



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

**ACTIVIDAD ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA DE INHIBIDORES
MITOCONDRIALES**

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

**AUTOR: SEBASTIÁN JARA PARRAGUEZ
PROFESOR GUÍA: DR. TM. EDUARDO FUENTES QUINTEROS**

**TALCA-CHILE
2022**

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, 2023

Dedicatoria

A mi familia y en especial mención a mi madre Jessica por todo su cariño y apoyo a lo largo de estos años, por su labor como padre y madre en todos los momentos difíciles; y a mi hermano quien siempre me ha estado apoyando desde pequeño, también agradecer a mi pareja Lorena quien ha estado a mi lado durante todo este tiempo animándome y apoyándome en momentos que pensaba en rendirme.

Agradecimientos

A mis docentes por haber compartido sus conocimientos durante mi preparación como profesional, de manera especial al profesor Eduardo Fuentes profesor guía de esta memoria y en conjunto al Proyecto ANID-FONDECYT N° 1220339.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Enfermedades cardiovasculares atero-trombóticas	5
4.2 Rol de las plaquetas en la hemostasia	6
4.2.1 Hemostasia y plaquetas	8
4.3 Trombosis	9
4.3.1 Trombosis arterial	10
4.3.2 Trombosis venosa (TV)	11
4.4 Funcionalidad plaquetaria	12
4.5 Terapia antiplaquetaria	15
4.6 Inhibidores mitocondriales y funcionalidad de la mitocondria	16
4.6.1 Mitocondria: un organelo clave en las plaquetas	16
4.6.2 Complejos mitocondriales	18
4.6.3 Inhibidores mitocondriales usados en plaquetas	20
4.7 Inhibidores mitocondriales dirigidos a complejos de la cadena de fosforilación 21	
4.7.1 Complejo I	21
4.7.1.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial I	23
4.7.1.1.1 Rotenona	26
4.7.1.1.2 Biguanidas	27
4.7.1.1.2.1 Metformina	28
4.7.2 Complejo II	31
4.7.2.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial II	32

<u> </u> 4.7.2.1.1 Lonidamina	34
4.7.3 Complejo III.....	36
<u> </u> 4.7.3.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial III.....	36
<u> </u> 4.7.3.1.1 Atovacuona	37
<u> </u> 4.7.3.1.2 Antimicina A.....	38
4.7.4 Complejo IV	40
<u> </u> 4.7.4.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial IV	41
<u> </u> 4.7.4.2 Óxido nítrico	41
4.7.5 Complejo V	42
<u> </u> 4.7.5.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial V	44
<u> </u> 4.7.5.1.1 Oligomicina.....	46
<u> </u> 4.7.5.1.2 Resveratrol.....	47
4.7.6 Otros inhibidores.....	49
<u> </u> 4.7.6.1 Peroxinitrito (ONOO-).....	49
<u> </u> 4.7.6.2 Nitrito	49
<u> </u> 4.7.6.3 MPP ⁺	50
5. CONCLUSIONES	51
6. BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Proceso de activación y agregación plaquetaria	14
Figura 2. Partes y estructura de la mitocondria	17
Figura 3. Cadena respiratoria mitocondrial	19
Figura 4: Representación de la actividad del complejo I	22
Tabla 1: Familias de inhibidores dirigidos hacia el complejo I y otros compuestos	24
Tabla 2: Pesticidas y medicamentos con propiedad inhibitoria del complejo I	25
Figura 5: Estructuras químicas de metformina, buformina, fenformina y el principio activo de estas la galegina.	28
Tabla 3: Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial III	33
Figura 6: Representación esquemática de las subunidades del Complejo II y el efecto que produce la lonidamina	35
Figura 7: Representación del sitio de inhibición de AA y ATO en el complejo III	40
Figura 8: Estructura de la ATP sintasa	43
Tabla 4: Inhibidores dirigidos hacia el complejo V	45
Figura 9: Estructuras químicas de resveratrol con su configuración trans (a) y cis (b)	47

RESUMEN

Las plaquetas, agentes reguladores del proceso hemostático, juegan un rol importante en la aparición de enfermedades cardiovasculares al participar en la formación de trombos, donde la presencia de esta relación ha llevado a que se necesite indagar en los mecanismos que ocurren durante la formación del tapón plaquetario como son la activación, adherencia y agregación de las plaquetas a través del estudio de la función plaquetaria, donde la terapia plaquetaria busca prevenir la formación de trombos, minimizar los riesgos que presentan los fármacos e investigar nuevos compuestos cuya función pueda cubrir el riesgo de hemorragia entre otras limitaciones. En ellos se encuentran los antiagregantes plaquetarios, compuestos inhibidores que comprenden amplias categorías entre los que se encuentra la inhibición de los complejos mitocondriales, los cuales llevan a una disminución del ATP mitocondrial, cambios en los niveles de ROS y en la correspondiente agregación plaquetaria dependiendo el grado de efecto que produzca en la mitocondria, clasificándose finalmente en inhibidores capaces de inhibir la formación de trombos por sí mismos o necesitando la inhibición de la producción de ATP glucolítico para ocasionar este efecto.

Palabras claves: Plaquetas, complejo mitocondrial, agregación plaquetaria, ATP, ROS

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares corresponden a la primera causa de muerte en el mundo e implica a todas aquellas enfermedades en que se vea alterado el corazón o los vasos sanguíneos, por lo que se encuentra comúnmente asociado a problemas relacionados con insuficiencia cardíaca, fiebre reumática, accidentes cerebrovasculares o trombosis.

Las plaquetas juegan un rol importante en la aparición de estos eventos cardiovasculares viéndose implicadas en la hemostasis y trombosis, debido a que estas se activan, adhieren y producen la agregación plaquetaria que puede llevar a la formación de coágulos, donde se impide el correcto flujo sanguíneo y se produce un daño irreversible en el tejido afectado.

El proceso de formación del trombo comienza simultáneamente a la agregación plaquetaria al ocurrir una lesión tisular, ya que durante el proceso de daño en la pared de los vasos ocurre una vasoconstricción local que lleva a la activación de las plaquetas en la zona afectada y liberación de factores como tromboxano o ADP que llevan a la adhesión de las mismas a la pared endovascular, la agregación plaquetaria sucede en estas primeras plaquetas a través de la formación de puentes de fibrinógeno entre estas y el complejo glucoproteína IIb/IIIa, posteriormente en la cascada de coagulación la trombina actúa sobre el fibrinógeno y lleva a la formación de la malla de fibrina y la consolidación del trombo.

La elevada prevalencia de enfermedades cardiovasculares en Chile ha provocado que sean de gran interés conocer su origen, actividad y como regular estos procesos, llevando al

estudio de nuevas estrategias contra la formación de trombos. Dentro de esta experimentación se encuentran los antiagregantes plaquetarios, compuestos cuya finalidad es impedir la formación de trombos, llevando a alterar los procesos plaquetarios de activación, adhesión y agregación. Dentro de las nuevas moléculas con actividad antiplaquetaria se pueden encontrar los inhibidores mitocondriales, los cuales disminuyen la capacidad de producción energética de las mitocondrias, alterando la producción de ATP y equivalentes de reducción generando la incapacidad de poder responder eficientemente a la formación de trombos. Las mitocondrias, por tanto, son organelos de gran importancia y son consideradas como la parte central del metabolismo energético del ser humano, donde los compuestos antiagregantes provocan un cambio en los procesos que ocurren dentro de estas, como son el ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena respiratoria de electrones, función principal de las mitocondrias que llevan a la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Investigar el efecto de inhibidores mitocondriales sobre la función plaquetaria

Objetivos específicos

1. Establecer los principales inhibidores mitocondriales usados para la regulación de la función plaquetaria.
2. Identificar los inhibidores mitocondriales con mayor potencial terapéutico antiplaquetario

3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

La búsqueda de información referente a temas relacionados a enfermedades cardiovasculares, trombosis y antiagregantes plaquetarios fue realizada utilizando artículos en las bases de datos “Google Academics”, “Science direct” y “Web of science”, encontrando documentos en revistas como “Blood reviews”, “Blood”, “Platelets”, “PLoS One”, entre otras.

