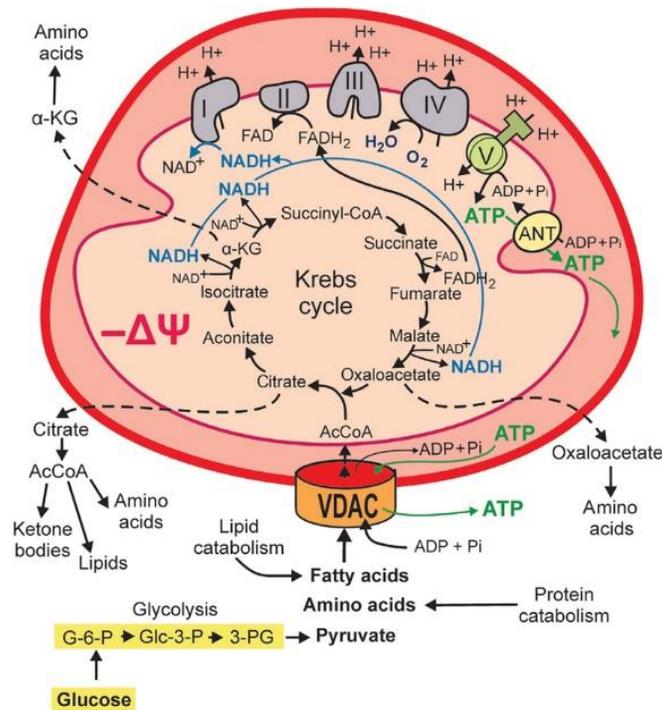


**Figura 4. Los mecanismos y las respuestas inflamatorias de la activación plaquetaria.**

*Durante la inflamación y daño endotelial, el colágeno subendotelial y el factor von Willebrand (vWF) que se expresa en las células endoteliales queda expuesto, el cual promueve la activación plaquetaria a través de sus respectivos receptores GPVI y el complejo GPIIb-IX-V que se encuentran en la membrana plaquetaria. La activación plaquetaria conduce a la liberación de las moléculas contenidas en los gránulos α y densos, como el ADP, que al unirse al receptor P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> de plaquetas circundantes promueve su activación de forma irreversible, al mismo tiempo que la unión del fibrinógeno a estas plaquetas a través del complejo GPIIb/IIIa conduce a la formación de un trombo plaquetario estable. Las plaquetas activadas expresan P-selectina en su superficie, que se une al ligando 1 de glicoproteína de P-selectina (PSGL-1) expresado en la superficie de los neutrófilos, promoviendo así el enrollamiento y la adhesión al endotelio. Adaptado de Wang, Y, 2018. (26)*

### 3.4. Mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos autorreplicantes que evolucionaron a partir de una proteobacteria endocitada por una célula eucariota ancestral a través del proceso de endosimbiosis (27). Estas tienen una serie de características en común con un núcleo, ambas contienen ADN, ambas están rodeadas por una doble membrana plasmática y ambas pueden dividirse durante el ciclo celular. Las mitocondrias albergan procesos energéticos clave como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS, por sus siglas en inglés), los cuales están involucrados en la producción de trifosfato de adenosina (ATP), como se observa en la figura 5. Sin embargo, los estudios han implicado a las mitocondrias en muchos procesos más allá de la producción de energía, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , la regulación de la apoptosis y los mecanismos de respuesta al estrés (28, 29). La salud y la disfunción mitocondrial también parecen estar involucradas en el envejecimiento, así como en las enfermedades neurodegenerativas, ya que la tasa de renovación de las mitocondrias en varias células nucleadas varía de 9 a 24 días, por lo tanto teniendo en cuenta la vida útil de una plaqueta (7 a 10 días), la necesidad de las mitocondrias para la producción de energía y la incapacidad de reponer constantemente las proteínas de las mitocondrias codificadas en el núcleo, la vida útil de las mitocondrias plaquetarias probablemente determina la vida útil de las plaquetas.(28-30)



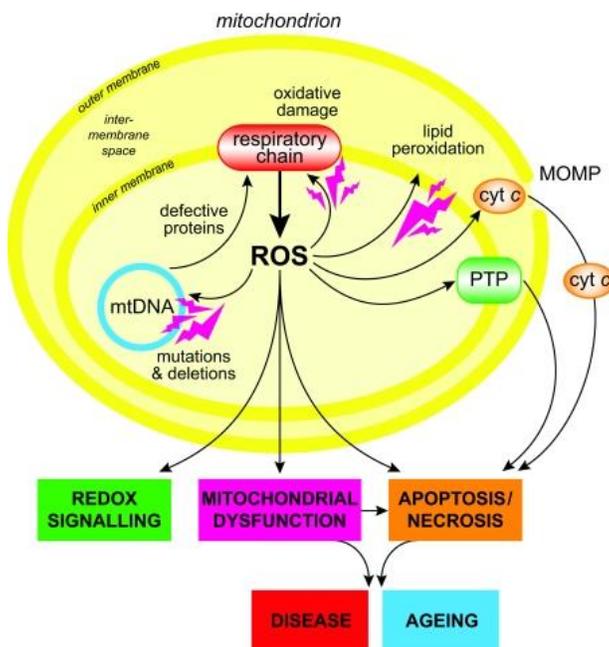
**Figura 5. Metabolismo mitocondrial.**

*El flujo de metabolitos que incluyen ácidos grasos, ciertos aminoácidos, piruvato, ADP y Pi a través de la membrana externa mitocondrial ocurre a través de VDAC. El catabolismo de los sustratos respiratorios en el ciclo de Krebs genera NADH y FADH<sub>2</sub>, que alimentan la cadena de transportadora de electrones (Complejos I-IV) y apoyan la fosforilación oxidativa. El ciclo de Krebs también produce intermediarios metabólicos liberados al citosol para la biosíntesis de proteínas y lípidos. El bombeo de protones por la cadena respiratoria a través de la membrana interna mitocondrial (MIM) genera despolarización de membrana mitocondrial. Los protones que regresan a través de MIM hacia la matriz impulsan la síntesis de ATP desde ADP y Pi Complejo V. El ATP mitocondrial es exportado desde la matriz por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) y liberado al citosol a través de VDAC. Adaptado de Fang, D, 2018. (31)*

### 3.5. Función mitocondrial en plaquetas

Las plaquetas de la sangre circulante contienen pequeñas cantidades de mitocondrias completamente funcionales (32). En un estado basal, tanto la fosforilación oxidativa como la glucólisis son una parte importante en la producción de energía en las plaquetas, ya que la OXPHOS contribuye aproximadamente al 80% de la producción total de adenosina-trifosfato (ATP) en las plaquetas en reposo, lo que sugiere una posible dependencia de las plaquetas sobre el funcionamiento mitocondrial medio (29, 33). La agregación plaquetaria da como resultado un aumento del metabolismo glucolítico, pero se

ha demostrado que se requiere un sistema de OXPHOS robusto para permitir niveles óptimos de funcionalidad plaquetaria (11). Se ha demostrado que estas mitocondrias regulan la función protrombótica de las plaquetas a través no solo de la generación de energía, sino también de la señalización redox y el inicio de la apoptosis (figura 6) (32). Mientras tanto, solo aproximadamente una quinta parte de la función mitocondrial puede ser utilizada por las plaquetas como capacidad de reserva en condiciones de estrés oxidativo, ya que, para mantener la demanda de energía generada por la activación, si esta es inducida por la trombina, se inicia un cambio metabólico que produce el aumento de la glucólisis aeróbica, la oxidación de ácidos grasos y la glutaminólisis (32). Más allá de su regulación de la hemostasia, la función mitocondrial de las plaquetas también se ha utilizado tradicionalmente para identificar y estudiar la disfunción mitocondrial en enfermedades humanas como el Alzheimer, donde se busca identificar defectos en el citocromo C oxidasa (32, 34). También se ha estudiado la función cambiante de las plaquetas en el envejecimiento y está claro que la función mitocondrial de las plaquetas disminuye con el envejecimiento, en parte debido a la pérdida de la actividad del complejo I de la fosforilación (34).