- Fueron utilizados documentos publicados desde el año 2000 hasta la actualidad, en cuanto a la información referente a antiagregantes plaquetarios.
- Ciertas publicaciones anteriores al 2000 fueron utilizadas con objeto de describir el mecanismo de acción y el origen del compuesto.
- Los términos de búsqueda utilizados incluyeron “Mitochondrial inhibitor”, “Platelet aggregation”, “Platelet function”, “Effect on platelets” junto con los nombres respectivos a cada agente antiagregante, incluyéndose términos referidos a cada antiagregante y su sitio de acción.
- Las referencias resultantes de antiagregantes fueron limitadas a aquellas donde se especificarán sus usos en mitocondrias, sin considerar efectos encontrados en las propias células utilizadas.

Las secciones a partir de “Inhibidores mitocondriales dirigidos a complejos de la cadena de fosforilación” contienen la descripción del complejo mitocondrial, los inhibidores dirigidos al mismo y se destacan los inhibidores importantes de cada uno como subtema con una descripción general y funciones.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Enfermedades cardiovasculares atero-trombóticas

La incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) aumenta drásticamente con la edad, es muy rara en individuos jóvenes (<1 por 10000 por año) pero aumenta en alrededor del 1% por año en los ancianos (1). Es la principal causa mundial de muerte presentando más de 18.6 millones de muertes por año en 2019, un número que se encuentra en aumento y que es causante de aproximadamente 6,2 millones de muertes entre las edades de 30 a 70 años (2). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se destaca como la principal causa de mortalidad, representando el 31% de todas las muertes mundiales (3), especialmente en países desarrollados como Australia, Europa, Nueva Zelanda y Estados Unidos (4). Esto corresponde a un grupo de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos que incluyen enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca reumática, cardiopatía congénita, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar, entre otras afecciones (5).

Los accidentes cerebrovasculares o eventos cerebrovasculares pueden ser ocasionados por eventos isquémicos o hemorrágicos, en primer lugar el accidente cerebrovascular isquémico que ocurre en un 87% de todos los casos sucede al presentarse una disminución en el flujo sanguíneo y en la perfusión del tejido cerebral, por otra parte el accidente cerebrovascular hemorrágico es causado por la ruptura de los vasos sanguíneos cerebrales presentándose en el 13% de los casos restantes (6). Entre las múltiples causas que provocan estos accidentes se suele encontrar factores de riesgo como el tabaquismo, la alimentación poco saludable y la obesidad, la inactividad física y el consumo nocivo de alcohol, hipertensión, diabetes e hiperlipidemia (3). Destacando entre estas propiedades las

plaquetas tienen un repertorio funcional dinámico que media la función hemostática y las respuestas inflamatorias. Sin embargo, muchas de estas funciones se alteran en los adultos mayores promoviendo la formación de un entorno proinflamatorio, un mayor riesgo de ECV y protrombótico (7).

A raíz de ello Virchow en 1856 hace ya más de 150 años postuló una tríada que definía los factores que llevan al desarrollo de trombosis, la llamada tríada de Virchow cuyos factores son las anomalías en la pared del vaso, el flujo sanguíneo y la coagulabilidad de la sangre, componentes que él refería a la trombosis venosa, pero que también pueden ser aplicados a la trombosis arterial (8, 9), la disfunción endotelial es el componente más importante en la tríada establecida del siglo XXI la cual tiene en cuenta la inflamación, disfunción endotelial y aterosclerosis, turbulencia en las bifurcaciones y regiones estenóticas, anomalías en la función plaquetaria, coagulación, fibrinólisis y factores metabólicos u hormonales (9).

4.2 Rol de las plaquetas en la hemostasia

El estudio de la función plaquetaria inició hace más de 100 años, cuando al estudiarlas se identificaron características únicas que eran decisivas para la hemostasia y la trombosis, estas interactúan con factores ambientales y con otras plaquetas creando complejos procesos que se originan en la superficie de la membrana plaquetaria, esta membrana, a su vez, proporciona una interfase reactiva entre las plaquetas y el exterior utilizando los diversos receptores localizados en su superficie, su morfología cambia cuando se activan en trastornos como diabetes, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio (10), implicando más que simplemente hacer que la sangre coagule, requiriendo que ocurra en el momento

adecuado, lugar correcto y en la medida necesaria que permita detener el sangrado, debido a que estas no solo van a taponar el defecto vascular sino que también van a proporcionar la superficie adecuada en la que ocurre la activación de muchas proteínas de la coagulación (11).

Las plaquetas se activarán con las interacciones que se originan entre los diferentes receptores de membrana y un gran número de moléculas pequeñas, enzimas y complejos proteicos macromoleculares que tienen la finalidad de contraer el citoesqueleto. La activación que ocurre en este proceso modifica la forma que presentan, ocasionando que la estructura que normalmente es discoide pase a una forma circular, estos cambios de conformación se producen con la finalidad de tener extensiones o también conocidos como pseudópodos cuya finalidad es permitir la adhesión de la plaqueta al endotelio y otras células, así como la interacción con otras plaquetas y liberación del contenido de los gránulos en su interior (10).

Esta activación plaquetaria depende de múltiples estímulos que tienen como finalidad generar una secuencia de eventos, entre los que se encuentran la trombina, colágeno, ADP, metabolitos del ácido araquidónico y factor activador de plaquetas (12) y la medida en que cambia la forma de las plaquetas depende del tipo de activación, la fuerza misma que tenga el estímulo y el tiempo transcurrido tras la activación (13).

4.2.1 Hemostasia y plaquetas

El sistema sanguíneo de los mamíferos depende de un circuito vascular cerrado de alta presión para cumplir con sus múltiples funciones biológicas, en esta se han desarrollado entre otros sistemas, una vía de vigilancia hemostática que evita la pérdida de sangre y mantiene la integridad del huésped (14) donde las plaquetas o también llamados trombocitos (células anucleadas, pequeñas y abundantes) corresponden a fragmentos celulares producidos continuamente a partir de megacariocitos (15).

Las plaquetas se encuentran equipadas con mitocondrias, un citoesqueleto y un sistema tubular denso. Contienen orgánulos secretorios categorizados como gránulos alfa, densos y lisosomales, que son transportados y descargados por un sistema canalicular abierto conectado a la superficie (16) otorgándoles la posibilidad de ser considerados como fragmentos celulares secretorios y altamente sensibles que provocan la liberación de factores de crecimiento, quimiocinas, factores coagulantes y vesículas extracelulares (15). Presentan un papel relevante en la hemostasia a nivel vascular, la trombosis, junto con tener un rol importante en la integridad de las células endoteliales y los vasos debido a su proximidad e interacción con el endotelio (17) donde actúan como mediadoras de la hemostasia conjunto al sistema de coagulación generando un coágulo que evita la pérdida de sangre y restablece la continuidad vascular (18).

La función principal de las plaquetas es participar en la hemostasia primaria a través de cuatro pasos distintos: adhesión, activación, secreción y agregación. La búsqueda de los mecanismos que provocan estos sucesos y cómo funcionan ha permitido comprender mejor

la fisiopatología de los trastornos hemorrágicos, por un lado, y de las enfermedades trombóticas, como los síndromes coronarios agudos (18).

Durante mucho tiempo se ha pensado que la función principal de las plaquetas en la circulación es ayudar a mantener la hemostasia primaria y el flujo sanguíneo dentro del vaso. Para lograr este objetivo, la plaqueta fluye muy cerca de la pared del conducto debido a la naturaleza biofísica de los componentes sanguíneos y las fuerzas de cizallamiento dentro del mismo (19) que se encuentran mediadas por dos mecanismos principales: en primer lugar las plaquetas se agregan para formar el tapón plaquetario, seguido de la activación del sistema de coagulación para formar el coágulo de fibrina, donde se han implicado desde hace mucho tiempo en la patogenia de la aterosclerosis como componentes del ateroma (4, 20).

4.3 Trombosis

La trombosis es un problema sanitario importante y la prevalencia de sus complicaciones sigue aumentando constantemente, esta corresponde a la formación de un coágulo oclusivo dentro de un vaso sanguíneo que reduce el flujo sanguíneo a los tejidos y órganos distales y restringe el suministro de nutrientes y oxígeno, lo que resulta en una isquemia localizada de tejidos y órganos, generalmente considerada como una desviación patológica de la hemostasia, implicando también coagulación y activación plaquetaria (20).

La trombosis se caracteriza por la formación de trombos (coágulos) intravasculares y la oclusión de los vasos, resultando en que las terapias actuales sean dirigidas tanto a la trombosis patológica como a la hemostasia fisiológica, aumentando casi inevitablemente el riesgo de hemorragia (14). Es importante destacar que las etiologías de los coágulos arteriales y venosos son muy diferentes, los coágulos arteriales se forman bajo un alto esfuerzo de cizalla, normalmente después de la rotura de una placa aterosclerótica u otro daño a la pared de los vasos sanguíneos, siendo estos trombos ricos en plaquetas y generalmente tratados con medicamentos antiplaquetarios; por el contrario, los coágulos venosos se forman bajo un menor esfuerzo cortante en la superficie de un endotelio en gran parte intacto. Son ricos en fibrina y se tratan con medicamentos anticoagulantes (21).

4.3.1 Trombosis arterial

La trombosis arterial es el resultado de la formación de coágulos en el contexto de la rotura de placas ateroscleróticas vulnerables, ocurre con mayor frecuencia en asociación a la aterosclerosis a pesar de que la trombosis se encuentra mediada por plaquetas y fibrina, mientras que la aterosclerosis es promovida por leucocitos, células endoteliales y componentes de la respuesta inmunitaria adaptativa (22). Es precedida por factores tanto ambientales como genéticos encontrándose involucrados en su formación la glucoproteína plaquetaria VI, el receptor de glucoproteína Ia/IIa y proteínas de coagulación sanguínea (23).

La liberación de estos componentes hemostáticamente activos (colágeno, citoquinas, etc) se produce inicialmente en esta placa plaquetaria lábil (rota), que produce la activación de las plaquetas y la hemostasia secundaria que luego se estabiliza por fibrina insoluble,

donde esta rotura conduce a la agregación plaquetaria, la formación de trombos, la oclusión de los vasos y un posible infarto de miocardio o accidente cerebrovascular isquémico (24). Entre las asociaciones causantes de trombosis arterial se encuentran factores de riesgo adquiridos, anticuerpos antifosfolípidos, hiperhomocisteinemia, niveles elevados de fibrinógeno, proteína C reactiva y lipoproteína (a) (23). Siendo rara en niños y adolescentes y frecuentemente causada por trastornos sistémico que produzcan daño vascular o enfermedad embólica, como anemia de células falciformes, enfermedad de Kawasaki, endocarditis bacteriana, periarteritis nodosa, homocistinuria o ingestión de cocaína (25).

4.3.2 Trombosis venosa (TV)

El equilibrio entre el flujo sanguíneo, la composición del mismo y la salud del endotelio venoso debe modificarse para que se forme un coágulo venoso, donde estos no se adhieren firmemente al endotelio y pueden desprenderse fácilmente, lo que lleva a una enfermedad oclusiva de vasos distantes como la embolia pulmonar (24), siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, una secuela potencialmente mortal que se produce cuando el trombo se rompe y viaja al pulmón, provocando la oclusión de una arteria pulmonar (26).

La incidencia de la trombosis venosa en la población es de 0,5 por cada 1000 pacientes por año, siendo rara en menores de 15 años y aumentando su frecuencia con la edad, con una incidencia de 1,9 por cada 1000 personas a la edad de 65-69 años y de 3,1 por cada 1000 personas en la edad de 85-89 años (27). Cuando se rompe la pared del vaso o se rompe el endotelio, el colágeno y el factor tisular quedan expuestos al flujo sanguíneo, iniciando así la formación de un trombo, el colágeno expuesto desencadena la acumulación

y activación de plaquetas, mientras que el factor tisular expuesto inicia la generación de trombina, que no solo convierte el fibrinógeno en fibrina, sino que también activa las plaquetas (26).

Entre los causantes de trombosis venosa se encuentra el vínculo entre la trombosis venosa y la inflamación, el estado de inmovilización, los grupos sanguíneos distintos de O, niveles de VWF, factor VIII y el cáncer. En el primero se establece una relación recíproca, ya que se menciona que la trombosis precede y causa inflamación. Por otra parte, la inmovilización como tal promueve la activación endotelial al aumentar el tiempo que el paciente se encuentra postrado y la falta de flujo o un bajo flujo (28), esto ocasiona la acumulación de sustancias protrombóticas, lo que puede provocarse en contextos de cirugía, lesión de la medula espinal, fracturas de huesos largos y fracturas pélvicas (29), siendo el riesgo relativo aproximado (RR) hacia tromboembolismo venoso dependiente del causante teniendo un RR de 5 en el caso de la inmovilización, el embarazo presentando un RR de 7, el uso de anticonceptivos orales (RR=2), edad avanzada (RR=10), obesidad (R=1-3) o alteraciones como la deficiencia de antitrombina (R=25), deficiencia de proteína C (R=10) o cirugías y traumas (R=5-200) (30).

4.4 Funcionalidad plaquetaria

La agregación plaquetaria es un proceso en el que ocurre una unión entre plaquetas, este sucede al presentarse una lesión en la pared vascular o en casos de disminución de la función endotelial. Cuando las plaquetas circulantes se exponen al subendotelio rico en colágeno o a la trombina, los gránulos contenidos en ellas se secretan, lo cual es esencial

para el reclutamiento y activación de más plaquetas, promoviendo la agregación plaquetaria, la formación de trombos y la reparación de heridas (31).

Al activarse, se facilita la adhesión de las plaquetas a través de extensiones dendríticas y dos clases de gránulos secretores que refuerzan la agregación plaquetaria: el primer tipo denominados gránulos densos secretan ADP, calcio y serotonina necesarios durante la cascada de coagulación, mientras que el segundo tipo corresponde a los gránulos alfa, que secretan una amplia gama de proteínas como el FVW o factores de la coagulación; otros como el fibrinógeno, se adquieren del plasma por endocitosis mediada por receptores o como las abundantes proteínas plasmáticas, albúmina e IgG que se adquieren por pinocitosis (32).

El proceso de agregación plaquetaria empieza con la adhesión de las plaquetas a la superficie subendotelial de la pared arterial dañada, por activación de los receptores de la membrana plaquetaria. Unos reconocen y se unen a las cadenas proteicas del subendotelio (principalmente el colágeno y el factor de Von Willebrand), causantes de la fijación de la plaqueta a la zona dañada (33); por otro lado, como paso final de la formación del trombo, las plaquetas activadas se unen al factor Von Willebrand a través de su receptor GPIIb/IIIa, formando el sustrato para que ocurra la interacción con las plaquetas que fluyen libremente en la sangre (34), como consecuencia ocurrirá un fenómeno en cascada de agregación y activación; cuyo proceso puede ser inhibido por diversas sustancias naturales como las prostaglandinas al evitar la coagulación intravascular sin lesión previa (33).

La trombina, generada en la plaqueta activada, transforma el fibrinógeno en polímeros de fibrina insolubles que estabilizan el trombo en crecimiento. El coágulo de plaquetas-

fibrina se retrae posteriormente, lo que finalmente conduce a la detención del sangrado y apoya el proceso de curación del daño vascular inicial (34), Por tanto, las funciones plaquetarias se podrían resumir en 3 procesos principales: adhesión de las plaquetas al endotelio lesionado que da como resultado su activación, estas plaquetas adheridas posteriormente se agregan formando una pequeña masa de plaquetas y finalmente se produce una acumulación de plaquetas como es representado en la figura N° 1.

Al ocurrir este proceso se origina la secreción de varios componentes activos como tromboxano A2, factor plaquetario 4, fibronectina, entre otros, que reclutan más plaquetas en el sitio de la lesión y también ayudan en la estabilización de agregados más grandes. Después de esto ocurre la formación de fibrina que tiene lugar por las propiedades superficiales aceleradas de las plaquetas, convirtiéndose la malla plaqueta-fibrina en un coágulo más denso y menos hidratado que tiene una mayor resistencia mecánica (13).