**Figura 6. Descripción general de la producción de ROS mitocondriales.**

*La producción de ROS por parte de las mitocondrias puede provocar daños oxidativos en las proteínas, las membranas y el ADN mitocondriales, lo que puede aumentar la*

*liberación de proteínas del espacio intermembrana, como el citocromo c (cyt c), al citosol mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y, por lo tanto, activar la maquinaria apoptótica de la célula. Además, la producción de ROS conduce a la inducción del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), que hace que la membrana interna sea permeable a moléculas pequeñas, por lo que no es sorprendente que el daño oxidativo mitocondrial contribuya a una amplia gama de patologías. Además, las ROS mitocondriales pueden actuar como una señal redox modulable, afectando reversiblemente la actividad de una variedad de funciones en las mitocondrias, el citosol y el núcleo. Adaptado de Murphy. M, 2009. (35)*

Las plaquetas sanas contienen entre 5 y 8 mitocondrias, la mayoría de las cuales no deben verse comprometidas para que las plaquetas mantengan su función adecuada. En ausencia de control nuclear, la salud de las plaquetas está determinada en gran medida por la salud de sus mitocondrias (36).

En las plaquetas, se ha demostrado la presencia de subunidades de nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, ya que ROS se generan principalmente por la reducción de este complejo enzimático. Según estudios recientes se ha sugerido que las ROS incluyendo anión superóxido, radical hidroxilo (OH·) o peróxido de hidrógeno, producidas por la disfunción mitocondrial participan en la activación plaquetaria y formación de trombos (37-39). Los efectos de las ROS sobre la función plaquetaria son variables y dependen de una variedad de factores, en particular el tipo y la concentración de las ROS y el medio en el que actúan (40). Los niveles elevados de ROS dentro de las plaquetas se asocian como un marcador de apoptosis, debido a que las mitocondrias son reguladores clave de la muerte celular programada por apoptosis, y según estudios recientes se sugiere que en las plaquetas apoptóticas las ROS aumentaron y permanecieron elevados mientras que en plaquetas no apoptóticas estas se hallaban disminuidas, lo que indica que el potencial daño plaquetario está relacionado con la disfunción mitocondrial, además, una alteración bioenergética caracterizada por una actividad deficiente del complejo V de la OXPHOS, que conduce a una disminución de la respiración mitocondrial, hiperpolarización de la membrana, y producción de ROS correlacionándose con la activación plaquetaria (41-43).

Como se ha descrito, las mitocondrias son orgánulos de gran relevancia en una variedad de tejidos importantes altamente dependientes de la energía, incluidos el cerebro, el corazón y los músculos, por lo que juegan un papel central en la vida y muerte celular y

se sabe que la disfunción mitocondrial se ha relacionado en una amplia gama de enfermedades, como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, por lo que la producción excesiva de ROS debido a una lesión oxidativa producto de una disfunción mitocondrial se relaciona con estas enfermedades (40, 43, 44).

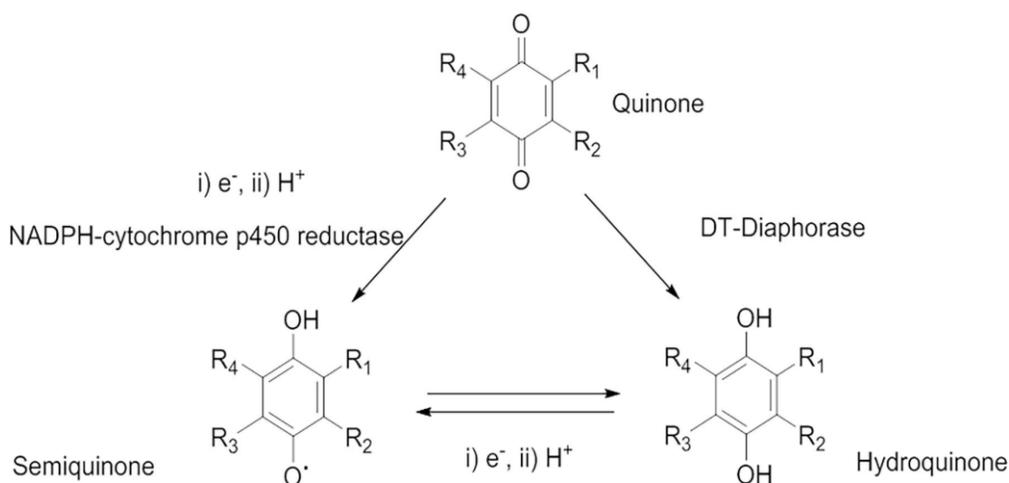
Por tanto, la disfunción mitocondrial plaquetaria podría potencialmente utilizarse como un nuevo mecanismo para la generación de fármacos con actividad antiplaquetaria (36, 45), ya que, las características estructurales y funcionales únicas de las mitocondrias permiten el direccionamiento selectivo de fármacos diseñados para modular la función de este orgánulo para obtener beneficios terapéuticos (43).

### **3.6. Hidroquinonas**

Como se ha visto, las reacciones de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) con moléculas biológicas *in vivo* juegan un papel fisiológico importante en muchas enfermedades, ya que son entidades que contienen uno o más átomos de oxígeno reactivos por lo que son muy inestables y reaccionan rápidamente con otras sustancias del cuerpo, lo que provoca lesiones en las células o los tejidos. Por otro lado, Los antioxidantes actúan previniendo la formación de nuevas especies de radicales libres, convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas y previniendo reacciones en cadena (46).

Las hidroquinonas (HQ) son compuestos fenólicos que se encuentran en la atmósfera principalmente como resultado de la quema de benceno. Se han descrito como compuestos bioactivos que resguardan la función mitocondrial y actúan como antioxidantes, antiinflamatorias y anti-envejecimiento. Recientemente, se ha demostrado que las quinonas son agentes antiagregantes plaquetarios mediante varios mecanismos diferentes. La presencia de la tríada quinona/semiquinona/hidroquinona permite el movimiento de electrones a través de las mitocondrias y los cloroplastos en distintos sistemas biológicos. También los sistemas quinona / hidroquinona están presentes en otras funciones biológicas importantes como el sistema antioxidante y la coagulación (figura 7). Cuando la quinona se reduce a su forma redox de ubiquinol activo, puede proteger a las mitocondrias contra el daño oxidativo, después de lo cual se recicla a su forma activa por la

cadena respiratoria mitocondrial (47-49). Se han demostrado que derivados de la hidroquinona protegen a las mitocondrias de daño oxidativo, pero sólo una pequeña proporción de compuesto administrado externamente es tomado por mitocondrias (47). Es por esto que teniendo en cuenta el uso farmacológico potencial de HQ, es interesante evaluar los efectos de la estas sobre las funciones plaquetarias.(45, 50, 51)



**Figura 7. Representación esquemática de la conversión de quinona en semiquinona e hidroquinona.** Tomado de Fuentes. M, 2018 (45).

Por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, al haber disfunción mitocondrial habría activación plaquetaria debido al aumento de producción de ROS según estudios recientes, por lo que el direccionamiento de las hidroquinonas hacia la mitocondria disfuncional sería un potencial mecanismo terapéutico para disminuir ROS y con eso la activación plaquetaria (52, 53).

### 3.7. Cation Trifenilfosfonio (TPP+)

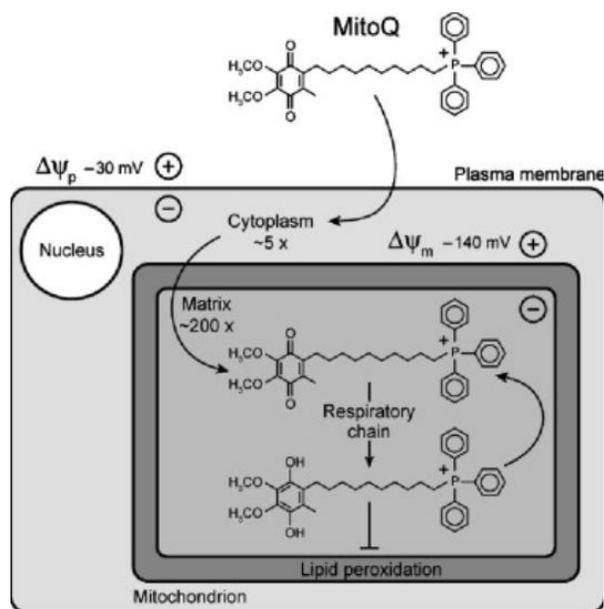
Es ampliamente reconocido que la activación y agregación plaquetaria juega un papel crucial en el inicio y progresión de enfermedades isquémicas, desafortunadamente, todos los agentes antiplaquetarios actualmente disponibles tienen efectos adversos únicos y una eficacia inferior a la ideal. La administración de fármacos a unidades subcelulares específicas es una vía terapéutica prometedora en muchas enfermedades humanas, ya que mejora la eficacia de los compuestos mediante la acumulación del fármaco cerca del objetivo específico y la reducción de las consecuencias deletéreas de su localización

subcelular fuera del objetivo, además, los sistemas de administración dirigidos pueden mejorar ciertas características del fármaco y, por tanto, superar las limitaciones clásicas de la administración de fármacos convencional, tales como baja biodisponibilidad, insolubilidad y resistencia al fármaco (27, 54).