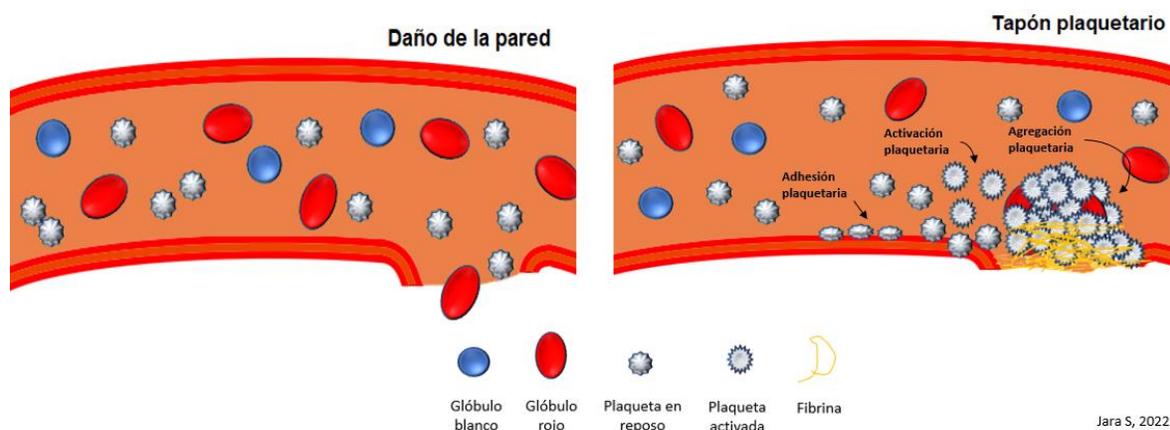


Figura N° 1: Proceso de activación y agregación plaquetaria. Al ocurrir una lesión se produce la unión de las plaquetas a la matriz endotelial, se produce un cambio conformación en las plaquetas y finaliza en la formación de un tapón plaquetario. Elaboración propia Jara S. (2022).

4.5 Terapia antiplaquetaria

Los antiagregantes plaquetarios son medicamentos utilizados para prevenir la formación de trombos en las siguientes situaciones: riesgo de episodios obstructivos coronarios y cerebrales, cirugía vascular, diálisis y trombosis venosa profunda (33). La funcionalidad que presentan estos fármacos para impedir la formación de trombos destaca en la inhibición de la funcionalidad plaquetaria alterando la adhesión o activación, así como receptores de membrana y mediadores de la activación (35). Entre las limitaciones de los fármacos empleados actualmente se encuentra el riesgo de hemorragia, la variabilidad inter-individuo en relación con la respuesta y la duración prolongada de la acción, que no puede revertirse si se requiere intervenir al paciente como en cirugías de emergencia (36).

Para los agentes antiplaquetarios, el problema más urgente que debe resolverse es cómo separar la disminución de la formación trombótica del aumento del riesgo de hemorragia. Actualmente, todos los agentes antiplaquetarios en el mercado no logran superar esta limitación. Por lo tanto, los nuevos objetivos y el mecanismo de agregación plaquetaria deben estudiarse más a fondo (37).

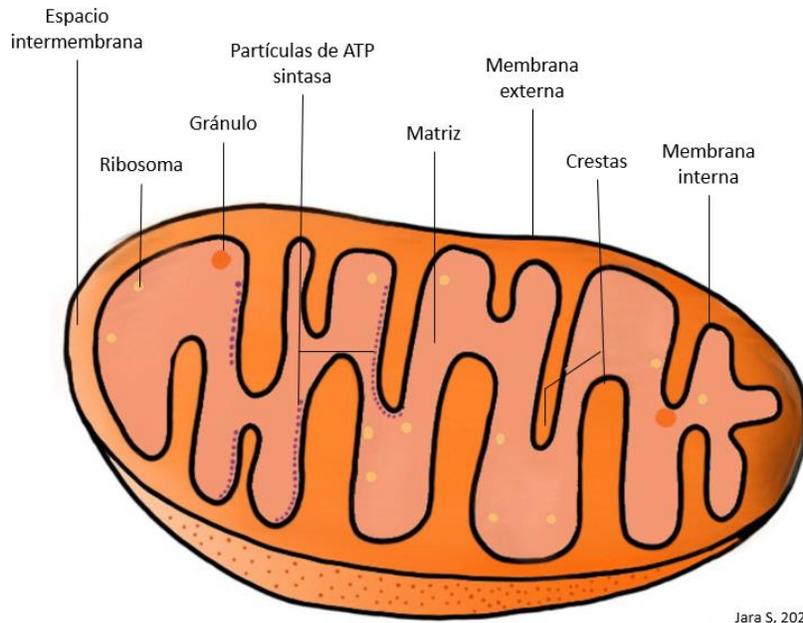
En la actualidad se utilizan clínicamente cuatro clases principales de fármacos, ya sean solos o combinados: inhibidores de la ciclooxigenasa 1 (aspirina), inhibidores del receptor ADP P2Y₁₂ (cangrelor, clopidogrel, prasugrel y ticagrelor), antagonistas de PAR₁ (vorapaxar) e inhibidores de GPIIb/IIIa (abciximab, eptifibatida y tirofibán) (38). Sin embargo, siguen ocurriendo eventos clínicos relacionados con el tratamiento antiplaquetario como ocurre en el caso de la aspirina con clopidogrel donde pacientes diabéticos presentan un alto perfil de reactividad plaquetaria y no se benefician del tratamiento en comparación con otros pacientes de alto riesgo sin diabetes (35).

El tratamiento ha mejorado rápidamente en los últimos años y varios avances han propiciado una mejora significativa en la eficacia antiplaquetaria y obviamente reducido los efectos secundarios como el riesgo de hemorragia o trombocitopenia, existiendo un esfuerzo concentrado en la búsqueda de información clínica, genética y de laboratorio que permita encontrar medicamentos útiles para el tratamiento antiplaquetario cuyas funciones logren actuar en nuevos objetivos o proteínas críticas dentro de las vías de señalización de la plaqueta (37).

4.6 Inhibidores mitocondriales y funcionalidad de la mitocondria

4.6.1 Mitocondria: un organelo clave en las plaquetas

Las mitocondrias son fácilmente representadas por una estructura formada por dos membranas concéntricas: una externa y otra interna, en cuyo interior se encuentran los elementos representados en la figura N° 2; contienen las actividades típicas de la vía oxidativa del metabolismo de los ácidos grasos, la fosforilación oxidativa y el control respiratorio (39). En ausencia de un núcleo, la vida útil de las plaquetas (7 a 10 días) está determinada en gran medida por las mitocondrias, conteniendo en su interior de 5 a 8 mitocondrias siendo fundamental en la respiración aeróbica y producción de los sustratos metabólicos necesarios para llevar a cabo su función y supervivencia (16).



Jara S, 2022

Figura N° 2: Partes y estructura de la mitocondria. Estructuras internas que conforman la estructura general de la mitocondria. Elaboración propia Jara S. (2022).

La funcionalidad mitocondrial central es la capacidad de bombear protones a través de la membrana interna para crear un gradiente con alta energía potencial, el potencial de membrana mitocondrial, donde a partir de esta energía almacenada la ATP sintasa convierte la energía química hacia la síntesis de ATP (40), ya que para mantener la capacidad de responder rápidamente a los factores estresantes o al daño de los vasos sanguíneos se necesita una fuente de energía y metabolitos altamente eficiente para orquestar la respuesta, efecto que ocurre al interior de la mitocondria donde se albergan los procesos energéticos clave para el funcionamiento plaquetario como son el ciclo del ácido tricarbólico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) quienes son muy activos al ocurrir un estímulo hacia la agregación plaquetaria, activándose ambos mecanismos (41).

Ocurre que el sistema enzimático del TCA descompone los sustratos de acetil coenzima A, derivados de la descomposición del piruvato, ácidos grasos y aminoácidos para generar CO_2 y en el proceso reducir NAD^+ a NADH y FAD a FADH_2 . La generación de estos intermedios proporciona equivalentes reductores a la cadena respiratoria que consiste en una serie de sistemas enzimáticos acoplados y descritos como Complejo I, II, III y IV (42).

La demanda de energía, por otra parte, se satisface mediante un sistema metabólico que combina la glucólisis y el OXPHOS mitocondrial. En las plaquetas en reposo, se produce aproximadamente el 60% del ATP celular, mientras que OXPHOS proporciona el 40% restante (43). De la función mitocondrial total de las plaquetas, el 50% se dedica a la producción de ATP; la energía de reserva es responsable entre otras actividades, de la respuesta celular al estrés oxidativo, siendo el ATP, por tanto, esencial para el correcto funcionamiento de las plaquetas: varios procesos clave que ocurren dentro de las plaquetas, como el mantenimiento de la homeostasis del calcio, requieren un suministro constante de energía (16).

4.6.2 Complejos mitocondriales

La demanda de energía es suplida con la respiración mitocondrial, responsable de la producción de energía en la mayoría de los organismos eucariotas, en esta se encuentra la cadena respiratoria cuya conformación en su conjunto lleva a la producción de ATP, encontrándose estos complejos multi-proteicos unidos a la membrana mitocondrial interna siguiendo un proceso representado en la figura N° 3 y viéndose involucrados en la transferencia de electrones y la translocación de H^+ para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa (44).