Como el aumento del daño oxidativo mitocondrial es una causa primaria o un factor secundario significativo que conduce al daño celular y la muerte en la mayoría de las enfermedades degenerativas, una terapia para minimizar el daño oxidativo mitocondrial sería útil en una amplia gama de situaciones clínicas (27). Una clase importante de moléculas dirigidas a las mitocondrias son los cationes lipofílicos deslocalizados (DLC, por sus siglas en inglés), donde el TPP<sup>+</sup>, uno de los DLC más comunes. Los cationes lipofílicos aprovechan el potencial de intermembrana ( $\Delta\Psi_m$ ) mitocondrial para facilitar su focalización selectiva y acumulación dentro de la matriz mitocondrial siendo capaces de penetrar eficazmente las membranas mitocondriales debido a su gran superficie hidrofóbica y distribución de carga deslocalizada (44). Una gran parte de los cationes lipofílicos alcanzan concentraciones aproximadamente de 5 a 10 veces mayores en el citoplasma en comparación con el entorno extracelular, y estos cationes, inicialmente adsorbidos en la superficie externa de las mitocondrias, se transportan a través de las membranas externa e interna y se acumulan a un nivel de varios cientos de veces debido al gran potencial de membrana a través de la membrana mitocondrial interna, por lo que la focalización mitocondrial masiva está habilitada por el gradiente electroquímico desde el potencial de la membrana plasmática (-30 a -60 mV) al potencial intermembrana, (-150 a -180 mV), que proporciona una fuerza potente para la focalización selectiva de grandes cationes lipofílicos y su concentración dentro de las mitocondrias, por lo que uno de los cationes lipofílicos más comúnmente utilizados para la administración de fármacos es el TPP<sup>+</sup> que se conjuga con un agente terapéutico mediante un enlazador (por ejemplo, cadena de alquilo), además, estudios han demostrado que la modificación de la hidrofobicidad del sistema conjugado TPP<sup>+</sup>-fármaco alargando la cadena de alquilo entre TPP<sup>+</sup> y el fármaco da como resultado una mejora significativa en la acumulación de fármacos en las mitocondrias (27, 44, 55).

La coenzima Q<sub>10</sub> y las quinonas relacionadas se han utilizado como terapias para disminuir el daño oxidativo mitocondrial, en donde las ubiquinonas administradas por vía

oral pueden ser absorbidas por las mitocondrias, pero solo en un grado limitado, por lo que una forma de superar esto es apuntar a la ubiquinona a las mitocondrias mediante la conjugación con el catión TPP<sup>+</sup>, de manera tal que este procedimiento conduce a la acumulación de la molécula MitoQ, el cual es un derivado de ubiquinona unido al catión TPP<sup>+</sup> por una cadena alifática de 10 carbonos, en la célula, impulsada por el potencial de membrana plasmática y luego se acumula más en las mitocondrias (Figura 8), donde estudios informaron que MitoQ protegía selectivamente las mitocondrias contra la isquemia cardíaca / lesión por reperusión en ratas (11, 12, 29, 47).



### Figura 8. Acumulación de MitoQ en células y mitocondrias.

*MitoQ primero pasa a través de la membrana plasmática y se acumula en el citosol impulsado por el potencial de la membrana plasmática ( $\Delta\Psi_p$ ). A partir de ahí, MitoQ se acumula varios cientos de veces en las mitocondrias impulsadas por el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). MitoQ luego se reduce a la forma de ubiquinol antioxidante activo por el complejo II en la cadena respiratoria mitocondrial. La interacción con ROS produce la ubiquinona oxidada, forma que posteriormente puede ser reducida nuevamente por la cadena respiratoria. En las mitocondrias, MitoQ se adsorberá principalmente en la superficie interna de la membrana interna mitocondrial con el resto antioxidante ubicado dentro de la bicapa hidrófoba. Adaptado de Cochemé, H, 2007. (47)*

En particular, la versión dirigida de ubiquinol (MitoQ) se ha utilizado más ampliamente, ya que, al ser absorbido rápidamente por mitocondrias se reduce al antioxidante ubiquinol activo por el complejo II en la cadena respiratoria. MitoQ no puede restaurar la respiración en mitocondrias que carecen de coenzima Q porque la forma

reducida de MitoQ es poco oxidada por el complejo III; en consecuencia, es probable que todos los efectos de MitoQ se deban a la acumulación de la forma antioxidante ubiquinol, además, cuando la forma ubiquinol de MitoQ actúa como antioxidante, se oxida a la forma ubiquinona que luego se reduce rápidamente por el complejo II, restaurando la eficacia antioxidante, por lo tanto, MitoQ parece cumplir la mayoría de los requisitos, en mitocondrias aisladas, de un antioxidante dirigido a las mitocondrias (56, 57).

Las características que hacen a los cationes lipofílicos efectivos para administrar ubiquinonas a las mitocondrias es que pueden pasar directamente a través de las bicapas de fosfolípidos sin requerir un mecanismo de captación específico, y se acumulan sustancialmente dentro de las mitocondrias debido al potencial de membrana, debido a que el perfil de energía para el movimiento de un catión lipofílico a través de una bicapa de fosfolípidos se obtiene combinando el efecto hidrofóbico atractivo con las fuerzas electrostáticas repulsivas, llevando a la unión de los cationes TPP<sup>+</sup> en la superficie de la membrana mitocondrial donde se genera un pozo de energía potencial que está en el lado hidrofóbico de la interfaz lípido/agua de la membrana, aproximadamente al nivel de los carbonilos y carbonos C2 de los grupos acilo grasos de los fosfolípidos (47).

La modificación de moléculas a base de TPP<sup>+</sup> que facilitan el direccionamiento de las mitocondrias posee potentes efectos biológicos, los cuales han sido expuestos en diferentes investigaciones donde las moléculas pequeñas que contienen TPP<sup>+</sup> son efectivas. Además, tiene una serie de implicaciones importantes para la interacción de MitoQ con las mitocondrias, ya que, la concentración en estado estacionario de cationes lipofílicos en el núcleo hidrofóbico de la membrana es insignificante, aunque se muevan fácilmente a través de las membranas, además, estos compuestos tienen una fuerte tendencia a adsorberse en la superficie de las bicapas de fosfolípidos en respuesta al pozo local de energía potencial, por lo tanto las ventajas del direccionamiento mitocondrial basado en TPP<sup>+</sup> sobre otros enfoques para el suministro mitocondrial de moléculas pequeñas incluyen la estabilidad del TPP<sup>+</sup> en sistemas biológicos, ya que posee una combinación de propiedades lipofílicas e hidrofílicas, una baja reactividad química hacia componentes celulares, y la falta de absorción de luz o fluorescencia en la región espectral visible o infrarroja cercana (NIR) les da la capacidad de atravesar fácilmente todas las membranas (12, 47, 57).

Pese a esto, no está claro cómo la hidrofobicidad afecta la tasa y el alcance de su captación en las mitocondrias dentro de las células, lo que dificulta la interpretación de los experimentos porque su concentración intracelular en diferentes compartimentos es incierta (58). Sin embargo, a pesar de su eficaz prevención in vitro del daño mitocondrial, los cationes lipofílicos adolecen de un gran inconveniente. La acumulación de carga en la matriz da como resultado la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que puede explicar la toxicidad de estos compuestos en concentraciones  $> 10 \mu\text{M}$  (29).