Hay que destacar que las mitocondrias son una fuente celular importante de especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres y moléculas reactivas que se derivan del oxígeno molecular, entre los que se encuentran el superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (45). De este proceso, los ROS son generados casi en su totalidad por OXPHOS (alrededor del 90%), donde el complejo I es considerado como el principal productor de ROS, seguido por el complejo III como consecuencia de la transferencia de electrones (46).

Como fue mencionado anteriormente, dentro de la membrana mitocondrial interna se encuentran los complejos de proteínas de la cadena de transporte de electrones, que son componentes clave de la fosforilación oxidativa, y en estados patológicos la cantidad de ROS producidos en estos puede aumentar más allá de la capacidad antioxidante de la célula, resultando en estrés oxidativo (45).

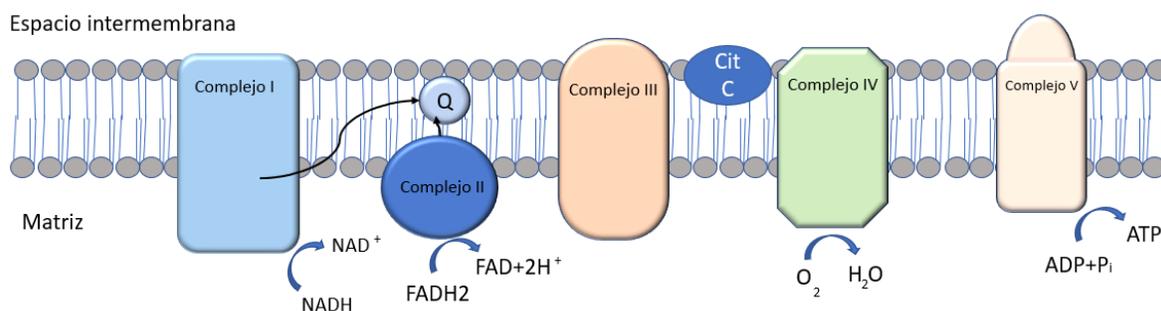


Figura N° 3: Cadena respiratoria mitocondrial. La figura muestra los componentes relacionados con la producción de ATP desde la entrada de electrones por el complejo I hasta la ATP sintasa. Elaboración propia Jara S. (2022)

4.6.3 Inhibidores mitocondriales usados en plaquetas

Esta capacidad de utilizar la glucólisis o el catabolismo de ácidos grasos en lugar de OXPHOS (producción de ATP mitocondrial) permite que las plaquetas se adapten a diferentes situaciones, como la hipoxia o la presencia de agentes inhibidores encontrándose en varios estudios que la agregación plaquetaria junto con otras actividades metabólicas solo se interrumpe por completo cuando el OXPHOS mitocondrial y la glucólisis se inhiben simultáneamente (16).

Un ejemplo de ello destaca donde la oxidación de lípidos mitocondriales aumenta con la estimulación de la trombina, para hacer frente a las demandas energéticas de la activación plaquetaria, un proceso que se apoya en la disponibilidad mejorada de eicosanoides liberados de la membrana plasmática a través de la acción de la fosfolipasa citosólica A2 dependiente de Ca^{+2} (47) por lo que, se puede hacer uso de compuestos cuya finalidad sea impedir la función que presente la mitocondria plaquetaria con el objetivo de disminuir la capacidad de producción energética al interior de la misma, provocando una disfunción mitocondrial por falta de actividad y compuestos necesarios para la activación y función como es el caso de la utilización de Tiazolidinedionas que comprende la inhibición del complejo de la cadena respiratorio I o el Resveratrol y quercetina que inhiben la ATP sintasa (48).

Esta función ocurre de esta forma, ya que la secreción que producen las plaquetas, así como los niveles de fosforilación oxidativa se elevan cuando se requiere más energía, actuando las mitocondrias como los proveedores de esta, lo que se demuestra de forma inversa al inhibir la respiración mitocondrial utilizando agonistas como la antimicina A que

en la mayoría de los casos producen una inhibición de más del 50% con concentraciones entre 1-100 mM (49). Estos resultados indican que los inhibidores mitocondriales aumentan el tiempo requerido para producir la formación de agregados, generar adherencia y cumplir su función de coagulación sanguínea.

Cabe señalar que el metabolismo oxidativo en las mitocondrias plaquetarias no disminuye hasta que las concentraciones de oxígeno caen por debajo de 2,5 μM , lo que sugiere que el citocromo C oxidasa y por extensión el sistema de transporte de electrones debe inhibirse notablemente antes de que el metabolismo se desacelere, además una característica a tener en cuenta de estos inhibidores es la reversibilidad que presentan, estos pueden ser irreversibles como el monóxido de carbono o la rotenona que generan un efecto permanente en la estructura mitocondrial siendo venenos metabólicos o con efecto reversible provocando que el uso de estos sea de gran importancia a la hora de buscar compuestos que puedan ser utilizados (50).

4.7 Inhibidores mitocondriales dirigidos a complejos de la cadena de fosforilación

4.7.1 Complejo I

El complejo I de la cadena respiratoria o también conocido como NADH: ubiquinona oxidorreductasa es una gran enzima formada por 45 subunidades que comprende una de las enzimas de entrada de la respiración celular, esta presenta como función el acoplamiento de la transferencia de electrones del NADH al conjunto de ubiquinona y la transferencia de

protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana (51) representada en la figura N°4. En su estructura las unidades centrales se dividen en grupos de siete unidades hidrofílicas y siete unidades hidrofóbicas donde las primeras comprenden los grupos prostéticos redox, un mononucleótido de flavina (FMN) y ocho grupos de hierro y azufre (Fe-S) (52), convirtiéndose en el complejo más grande y cumpliendo un papel de gran importancia en el gradiente de protones utilizado en la producción de ATP llegando a producir alrededor de un 40% de la fuerza motriz utilizada para la síntesis de este componente (53). Cabe destacar que el complejo I presenta dos formas distinguibles, una activa donde es totalmente competente y una forma D (desactivada) donde la enzima es catalíticamente incompetente (51).

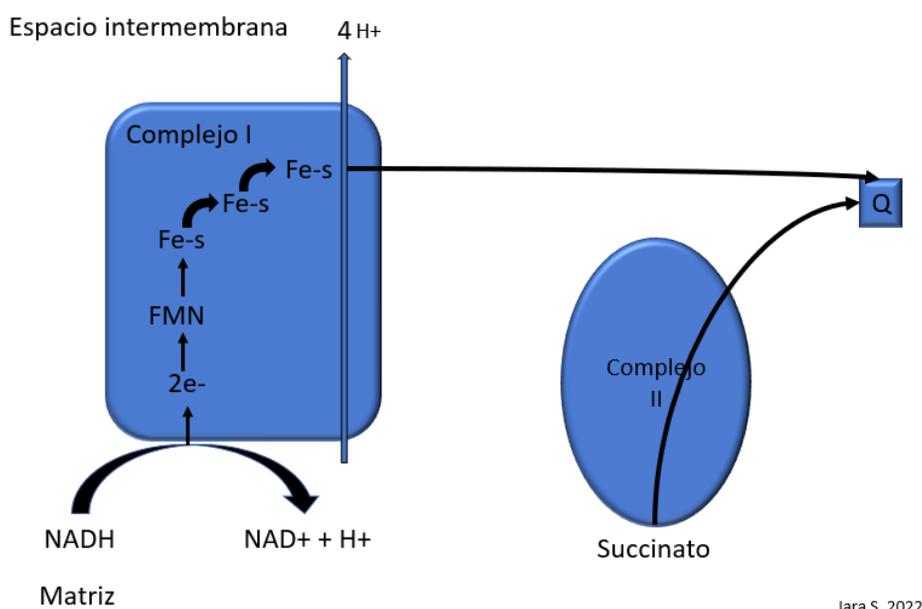


Figura N° 4: Representación de la actividad del complejo I. El primer complejo denominado NADH-Q oxidoreductasa realiza su función al aceptar los electrones de alta energía del NADH y transfiriéndolos finalmente al transportador liposoluble ubiquinona (Q), este proceso comienza con la oxidación de NADH a NAD⁺ donde los electrones son aceptados por FMN que se reduce a FMNH₂ proceso que implica dos electrones, posteriormente una serie de grupos Fe-S aceptan los electrones y los transfiere a la ubiquinona. Elaboración propia Jara S. (2022)

En resumen la función que presenta este complejo es la oxidación del NADH a NAD⁺ generado en el ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial, en cada uno de los ciclos que realiza utiliza dos electrones de NADH para reducir la ubiquinona a ubiquinol que será utilizado posteriormente en otros complejos mitocondriales (54).

4.7.1.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial I

El complejo I es inhibido por más de 60 compuestos que abarcan desde la rotenona, el más utilizado de esta serie, hasta insecticidas, acaricidas o neurotoxinas (55); Los inhibidores del complejo I pueden ser de origen natural o sintético representados en la Tabla N°1 y N°2, siendo en su mayoría de origen natural, como las piericidinas y la rotenona o más recientemente las auraquinas y tiangazol, cuya acción produce una potente inhibición del complejo I (56) detallando sus integrantes en la tabla N°1. La gran mayoría de estos actúan sobre la actividad de la NADH-Q reductasa que es la reacción limitante en la oxidación del NADH, aunque muchas de estas sustancias no tendrán como foco este único complejo, teniendo por ejemplo los inhibidores mencionados al menos dos o incluso tres (57).

Estos pueden agruparse en 3 clases dependiendo los efectos que produce en el comportamiento cinético de la enzima: Clase I/A (Piericidina A), Clase II/B (Rotenona) y clase C (Capsaicina) (58) o pueden ser clasificados dependiendo el efecto en la producción de ROS donde se encuentran los inhibidores de clase A, aquellos que producen un alto incremento en la producción de ROS y los inhibidores de clase B que ocasionan el efecto contrario (59).

Tabla N° 1: Familias de inhibidores dirigidos hacia el complejo I y otros compuestos.

Fuente: Elaboración propia Jara S. (2022)

Componente	Representantes	Referencias.
Rotenoides	Rotenona, Deguelin, tefrosina, elliptona, 12-hydroxyrotenona, berectona A, berectona B.	(55, 60, 61)
Piericidinas	Piericidina clasificada en A, A2-A4, B2-B5, C1-C8 D1-D4, E1; Ubicidina-3, hidroxipiridina, Glucopiericidina A, Glucopiericidina B, Glucopiericidina C, Mer-A2026A, IT-143-A, IT-143-B, JBIR-02, 7-dimetilpiericidina A1, glucopiericidinol A1, glucopiericidinol A2, 4'-Ramnopiericidina A1, 3'-Ramnopiericidina A1, 3'-Deoxitalopiericidina A1, 13- Hidroxiglucopiericidina A, Glucopiericidinol A2, Ramnósido, 7-demethyl-4'rhamnopericidin A1, 7-Dimetil-3'rhamnopericidina A1	(55, 62, 63)
Acetogeninas	Bullatacina, Trilobacina, silvaticina, muricatetrocina B, bullatalicina, squamocina, squamocina B, parviflorina, longicoricina, gigantetroneninona, gigantetrocina A, Annonacina, 4-aceti-lannonacina, annonacinona, isoannonacina, solamina, longimicina D, 4-acetil-xilomaticia, aromina, longimicina C, aromicina, goniotalamicina, venezenina, murihexoci, sootepensina A, sootepensina B, tonkinesina C, tonkinina C, rolliniastatina-1, rolliniastatina-2, otivarina, molvizarina	(64-66)
Antibióticos de mixobacterias	Fenoxano, tiangazol, mixalamida PI, fenalamida A2, aurachina A, mixotiazol, stigmatellina, TDS	(55)
Antibióticos	Aureotina, coclioquinona B, mucidina, pterulona	
Productos de plantas	Papaverina, capsaicina, honokiol, rhein	(55, 67)

Tabla N° 2: Pesticidas y medicamentos con propiedad inhibitoria del complejo I.

Fuente: Elaboración propia Jara S. (2022)

Componente	Representantes	Referencias
Pesticidas		
Acaricidas e insecticidas	Sandoz 547 ^a , pyridaben, fenpyroximato, tebufenpirad, fenazaquin, benzimidazol, [³ H] TDF, [¹²⁵ I] APF, [¹²⁵ I] AIF, Cyhalothrin, 6-Cloro-benzotiadiazol	(68)
Antihelmínticos	2M-TIO, nafuredina, ukulactona A, ukulactonea B, closantel	(68, 69)
Medicamentos y toxinas		
Sedantes	Amytal (barbiturato)	(55)
Diuréticos	Amilorida, EIPA, MIA benzamil, PRA1, PRA2, AAT	(68)
Antidiabéticos	Galegina, sintalina A, metformina, fenformina, proguanil, cycloguanil, buformina, troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona.	(68, 70)
Analgésicos	Meperidina (Demerol)	(55)
Neurolépticos	Haloperidol, clorpromazina, flufenazina, risperidona, clozapina	(70)
Anestésicos	Quinisocaína, butacaína, pramocaína, bupivacaína, carticaína, lidocaína, procaína, prilocaína	
Antihistamínicos	Ranolazina, cinarizina, flunarizina	
Herbicida	Paraquat	
Neurotoxinas sintéticas	MPP+, Decil-MPP+, MQ18, 2-metilharmina	(55)

4.7.1.1.1 Rotenona

La rotenona es un compuesto natural que se ha utilizado para interferir con la respiración mitocondrial en particular con la actividad del Complejo I en consecuencia, reduciendo los niveles de ATP intracelular, especialmente en líneas celulares dependientes de OXPHOS. Pertenece al grupo de rotenoides, una familia de isoflavonoides extraídos de las plantas leguminosas y ha sido clasificado como el inhibidor clásico del complejo I (71).

El mecanismo por el cual actúa no se encuentra totalmente claro, se ha visto que esta presenta inhibición hacia el complejo I que lleva a elevar la producción de ROS mitocondrial, aumenta la formación de ubisemiquinona -un donante de electrones- en la generación de superóxido mitocondrial y de esta generación se observa que la rotenona induce la muerte celular a través de un mecanismo apoptótico en oposición a la necrosis (condensación de cromatina y descomposición de ADN), donde se identifica la liberación de citocromo C y activación de caspasa 3, siendo verificado por citometría de flujo que la producción de ROS era dependiente de la dosis utilizada (72). También ha sido encontrada la capacidad de inhibir el ensamblaje de microtúbulos al unirse a la tubulina un componente importante en las plaquetas durante su formación y activación, resultando en la inhibición de la proliferación celular producto de un cambio conformacional en la tubulina, efecto que se relaciona con la actividad antiproliferativa y destructora de células que presenta la rotenona (73).

La inhibición producida por este compuesto inactiva al complejo II después de la inhibición provocada, ya que las plaquetas intactas usan exclusivamente NADH y la entrada de electrones a través del complejo I, resultando en la nula detección de la actividad impulsada por el complejo II posterior a la administración de rotenona, postulándose que el mecanismo que podría haber causado esta reacción es producto de la disminución del ATP celular (74), causando en altas concentraciones disfunción mitocondrial y apoptosis (75).

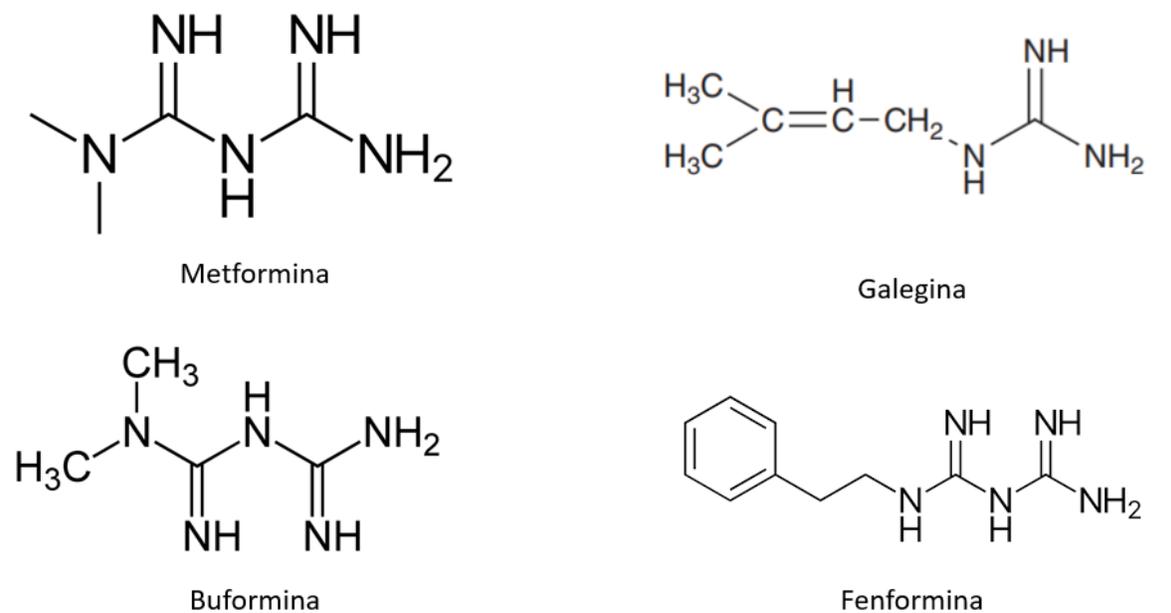
4.7.1.1.2 Biguanidas

Las biguanidas son fármacos que comúnmente son recetados para el tratamiento contra la diabetes tipo II, aunque también presentan funciones de prevención contra la malaria, tratamiento en enfermedades cardiovasculares y cáncer; en esta clasificación podemos encontrar 3 biguanidas con propiedades antihiper glucémicas que puede inhibir el complejo mitocondrial I: metformina, fenformina y buformina que presentan la particularidad de encontrarse cargadas positivamente y por ello concentrarse dentro de las mitocondrias debido al potencial de la membrana mitocondrial, aunque estas últimas han sido discontinuadas debido al riesgo de inducir acidosis láctica (76).