#### **4. HIPÓTESIS**

La presente memoria tiene por hipótesis lo siguiente:

El compuesto D4 inhibe la función mitocondrial plaquetaria.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

- 5.1.1. Evaluar el efecto inhibitorio del compuesto D4 sobre la activación y función mitocondrial plaquetaria.

### **5.2. Objetivos específicos**

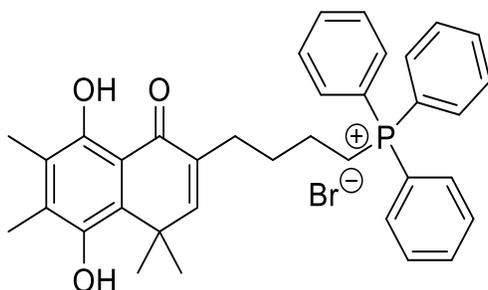
- 5.2.1. Estudiar el efecto del compuesto D4 sobre el potencial de membrana mitocondrial.
- 5.2.2. Determinar el efecto del compuesto D4 sobre la producción especies reactivas del oxígeno.
- 5.2.3. Evaluar el efecto del compuesto D4 sobre marcadores de activación plaquetaria.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizará basándose en métodos *in vitro*, realizándose el análisis por triplicado de cada muestra. El procedimiento experimental se realizará en los Laboratorios del Centro de Investigación en Trombosis (CIT) de la Universidad de Talca. El protocolo fue aprobado por el comité de ética científica N°5-2018.

### 6.1. Compuesto D4

Estructura y peso molecular del compuesto D4 el cual es estudiado durante la investigación.



Peso molecular: 629,57 g/mol

### 6.2. Preparación de buffer Tyrodes sin calcio

Para preparar el buffer Tyrodes sin calcio se pesaron los gramos de los reactivos indicados en la tabla 1 en un vaso precipitado. Luego se añadió el Buffer Hepes, se aforó a 250 ml con agua destilada y se ajustó a pH 7,4.

Tabla 1. reactivos de buffer Tyrodes sin calcio.

Reactivo	PM	Concentración final (mM)	Volumen agua dest. Final (ml)	mmol/50 ml	Gramos	ml
NaCl	58,4	134	250	6,7	1,956	-
NaHCO <sub>3</sub>	84	12	250	0,6	0,252	-
KCl	74,55	2,9	250	0,145	0,054	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141,9	0,34	250	0,017	0,012	-
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	203,21	1	250	0,05	0,051	-
Glucosa	180,15	5	250	0,25	0,225	-
Buffer	-	10	250	0,5	-	2,5

<b>Hepes</b>						
--------------	--	--	--	--	--	--

\*Los gramos/ml de cada reactivo están calculados para un volumen final de 250 mL de agua destilada.

### **6.3. Preparación de plaquetas humanas**

Las plaquetas se obtuvieron de la sangre humana de voluntarios sanos con consentimiento informado por escrito. Brevemente, se extrajo sangre completa con ácido-citrato-dextrosa (ACD) 4:1 v/v y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min x 240 g (baja aceleración y desaceleración) para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). A continuación, el PRP se centrifugó a temperatura ambiente durante 8 min x 800 g y el sedimento de plaquetas se resuspendió en tampón de Tyrode sin calcio:ACD (5:1 v/v) y se lavó por centrifugación a temperatura ambiente durante 8 min x 800 g, siendo finalmente resuspendido en tampón de Tyrodes sin calcio. Las plaquetas se contaron con un analizador de hematología (contador hematológico Mindray BC-3000 Plus, Japón) para ser ajustadas al recuento deseado y se utilizaron dentro de las 3 h de la extracción de sangre (59).

### **6.4. Ensayo de citotoxicidad LDH**

Para evaluar la citotoxicidad del compuesto en estudio, se utilizó LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical). Las plaquetas lavadas (protocolo 6.3) fueron ajustadas a un recuento de 200.000 plaquetas/ $\mu$ L aproximadamente y se añadió  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) al pool de plaquetas. Esta suspensión fue dividida en distintas condiciones de estudio: Control con DMSO 0,2%; Control positivo citotoxicidad (Tritón 10%); Control reactivo; Compuesto en estudio (200  $\mu$ M). Las condiciones se incubaron por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron por 8 minutos a 3000 rpm a 4°C. Se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante y se sembraron en microplaca de 96 pocillos. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de reacción de LDH a cada condición. Finalmente, la microplaca se incubó durante 30 minutos a 37 °C en agitación orbital constante. La lectura se realizó a 490 nm en Microplate Reader Thermo Scientific Multiskan Go.

### **6.5. Marcador de activación de P-selectina**

Para realizar el ensayo de P-selectina se utilizaron plaquetas lavadas (protocolo 6.3) las cuales fueron ajustadas a un recuento de 250.000 – 300.000 plaquetas/ $\mu$ L

aproximadamente. Este pool de plaquetas se dividió en distintas condiciones de estudio: se tomaron 490  $\mu\text{L}$  de plaquetas y se le agregaron 1  $\mu\text{L}$  DMSO y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) siendo estas plaquetas basales o control (condición 1). A 485  $\mu\text{L}$  de plaquetas se le agregaron 1  $\mu\text{L}$  DMSO y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM), siendo estas las plaquetas activadas (condición 2). A 485  $\mu\text{L}$  de plaquetas se le agregaron 1  $\mu\text{L}$  del compuesto en estudio en la concentración deseada y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) (condición 3). Se preincubaron las tres condiciones de estudio por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se inició la reacción con el agonista en las condiciones 2 y 3 utilizando 5  $\mu\text{L}$  Convulxin (CVX) (5 ng/ml). Se incubaron todas las condiciones de estudio por 5 minutos a 37°C. Se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de cada condición de estudio y se marcó en oscuridad con 1  $\mu\text{L}$  de anticuerpo CD62 PE: P-selectina. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se diluyó el tubo marcado con 200  $\mu\text{L}$  de TAF sin calcio y se leyó en citómetro de flujo.

#### **6.6. Potencial de membrana mitocondrial**

El potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) se evaluó utilizando el tinte permeante de la célula tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM). Las plaquetas lavadas se cargaron con TMRM (100 nM) y luego se incubaron con DMSO al 0,2% (Control), el compuesto y Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (1  $\mu\text{M}$ ) a 37 °C durante 20 min. A continuación, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo Accuri C6 (BD, Biosciences, EE. UU.) (59).

#### **6.7. Niveles de especies reactivas del oxígeno**

El nivel de ROS intraplaquetario se determinó mediante citometría de flujo, utilizando la sonda Dihydroethidium (DHE). Plaquetas lavadas (protocolo 6.3) fueron ajustadas a un recuento de 50.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$  aproximadamente. Se añadió  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) al pool de plaquetas y posteriormente se marcó en oscuridad con la sonda DHE (10  $\mu\text{M}$ ). Esta suspensión fue dividida en distintas condiciones de estudio: Control con DMSO 0,2%; Control positivo ROS intracelular (Antimicina A 10  $\mu\text{M}$ ); y compuesto en estudio (1; 5; 10  $\mu\text{M}$ ). Las condiciones fueron incubadas durante 30 minutos a 37° C en oscuridad. A continuación, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo Accuri C6 (BD, Biosciences, EE. UU.)

## **6.8. Análisis estadístico**

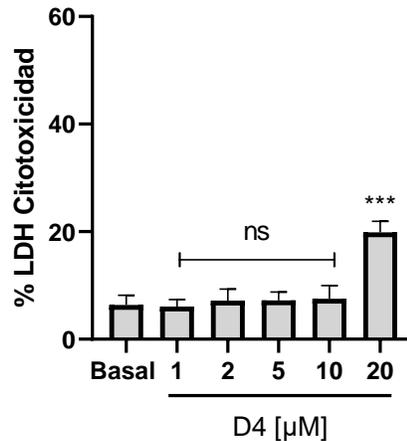
El análisis estadístico utilizado fue ANOVA (Tukey test) con un  $p < 0.05$  para considerar resultados estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Se utilizó el Kit de ensayo de citotoxicidad de alta sensibilidad (Cayman), mediante colorimetría. La condición basal corresponde a las plaquetas con el vehículo (DMSO 0,2%); se utilizó Tritón 10% como control de máxima citotoxicidad; El compuesto D4 fue analizado en las concentraciones 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . El análisis estadístico utilizado fue ANOVA (Tukey test). Basal vs D4 20  $\mu\text{M}$  \*\*\* $p < 0.0001$ .  $n = 6$ .