Dentro de las biguanidas también se pueden encontrar los fármacos antipalúdicos cicloguanil y proguanil que inhiben el complejo I de forma aislada sin inhibir la respiración celular ni mitocondrial, en este caso el proguanil se ha visto que afecta el potencial de membrana mitocondrial en *Plasmodium*, mientras que cicloguanil además de la inhibición hacia el complejo I presenta una inhibición débil por el complejo mitocondrial III (57).

4.7.1.1.2.1 Metformina

La metformina es un fármaco utilizado en el tratamiento de pacientes con diabetes tipo II, es un compuesto que posee propiedades anticancerígenas teniendo efectos tanto proapoptóticos como antiapoptóticos, por otra parte, esta se deriva de la galegina, un producto natural de la planta *Galega officinalis* que corresponde a un isoprenilo derivado de la guanidina, mientras que la metformina es una biguanida que contiene dos moléculas acopladas de guanidina con sustituciones adicionales (77) esquematizadas en la figura N°5.



Jara S, 2022

Figura N° 5: Estructuras químicas de metformina, buformina, fenformina y el principio activo de estas la galegina: Representación estructural de las biguanidas. Elaboración propia Jara S. (2022).

Se tiene conocimiento que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria de electrones, ya que a principios de los 2000, se encontró que la metformina inhibe selectivamente el complejo de la cadena respiratoria mitocondrial I y actúa como un inhibidor reversible no competitivo que probablemente tiene como foco las regiones anfipáticas de la enzima (78), lo que la convierte en un inhibidor distinto a los mayormente utilizados como rotenona y piericidina A que no tienen carga y son moléculas altamente hidrofóbicas, además se demostró que la inhibición de la oxidación de NADH por metformina es inmediata cuando el fármaco es agregado antes del inicio de la catálisis, pero se retrasa una vez esta ha comenzado, por lo que la inhibición dependerá del estado catalítico del complejo, proceso que ocurre cuando la enzima se encuentra en su conformación “desactivada” (51).

A nivel molecular, la metformina provoca la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, siendo este una proteína quinasa que funciona como indicador, detectando el estado de energía celular al monitorear los niveles de AMP, ADP y ATP) y la reducción del AMPc como resultado de un aumento en las proporciones de ADP: ATP y AMP: ATP secundario a la inhibición del complejo de la cadena respiratoria (51, 77).

Entre las teorías se indica que la metformina podría penetrar en las mitocondrias, encontrándose en primer lugar que la mitocondria acumula y mantiene un potencial eléctrico que impulsa la acumulación de moléculas cargadas positivamente, provocando que este compuesto que se encuentra cargado positivamente a pH fisiológico entre y salga de las células por la presencia de transportadores como transportadores de cationes orgánicos (OCT) y transportadores de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE), pero no ha sido encontrado ningún portador específico para la metformina o que se genere una acumulación lenta en la matriz mitocondrial debido a una lenta permeación del fármaco a través de la membrana (79).

Esta hipótesis se contradice con varias observaciones debido a que por lo que se ha podido encontrar no se encuentra respaldada con mediciones directas, no es consistente con datos farmacocinéticos y requeriría un transportador que aún no se ha descubierto (79), los componentes moleculares con los cuales se realiza este proceso todavía sigue siendo un enigma, ya que se ha demostrado que no altera la integridad estructural de todo el complejo, pero queda por descubrir estas interacciones moleculares entre el fármaco y el complejo I (51).

Entre las acciones que provoca en plaquetas se puede encontrar la disfunción mitocondrial in vitro provocada por la disminución en la actividad del complejo I, el potencial de membrana mitocondrial y la respiración de manera dependiente de dosis y tiempo, además presenta una mayor liberación de lactato y de consumo de glucosa, aunque se destaca que la disminución de la respiración plaquetaria es debida más a la acumulación del fármaco que a la acidosis láctica (80-82), no tiene efectos en la apoptosis de las mismas, provoca un nivel más bajo de producción de ROS y de producción de ROS mitocondrial, inhibe la liberación de mtDNA, la subsiguiente agregación plaquetaria, expresión de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in vivo e in vitro, no altera significativamente el tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, los factores de la coagulación II, V, VII-XII, el peso del coágulo y el recuento de plaquetas (75).

Por otra parte, las plaquetas incubadas a dosis terapéuticas se comportan como las incubadas en solución salina, mostrando que la metformina no aumenta significativamente la acidosis láctica a no ser que se acumule en el interior y en pacientes intoxicados se observa significativamente menor actividad en el complejo I y IV en comparación a controles sanos, disminuyendo en un 20% la actividad del complejo I, resultados diferentes in vitro donde se observó una inhibición mayor (81), aunque estos cambios presentan

discordancias con otros estudios donde solo se encontraba inhibición hacia el complejo I (83).

Finalmente, la metformina inhibe la formación de trombosis arterial y venosa en animales provocando una disminución significativa en la incidencia de embolia pulmonar, reducción de peso y longitud del trombo arterial y venoso, prolongación del tiempo promedio hasta que ocurre la trombosis oclusiva en la vena cava inferior y carótida y una mejora en la viscosidad de la sangre, mostrando que esta presenta un gran potencial que puede ser utilizado como agente antitrombótico al no prolongar significativamente el tiempo de sangrado en ratas normales o diabéticas, efecto que ocurre con la aspirina el fármaco antitrombótico oral más utilizado, pero que todavía amerita más investigación para determinar el mecanismo de acción preciso en la prevención de la trombosis (75).

4.7.2 Complejo II

Denominado complejo II o succinato deshidrogenasa (SDH) o succinato ubiquinona oxidorreductasa (SQR) es considerado el único complejo de la cadena respiratoria que no bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna, cataliza la oxidación del succinato a fumarato junto con la reducción de ubiquinona a ubiquinol, sustrato utilizado por el complejo III; Esta contiene 4 subunidades codificadas por núcleo: succinato deshidrogenasa A (SDHA), succinato deshidrogenasa B (SDHB), succinato deshidrogenasa C (SDHC) y succinato deshidrogenasa D (SDHD) y, a diferencia de otros complejos mitocondriales carece de subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (84).

Para llevar a cabo su actividad de transferencia de electrones a ubiquinona y de oxidación de succinato a fumarato, se requieren grupos prostéticos donde el complejo II contiene cinco grupos, entre los que se encuentra el FAD en la subunidad SDHA, tres grupos de FeS unidos en SDHB y un grupo hemo insertado dentro del bolsillo hidrofóbico entre SDHC y SDHD (54, 84).

4.7.2.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial II

Los inhibidores dirigidos a la succinato deshidrogenasa se componen de dos clases distintas de inhibidores, los que interactúan con SDHB, SDHC y SDHD donde se forma el bolsillo de unión para la ubiquinona (Sitio Q) y los que se unen al bolsillo de unión de succinato (85), buscando que el succinato no pueda convertirse a fumarato o la ubiquinona no pueda reducirse a ubiquinol (86).

Los pesticidas constituyen una gran parte de los inhibidores mitocondriales dirigidos hacia el complejo II, su principal acción es influir en el crecimiento de hongos patógenos y su proliferación, razón por la cual son utilizados por casi el 60% de los productores de cereales en el Reunión Unido (86) representados en la Tabla N° 3, además de ser los compuestos con el crecimiento más rápido en términos de nuevos compuestos producidos y lanzados al mercado (87).