Como se muestra en la figura 9, el compuesto D4 a las concentraciones 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  no presento cambios estadísticos significativos con relación a la citotoxicidad, mientras que a la concentración de 20  $\mu\text{M}$  el compuesto aumentó estadísticamente la citotoxicidad en plaquetas dando paso a los siguientes estudios.



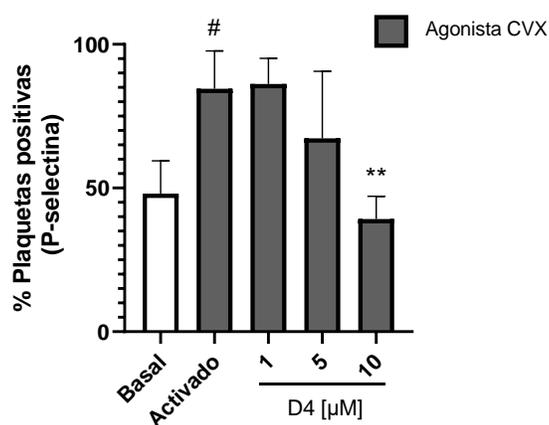
**Figura 9. Efecto del compuesto D4 sobre la liberación de LDH (viabilidad celular).**

### 7.2. Marcador de activación: P-selectina

Se utilizó el anticuerpo anti-CD62 PE, mediante citometría de flujo. La condición basal (sin agonista) corresponde a las plaquetas con el vehículo (DMSO 0,2%); se utilizó el agonista CVX 5 ng/ml para activar a las plaquetas; El compuesto D4 fue analizado en las concentraciones 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Las plaquetas fueron identificadas a partir de la población

CD61 positivo. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA (Tukey test). Basal vs Activado #p=0.017; Activado vs D4 10  $\mu$ M \*\*p=0.003. n = 4.

Como se observa en la figura 10, al activar las plaquetas con el agonista CVX se produce un aumento significativo en la expresión de P-selectina, al comparar con las plaquetas en estado basal. Cuando las plaquetas fueron preincubadas con distintas concentraciones del compuesto D4 y luego activadas con CVX, se observa que el compuesto D4 a las concentraciones 1 y 5  $\mu$ M no presentó cambios estadísticamente significativos en la expresión de P-selectina, mientras que a la concentración de 10  $\mu$ M disminuyó significativamente la expresión de P-selectina.

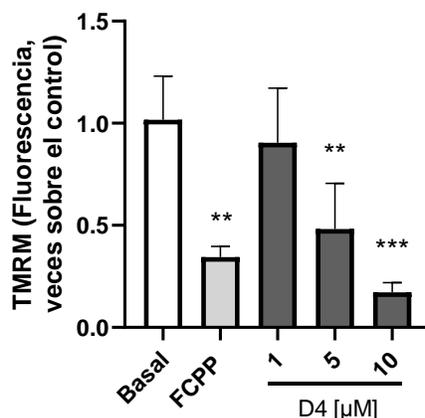


**Figura 10. Efecto del compuesto D4 sobre la expresión de P-selectina.**

### 7.3. Potencial de membrana mitocondrial

Se utilizó la sonda TMRM, mediante citometría de flujo. La condición basal corresponde a las plaquetas con el vehículo (DMSO 0,2%); se utilizó FCCP 1  $\mu$ M como control de disminución del potencial de membrana mitocondrial; El compuesto D4 fue analizado en las concentraciones 1, 5 y 10  $\mu$ M. Las plaquetas fueron identificadas a partir de la población CD61 positivo. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA (Tukey test). Basal vs FCCP \*\*p=0.001; Basal vs D4 5  $\mu$ M \*\*p=0.0076; Basal vs D4 10  $\mu$ M \*\*\*p<0.0001. n = 4.

Como se ve en la figura 11, el control desacoplante mitocondrial FCCP disminuyo significativamente el potencial de membrana mitocondrial plaquetario respecto a la condición basal de las plaquetas. En el caso del compuesto D4 a las concentraciones 5 y 10  $\mu\text{M}$  se observa una disminución estadísticamente significativa en el potencial de membrana mitocondrial plaquetario, mientras que a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  no hubo diferencias significativas.

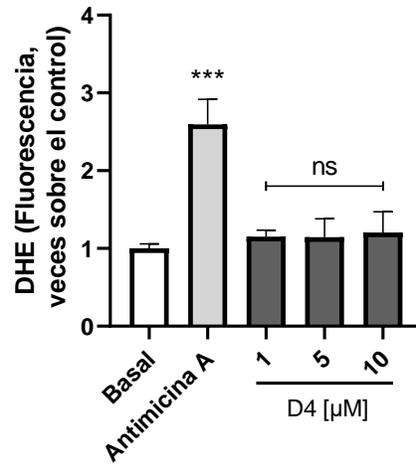


**Figura 11. Efecto del compuesto D4 sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ).**

#### 7.4. ROS intracelular

Se utilizó la sonda DHE, mediante citometría de flujo. La condición basal corresponde a las plaquetas con el vehículo (DMSO 0,2%); se utilizó Antimicina A 10  $\mu\text{M}$  como control positivo de aumento de ROS; El compuesto D4 fue analizado en las concentraciones 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Las plaquetas fueron identificadas a partir de la población CD61 positivo. El análisis estadístico utilizado fue ANOVA (Tukey test). Basal vs Antimicina A \*\*\* $p < 0.0001$ . ns: No significativo. n = 4

En la figura 12, se puede observar que el control inductor de ROS Antimicina A 10  $\mu\text{M}$  aumentó significativamente los niveles de ROS intracelular en las plaquetas. Para el compuesto D4 a las concentraciones 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  no presentan diferencias significativas en los niveles de ROS al comparar con las plaquetas en estado basal.



**Figura 12. Efecto del compuesto D4 sobre los niveles de ROS intracelular.**

## 8. DISCUSIÓN

Las ECV siguen siendo la principal causa de muerte en Europa, donde más del 80% de la mortalidad y la discapacidad causada por esta enfermedad se produce en los países en desarrollo, en el cual principalmente está asociado a factores de riesgo modificables, como los hábitos de vida y los no modificables, como la edad y el sexo, siendo estos últimos los que más afectan a personas de 65 años o más, ya que presentan un deterioro funcional del organismo (60, 61). Por tal motivo es necesario encontrar nuevos medicamentos antiagregantes que ayuden a prevenir eventos cardiovasculares, considerando que la función plaquetaria normal se altera en condiciones patológicas y se asocia con un mayor riesgo de trombosis (10), siendo el horizonte de esta investigación.

Por otro lado, la activación plaquetaria estimulada por una amplia variedad de agonistas está regulada por ROS, donde las mitocondrias son la fuente principal de la generación de ROS y ejercen un papel central para mejorar dicha activación (10). Sin embargo, el exceso de ROS intracelular genera un daño oxidativo mitocondrial, promoviendo la patogénesis de diversas enfermedades degenerativas, por lo que se produce una sobre activación plaquetaria promoviendo trombosis; pero se ha demostrado que compuestos como quinonas o hidroquinonas protegen a las mitocondrias del daño oxidativo inhibiendo la activación plaquetaria, pero al ser administrada de manera externa solo una pequeña proporción del compuesto es absorbida por las mitocondrias en condiciones normales (10, 47, 62).

Ahora bien, como se ha descrito en esta memoria, el daño oxidativo mitocondrial puede ser una causa de la activación plaquetaria, más aún cuando se sabe que las plaquetas carecen de núcleo y su única maquinaria de regulación es la mitocondria; además, como es bien sabido que el catión lipofílico de TPP<sup>+</sup> puede ser absorbido por las células a través de la membrana plasmática, por lo que la asociación de este compuesto con una hidroquinona garantizara una mayor concentración del compuesto a nivel mitocondrial, y de esta manera se puede estimar que tan beneficioso es el uso de hidroquinonas para disminuir la activación plaquetaria, siendo el target de estas la mitocondria.

El compuesto D4, que es el que se estudia en esta investigación, es una hidroquinona que esta conjugado con un catión de TTP<sup>+</sup>, por lo que está dirigido a la mitocondria plaquetaria, y se estudia que efecto tiene sobre esta y si disminuye la activación plaquetaria. En estudios previos, se determinó que este compuesto tiene actividad antiagregante, por lo que ahora fue necesario estudiar su efecto sobre la viabilidad celular para determinar las concentraciones sin efecto citotóxico sobre las plaquetas. Para estimar esto se realizó un ensayo de liberación de LDH donde se utilizó el kit de ensayo de citotoxicidad de alta sensibilidad Cayman. La condición basal corresponde a DMSO 0,2% y se utiliza Tritón 10% para generar la citotoxicidad máxima correspondiente a la liberación del 100% de LDH. Finalmente, las plaquetas con concentraciones del compuesto a 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , donde mediante colorimetría se mide la liberación de LDH que se interpreta como que tan citotóxico es el compuesto, considerando que este método se centra en la cuantificación de las enzimas liberadas, en este caso LDH, por las células dañadas (63). A las concentraciones de 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  no se afecta la integridad de las plaquetas, debido a que el porcentaje de citotoxicidad no presenta diferencias significativas con la condición basal. De manera tal que a estas concentraciones el compuesto D4 no es citotóxico y da la certeza que no habrá destrucción celular al utilizarlo en los siguientes ensayos como se observa en la figura 9. El compuesto D4 20  $\mu\text{M}$  produjo un aumento significativo de la citotoxicidad en plaquetas lavadas, descartándose su utilización para los siguientes ensayos. Según un estudio donde se utilizó la mitoquinona (MitoQ) conjugado con el catión TPP<sup>+</sup> para evaluar sus efectos en la actividad plaquetaria mediante su acumulación en la mitocondria en plaquetas humanas *in vitro*, se evaluaron tres concentraciones distintas del compuesto, y para determinar su citotoxicidad e inducción de apoptosis los autores midieron los niveles de LDH y expresión de fosfatidilserina (PS), donde los autores obtienen que a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  hay un aumento significativo de los niveles de LDH, determinando que a esta concentración el compuesto es citotóxico, donde además presenta un aumento de expresión de PS en la membrana plaquetaria, lo cual indica que hay inducción de apoptosis; mientras que por otro lado, en las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$  no hay cambios significativos sobre la citotoxicidad y la inducción de apoptosis, por lo que ellos concluyen que se puede evaluar el efecto antiagregante de MitoQ con estas concentraciones (63). Ahora bien, en otro estudio donde se evaluó la capacidad

antiagregante de derivados de lawsone que es un compuesto natural de la familia de las naftoquinonas, los autores realizaron estudios de citotoxicidad mediante liberación de LDH en plaquetas *in vitro* previo a la realización de estudios de agregación plaquetaria para determinar las concentraciones a las que se puede trabajar estos compuestos derivados, donde ellos obtuvieron que la detección de citotoxicidad por fuga de LDH en 6 de los 8 compuestos derivados a la concentración más alta probada (100  $\mu\text{M}$ ) no ejercen citotoxicidad en las plaquetas mientras que los otros dos derivados si presentaron cambios significativos en la liberación de LDH, por lo que los autores describen que pese a que las quinonas pueden tener actividad antiagregante, a ciertas concentraciones pueden presentar un grado de citotoxicidad (64).

Como marcador de activación plaquetaria se utilizó la expresión de P-selectina, la cual es una glicoproteína que se expresa en la membrana luego que hay activación de las plaquetas (15). La condición basal corresponde a plaquetas solo con DMSO, mientras que para la activación de las plaquetas se utilizó como agonista el CVX 5 ng/ml, el cual es un agonista que actúa sobre el receptor GPVI, que es el principal receptor de señalización del colágeno (65). El agonista activa a las plaquetas, generando la secreción de gránulos, de tal manera que hay un aumento en la expresión de P-selectina en la membrana plaquetaria, cuantificada por la emisión de fluorescencia en un citómetro de flujo mediante el marcaje con anti-CD68. De esta manera, se evalúa si a las distintas concentraciones del compuesto hay disminución de la expresión de P-selectina lo que se traduce en una inhibición significativa de la activación. Como se observa en la figura 10, a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  del compuesto en estudio hubo disminución de la expresión de P-selectina, por lo tanto, a esta concentración hay inhibición de la activación plaquetaria, mientras que a las demás concentraciones no hubo cambios estadísticamente significativos. En un estudio realizado en 2020 se evaluaron una serie de compuestos de orto-carbonil hidroquinonas en plaquetas humanas *in vitro*, donde luego de la realización de pruebas de agregación y citotoxicidad se determinó que dos de los compuestos estudiados no eran citotóxicos para las plaquetas y generaban una inhibición de la agregación plaquetaria cuando esta era inducida por los agonistas TRAP-6 y colágeno, por lo que los autores decidieron evaluar la actividad antiplaquetaria de estos dos compuestos, denominados compuestos 3 y 8, frente a la activación con TRAP-6 y colágeno mediante la medición de expresión de P-selectina en la

membrana plaquetaria. Los autores describen que cuando hay activación plaquetaria con trombina y colágeno hay cambios conformacionales que conducen a la translocación a la superficie plaquetaria de la P-selectina, y según los resultados obtenidos por ellos cuando hay activación inducida por colágeno y TRAP-6 (el cual es un análogo de la trombina) hay una disminución significativa de la expresión de P-selectina dada por los compuestos 3 y 8 (59). En otro estudio donde se evaluó la actividad antiplaquetaria de una serie de compuestos de acilhidroquinonas y acilclorohidroquinonas en plaquetas humanas *in vitro*, los autores luego de realizar ensayos de citotoxicidad y activación plaquetaria determinaron que el compuesto 38 era el que presentaba una mejor actividad antiagregante, por lo que decidieron estudiar la expresión de P-selectina cuando las plaquetas eran estimuladas con TRAP-6 y CVX frente a las concentraciones de 2 y 20  $\mu\text{M}$  del compuesto 38, donde obtuvieron que a la concentración de 20  $\mu\text{M}$  del compuesto 38 había inhibición de la expresión de P-selectina tanto en la activación con TRAP-6 como con CVX, por lo que, en conjunto con otros resultados obtenidos, los autores determinaron que este compuesto disminuyó un objetivo central en la activación plaquetaria humana como la función mitocondrial y, por lo tanto, ejerció una potente inhibición no selectiva de la agregación plaquetaria (18).

Para identificar el posible mecanismo de acción del compuesto D4, se realizaron técnicas de función mitocondrial, como es el potencial de membrana mitocondrial, mediante citometría de flujo con la sonda tetrametilrodamina (TMRM), la cual es un tinte fluorescente que mide la transición de la permeabilidad mitocondrial y la despolarización de la membrana mitocondrial (66), ya que es absorbida a nivel del espacio intermembrana de la mitocondria (67), por lo que cuando el potencial de membrana disminuye, esta se acumula en menor grado y se genera una menor señal de fluorescencia. Ahora bien, como control de disminución de potencial de membrana mitocondrial, se utiliza el desacoplante FCCP, que es un desacoplador clásico de la fosforilación oxidativa y se utiliza ampliamente para inducir disfunción mitocondrial a través de la interrupción del potencial de membrana mitocondrial, disminuyéndolo (68), por tal motivo, como se observa en la figura 11, el potencial de membrana mitocondrial disminuye significativamente con FCCP. Dentro de las concentraciones evaluadas del compuesto D4, la concentración 1  $\mu\text{M}$  no presentó disminución del potencial de membrana con respecto al control basal, mientras que a las

concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  del compuesto D4 si hay una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial, como se observa en la figura 8, por lo que según nuestros resultados se podría establecer que uno de los mecanismos de acción del compuesto D4 para disminuir la activación plaquetaria sería disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial, aunque se necesitan estudios adicionales para determinar el mecanismo exacto de acción. En el mismo estudio descrito anteriormente donde se evaluaron compuestos de orto-carbonil hidroquinonas en plaquetas humanas *in vitro*, los autores estudiaron los cambios que producían los compuestos 3 y 8 frente a la activación con colágeno en la bioenergética mitocondrial plaquetaria luego de establecer que tenían acción antiplaquetaria, donde según sus resultados describen que el compuesto 3 no produjo cambios en el potencial de membrana mitocondrial, mientras que el compuesto 8 indujo una disminución del potencial y aumentó la producción de ROS a altas concentraciones, por lo que los autores describen que la producción de ROS puede generar fugas en el gradiente electroquímico cambiando el potencial de membrana mitocondrial siendo este un posible mecanismo de acción antiplaquetaria (59). En el mismo estudio descrito anteriormente donde se evaluó la actividad antiplaquetaria de una serie de compuestos de acilhidroquinonas y acilclorohidroquinonas en plaquetas humanas *in vitro*, los autores luego de determinar que el compuesto 38 era el que presentaba una mejor actividad antiagregante, y luego de estudiar la expresión de P-selectina cuando las plaquetas eran estimuladas con TRAP-6 y CVX frente a las concentraciones de 2 y 20  $\mu\text{M}$  del compuesto 38, evaluaron los cambios que el compuesto 38 generaba en la membrana mitocondrial plaquetaria, donde obtuvieron que a la concentración de 20  $\mu\text{M}$  del compuesto 38 había disminución del potencial de membrana mitocondrial en relación al control basal y el control positivo con FCCP, por lo que, en conjunto con los demás resultados obtenidos, los autores determinaron que este compuesto produce una disminución en la activación plaquetaria mediante cambios en la función mitocondrial (18).

Ahora bien, otro de los parámetros mitocondriales que se evaluaron con el compuesto D4, fue la producción de ROS intracelular, donde a través de citometría de flujo se midió la fluorescencia emitida de la sonda DHE, la cual marca las especies reactivas de oxígeno, específicamente el superóxido y peróxido de hidrógeno (69). El control positivo de la técnica es el uso de antimicina A 10  $\mu\text{M}$ , ya que esta inhibe la actividad de la cadena

transportadora de electrones a nivel de citocromo C reductasa en el complejo III, aumentando los niveles de ROS intracelular (70). Como se observa en la figura 12, el compuesto D4 no produjo cambios significativos en los niveles de ROS intracelular a concentraciones de 1, 5 y 10  $\mu$ M. Existe evidencia que algunas quinonas, como MitoQ, si producen disminución de los niveles de ROS intraplaquetario, ya que, en un estudio realizado en plaquetas *ex vivo* de ratones con deficiencia del gen IEX-1 donde hubo un aumento en la producción de ROS inducida por radiación, los autores describen que después del tratamiento con MitoQ, hubo una reversión efectiva del trastorno tanto en megacariocitos como en plaquetas, por lo que concluyen que MitoQ reduce la producción de ROS intracelular dentro de estas células (71). Además, en otro estudio donde se estudiaron plaquetas *in vitro*, se utilizó la MitoQ conjugado con el catión TPP<sup>+</sup> para evaluar sus efectos en la actividad plaquetaria mediante su acumulación en la mitocondria, los autores describen que la activación plaquetaria inducida por colágeno se asocia con la generación de ROS, y que la exposición de plaquetas humanas a MitoQ disminuye significativamente la producción de ROS mitocondrial (63).

## 9. CONCLUSIÓN

El compuesto D4 inhibe la activación plaquetaria demostrado por resultados de agregaciones previos y por la disminución de P-selectina; donde, además, tiene efecto sobre la función mitocondrial, ya que disminuye el potencial de membrana mitocondrial plaquetario, pero no tiene efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.

Como el compuesto D4 está dirigido específicamente hacia la mitocondria, se puede concluir que este organelo es una importante diana para inhibir la activación de las plaquetas, lo cual ha sido descrito en otros estudios similares mencionados en la discusión.

Se requieren más ensayos para dilucidar el mecanismo de acción del compuesto D4, como medir niveles de ATP, evaluar su efecto sobre los complejos mitocondriales y consumo de oxígeno; aunque es importante destacar que el compuesto D4 disminuye el potencial de membrana mitocondrial y no afecta los niveles de ROS, lo cual denota que el efecto antiplaquetario no está asociado a mecanismos antioxidantes que disminuyen ROS.

Además, se puede concluir que el compuesto D4 no presenta citotoxicidad sobre plaquetas lavadas en concentraciones decrecientes del 10  $\mu$ M.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Mathieu P, Pibarot P, Després J-P. Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis. *Vascular health and risk management*. 2006;2(3):285-302.
2. Nagareddy P, Smyth SS. Inflammation and thrombosis in cardiovascular disease. *Current opinion in hematology*. 2013;20(5):457-63.
3. Sabouret P, Taiel-Sartral M. New antiplatelet agents in the treatment of acute coronary syndromes. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2014;107(3):178-87.
4. Tello-Montoliu A, Jover E, Rivera J, Valdés M, Angiolillo DJ, Marín F. New perspectives in antiplatelet therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19(3):406-27.
5. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13:2-7.
6. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood reviews*. 2015;29(3):153-62.
7. Zufferey A ;Fontana P ;Reny JL ;Nolli S ;Sanchez JC. Platelet proteomics. *Mass spectrometry reviews*. 2012;31(2).
8. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling During Platelet Adhesion and Activation. 2010.
9. Rubak P ;Nissen PH ;Kristensen SD ;Hvas AM. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets*. 2016;27(1).
10. Fuentes E ;Araya-Maturana R ;Urrea FA. Regulation of mitochondrial function as a promising target in platelet activation-related diseases. *Free radical biology & medicine*. 2019;136.
11. Kramer PA ;Ravi S ;Chacko B ;Johnson MS ;Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox biology*. 2014;2.
12. Zielonka J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, Cheng G, et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev*. 2017;117(15):10043-120.

13. Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Current cardiology reviews*. 2018;14(3):153-63.
14. Fuentes E ;Palomo I. Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. *Life sciences*. 2016;148.
15. George R ;Bhatt A ;Narayani J ;Thulaseedharan JV ;Sivadasanpillai H ;Tharakan JA. Enhanced P-selectin expression on platelet-a marker of platelet activation, in young patients with angiographically proven coronary artery disease. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;419(1-2).
16. Sepúlveda C ;Palomo I ;Fuentes E. Mechanisms of endothelial dysfunction during aging: Predisposition to thrombosis. *Mechanisms of ageing and development*. 2017;164.
17. Paz Ocaranza M ;Riquelme JA ;García L ;Jalil JE, et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*. 2020;17(2).
18. Méndez D ;Donoso-Bustamante V ;Pablo Millas-Vargas J ;Pessoa-Mahana H ;Araya-Maturana R ;Fuentes E. Synthesis and pharmacological evaluation of acylhydroquinone derivatives as potent antiplatelet agents. *Biochemical pharmacology*. 2021;183.
19. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews*. 2017;36(2):195-8.
20. Smyth SS ;McEver RP ;Weyrich AS ;Morrell CN, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(11).
21. Wagner DD ;Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008;111(11).
22. Borsig L. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2008;8(8):1247-55.
23. Rand ML ;Leung R ;Packham MA. Platelet function assays. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2003;28(3).
24. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(03):191-204.

25. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology* (Bethesda, Md). 2017;32(2):162-77.
26. Wang Y, Ouyang Y, Liu B, Ma X, Ding R. Platelet activation and antiplatelet therapy in sepsis: A narrative review. *Thrombosis Research*. 2018;166:28-36.
27. Apostolova N ;Victor VM. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;22(8).
28. Baaten CCFMJ, Moenen FCJI, Henskens YMC, Swieringa F, Wetzels RJH, van Oerle R, et al. Impaired mitochondrial activity explains platelet dysfunction in thrombocytopenic cancer patients undergoing chemotherapy. *Haematologica*. 2018;103(9):1557-67.
29. Frantz MC ;Wipf P. Mitochondria as a target in treatment. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2010;51(5).
30. Kim H-E, Grant AR, Simic MS, Kohnz RA, Nomura DK, Durieux J, et al. Lipid Biosynthesis Coordinates a Mitochondrial-to-Cytosolic Stress Response. *Cell*. 2016;166(6):1539-52.e16.
31. Fang D ;Maldonado EN. VDAC Regulation: A Mitochondrial Target to Stop Cell Proliferation. *Advances in cancer research*. 2018;138.
32. Zharikov S ;Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(1).
33. Shrivastava M ;Vivekanandhan S ;Pati U ;Behari M ;Das TK. Mitochondrial perturbation and execution of apoptosis in platelet mitochondria of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *The International journal of neuroscience*. 2011;121(3).
34. Chacko BK ;Kramer PA ;Ravi S ;Johnson MS, et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2013;93(6).
35. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009;417(1).
36. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2019;6:153-.

37. Begonja AJ ;Gambaryan S ;Geiger J ;Aktas B ;Pozgajova M, et al. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alphaIIb beta3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. 2005;106(8).
38. Dayal S ;Wilson KM ;Motto DG ;Miller FJ ;Chauhan AK ;Lentz SR. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis. *Circulation*. 2013;127(12).
39. Ferroni P ;Santilli F ;Cavaliere F ;Simeone P ;Costarelli L, et al. Oxidant stress as a major determinant of platelet activation in invasive breast cancer. *International journal of cancer*. 2017;140(3).
40. Watt J, Ewart MA, Greig FH, Oldroyd KG, Wadsworth RM, Kennedy S. The effect of reactive oxygen species on whole blood aggregation and the endothelial cell-platelet interaction in patients with coronary heart disease. *Thromb Res*. 2012;130(2):210-5.
41. Mondal NK ;Sorensen EN ;Hiivala NJ ;Feller ED, et al. Intraplatelet reactive oxygen species, mitochondrial damage and platelet apoptosis augment non-surgical bleeding in heart failure patients supported by continuous-flow left ventricular assist device. *Platelets*. 2015;26(6).
42. Cardenes N ;Corey C ;Geary L ;Jain S, et al. Platelet bioenergetic screen in sickle cell patients reveals mitochondrial complex V inhibition, which contributes to platelet activation. *Blood*. 2014;123(18).
43. Armstrong JS. Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease. *British journal of pharmacology*. 2007;151(8).
44. Bielski ER ;Zhong Q ;Brown M ;da Rocha SR. Effect of the Conjugation Density of Triphenylphosphonium Cation on the Mitochondrial Targeting of Poly(amidoamine) Dendrimers. *Molecular pharmaceutics*. 2015;12(8).
45. Fuentes M, Araya-Maturana R, Palomo I, Fuentes E. Platelet mitochondrial dysfunction and mitochondria-targeted quinone-and hydroquinone-derivatives: Review on new strategy of antiplatelet activity. *Biochemical Pharmacology*. 2018;156:215-22.
46. Rodríguez J ;Olea-Azar C ;Cavieres C ;Norambuena E ;Delgado-Castro T, et al. Antioxidant properties and free radical-scavenging reactivity of a family of

- hydroxynaphthalenones and dihydroxyanthracenones. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007;15(22).
47. Cocheme HM, Kelso GF, James AM, Ross MF, Trnka J, Mahendiran T, et al. Mitochondrial targeting of quinones: Therapeutic implications. *Mitochondrion*. 2007;7:S94-S102.
  48. Verma S ;George J ;Singh S ;Pardasani P ;Pardasani R. [3 + 2] Cycloaddition reactions of thioisatin with thiazolidine-2-carboxylic acid: a versatile route to new heterocyclic scaffolds. *Organic and medicinal chemistry letters*. 2011;1(1).
  49. Kim SR ;Lee JY ;Lee MY ;Chung SM ;Bae ON ;Chung JH. Association of quinone-induced platelet anti-aggregation with cytotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2001;62(1).
  50. Chang M-C, Chang B-E, Pan Y-H, Lin B-R, Lian Y-C, Lee M-S, et al. Antiplatelet, antioxidative, and anti-inflammatory effects of hydroquinone. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(10):18123-30.
  51. Ribeiro ALT, Shimada ALB, Hebeda CB, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP, Filho WdRP, et al. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology*. 2011;288(1):1-7.
  52. Moura LA ;de Almeida AC ;da Silva AV ;de Souza VR ;Ferreira VF ;Menezes MV ;Kaiser CR ;Ferreira SB ;Fuly AL. Synthesis, Anticlotting and Antiplatelet Effects of 1,2,3-Triazoles Derivatives. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))*. 2016;12(8).
  53. Chang CY ;Huang LJ ;Wang JP ;Teng CM ;Chen SC ;Kuo SC. Synthesis and anti-platelet, anti-inflammatory and anti-allergic activities of methoxyisoflavanquinone and related compounds. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2000;48(7).
  54. Bolibrukh K ;Polovkovych S ;Khoumeri O ;Halenova T, et al. Synthesis and Anti-Platelet Activity of Thiosulfonate Derivatives Containing a Quinone Moiety. *Scientia pharmaceutica*. 2015;83(2).
  55. Hu Z, Sim Y, Kon OL, Ng WH, Ribeiro AJM, Ramos MJ, et al. Unique Triphenylphosphonium Derivatives for Enhanced Mitochondrial Uptake and Photodynamic Therapy. *Bioconjugate Chemistry*. 2017;28(2):590-9.

56. Murphy MP. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1777(7-8).
57. Murphy MP ;Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2007;47.
58. Ross MF, Prime TA, Abakumova I, James AM, Porteous CM, Smith RAJ, et al. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochemical Journal*. 2008;411:633-45.
59. Méndez D, Urra FA, Millas-Vargas JP, Alarcón M, Rodríguez-Lavado J, Palomo I, et al. Synthesis of antiplatelet ortho-carbonyl hydroquinones with differential action on platelet aggregation stimulated by collagen or TRAP-6. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;192:112187.
60. Van Camp G. Cardiovascular disease prevention. *Acta clinica Belgica*. 2014;69(6).
61. Noale M Search;Limongi F Search;Maggi S. Epidemiology of Cardiovascular Diseases in the Elderly. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020;1216.
62. Xu T ;Ding W ;Ji X ;Ao X ;Liu Y ;Yu W ;Wang J. Oxidative Stress in Cell Death and Cardiovascular Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
63. Méndez D ;Arauna D ;Fuentes F ;Araya-Maturana R, et al. Mitoquinone (MitoQ) Inhibits Platelet Activation Steps by Reducing ROS Levels. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(17).
64. Monroy-Cárdenas M, Méndez D, Trostchansky A, Martínez-Cifuentes M, Araya-Maturana R, Fuentes E. Synthesis and Biological Evaluation of Thio-Derivatives of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone (Lawson) as Novel Antiplatelet Agents. *Front Chem*. 2020;8:533.
65. Polgár J ;Clemetson JM ;Kehrel BE ;Wiedemann M ;Magnenat EM, et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(21).
66. Wallberg F ;Tenev T ;Meier P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harbor protocols*. 2016;2016(4).

67. Ishigaki M ;Iketani M ;Sugaya M ;Takahashi M, et al. STED super-resolution imaging of mitochondria labeled with TMRM in living cells. *Mitochondrion*. 2016;28.
68. Chiu SP ;Lee YW ;Wu LY ;Tung TH, et al. Application of ECIS to Assess FCCP-Induced Changes of MSC Micromotion and Wound Healing Migration. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2019;19(14).
69. Gardiner B ;Dougherty JA ;Ponnalagu D ;Singh H, et al. Measurement of Oxidative Stress Markers In Vitro Using Commercially Available Kits. 2020.
70. Yu TJ ;Hsieh CY ;Tang JY ;Lin LC ;Huang HW, et al. Antimycin A shows selective antiproliferation to oral cancer cells by oxidative stress-mediated apoptosis and DNA damage. *Environmental toxicology*. 2020;35(11).
71. Ramsey H ;Zhang Q ;Wu MX. Mitoquinone restores platelet production in irradiation-induced thrombocytopenia. *Platelets*. 2015;26(5).