Tabla N° 3: Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial II.

Fuente: Elaboración propia Jara S. (2022)

Inhibidores del complejo II		
Clasificación	Compuestos	Referencia
Fungicidas	Fluxapyroxad, Penflufen, Furametpyr, Penthiopyrad, Bixafen, Benzovindiflupyr, Isopyrazam, Sedaxane, Fluindapyr, Inpyrfluxam, Benodanil, Mepronil, Flutolanil, Pydiflumetofen, Isoflucypram, Pyraziflumid, Fenfuram, Fluopyram, Isofetamid, Carboxin, Oxycarboxin, Thifluzamide, Boscalid, Flubenetram	(86, 87)
Pesticida	2,4-Dinitrofenol	(88)
Micotoxina	Ácido β -Nitropropiónico (ácido 3-nitropropiónico, BPA, 3-NPA)	(89)
Antibiótico y antifúngico	ATPenina A5	(90)
Producida en mamíferos	Ácido glutarico, Itacone	(91-93)
Antiespermatogénico y antitumoral	Lonidamina	(94, 95)
Quelante	Tenoiltrifluoroacetona (TTFA)	(96)
Metabolito intermediario	Malato, Oxaloacetato	(97)
Análogo del succinato	Malonato	(98)

4.7.2.1.1 Lonidamina

La lonidamina (LND) fue introducida por primera vez en el año 1979 como un agente antiespermatogénico, posteriormente se descubrió que presentaba actividad antitumoral al interferir con el metabolismo energético, especialmente sobre las mitocondrias tumorales lo que conllevó a que este comenzara a utilizarse en el tratamiento con radioterapia y quimioterapia debido a su actividad anticancerígena al presentar una actividad selectiva contra una gran variedad de tumores (95, 99).

Particularmente inhibe la formación de ubiquinol por el complejo II (SQR) sin bloquear completamente la actividad de SDH el primer paso de la reacción, a concentraciones de LND de 1 mM en mitocondrias aisladas produce una inhibición casi completa de la actividad de SQR, mientras que la actividad de SDH solo se reduce en un 34%, indicando que la actividad que podría estar ocasionando se realiza a través de la interferencia en la reducción de la ubiquinona, probablemente en el sitio de unión de la ubiquinona en SDHC y SDHD -esquemático en la figura N° 6- aunque todavía no se conoce si esta inhibición ocurre por bloqueo directo del sitio de unión de la ubiquinona o por modificaciones alostéricas en la estructura terciaria de SDHC y SDHD (94).

4.7.3 Complejo III

El complejo citocromo bc₁ o ubiquinol: citocromo C oxidorreductasa es una enzima que comprende la parte media de la cadena respiratoria mitocondrial, su estructura se encuentra en la membrana y presenta múltiples subunidades, siendo un total de 11 en cuyo núcleo de cada monómero se encuentran tres subunidades, conteniendo tres subunidades redox, citocromo b, citocromo c₁ y la proteína de FeS, que en su conjunto realizan la transferencia reversible de electrones desde el ubiquinol al citocromo c acoplado a la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna que se logra mediante la captación y liberación dirigida de protones en el sitio de oxidación de ubiquinol (centro P o Q_o) y el sitio de reducción de ubiquinona (centro N o Q_i), ubicados en lados opuestos de la membrana (100, 101), el citocromo b que atraviesa la membrana proporciona los sitios de oxidación de quinol y reducción de quinona a través de dos grupos hemo de tipo B unidos a esta subunidad (bL y bH) (102), esta reacción es bifurcada resultando en que los electrones pasan por dos cadenas diferentes, el aceptor inicial del primer electron del quinol es el grupo [2Fe-2S] de la proteína FeS la cual es reducida, mientras que el otro electron va a reducir el hemo bL que posteriormente es oxidado por el hemo bH que recicla el electron al reducir la ubiquinona a ubiquinol en Q_i (102, 103).

4.7.3.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial III

Los inhibidores del complejo mitocondrial III buscan inhibir la transferencia de electrones y la generación del gradiente de protones bloqueando la síntesis de ATP en la mitocondria, lo que resulta letal para eucariotas (103), este complejo es uno de los objetivos más prometedores en el desarrollo de productos farmacéuticos, en agronomía resulta importante por sus propiedades fungicidas y ser amigables con el medio ambiente, siendo

utilizados numerosos fungicidas llegando a ser el primer lugar para el control de enfermedades en la protección de plantas (103, 104).

Los dos sitios catalíticos que presenta el complejo son los sitios de acción de una amplia gama de inhibidores que pueden clasificarse en dos tipos, clase I que se dirigen al dominio distal del hemo bL e interactúan con la proteína Fe-S reducida, mientras que los de clase II se unen al dominio proximal al hemo bL y no interactúan con la proteína Fe-S (103) o pueden clasificarse si estos son específicos hacia el sitio Qi o Qo como ocurre con la antimicina (Qi), mixotiazol (Qo) y estigmatelina (Qo) (102).

4.7.3.1.1 Atovuona

La atovuona (ATO) es una 2-hidroxi-naftoquinona utilizada por sus propiedades antiprotozoarias, presenta actividad a un amplio espectro de parásitos como *Plasmodium falciparum*, neumonía producida por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis por *Toxoplasma gondii* o en *Theileria* y *Babesia*, así como para el tratamiento contra el hongo *Pneumocystis carinii* (105).

La atovuona inhibe el complejo bc1 de forma competitiva al presentar una estructura similar a Q, acoplándose al sitio activo de Qo -representada en la figura N° 7- y provocando una estabilización de las interacciones hidrofóbicas y de enlaces de hidrógeno con la proteína Rieske, dirigiéndose específicamente al bolsillo de oxidación de ubiquinol en el

centro P del complejo bc1, donde interactúa con la proteína hierro y azufre de Rieske (105, 106).

Este efecto inhibitorio posteriormente se vio investigado aumentando la longitud de la cadena de aquilo que presenta la ATO, pasando a nombrarse Mito-ATO, en este caso el aumento en la longitud de la cadena provoca un cambio al objetivo de inhibición, encontrándose que Mito4-ATO y Mito10-ATO (con una cadena lateral de 4 carbonos y de 10 carbonos respectivamente) provocaran una fuerte inhibición al complejo I y III respectivamente, mientras que Mito12-ATO y Mito16-ATO solo provocaron una inhibición al complejo I (106).

4.7.3.1.2 Antimicina A

La antimicina A (AMA) fue uno de los primeros inhibidores conocidos, es un compuesto químico producido por *Streptomyces kitazawensis* cuyo objetivo mitocondrial es el sitio de reducción de ubiquinona del complejo citocromo bc1, uniéndose cerca del grupo bH del mismo e inhibiendo la oxidación del ubiquinol en la cadena de transporte de electrones, lo que bloquea la transferencia de electrones mitocondriales entre el citocromo b y c, llevando a un colapso del gradiente de protones y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial por lo que puede ser utilizado como marcador del sitio Q_i - representado en la figura N°7- (100, 107).

A través de este inhibidor se destacó que el complejo III podría desempeñar un papel específico en la regulación de la autofagia, ya que esta es utilizada como un mecanismo de reciclaje de energía y material en condiciones de estrés y podría regular un evento de señalización en la autofagia proceso que destaca en plaquetas al ocurrir tanto la autofagia general como selectiva, además de ser esencial para sus funciones celulares, hemostasia y la trombosis. Siendo de importancia para intervenciones terapéuticas contra enfermedades trombóticas oclusivas (108).

El tratamiento con AMA puede inhibir la autofagia al reducir la autofagia basal y al ser independiente de la reducción de ATP y ROS, sin presentar relación la reducción de los niveles de ATP para que AMA inhiba la autofagia y mostrando que no tiene efectos obvios sobre ROS (107). En plaquetas no presenta un efecto significativo en la secreción de gránulos densos al no comprometer a P-selectina un marcador de la secreción de gránulos, no provoca una disminución de la activación de integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, ni una caída significativa de ROS, no disminuye la formación de trombos lo que se puede atribuir a la liberación deficiente de ADP, mostrando que no presenta un impacto significativo en el nivel de ATP celular en las plaquetas, llevando a pensar que la generación de ATP es prescindible para la activación, agregación y actividad procoagulante de las integrinas plaquetarias para este inhibidor, por otra parte, aumentó la liberación de lactato en las plaquetas estimuladas con trombina (109).

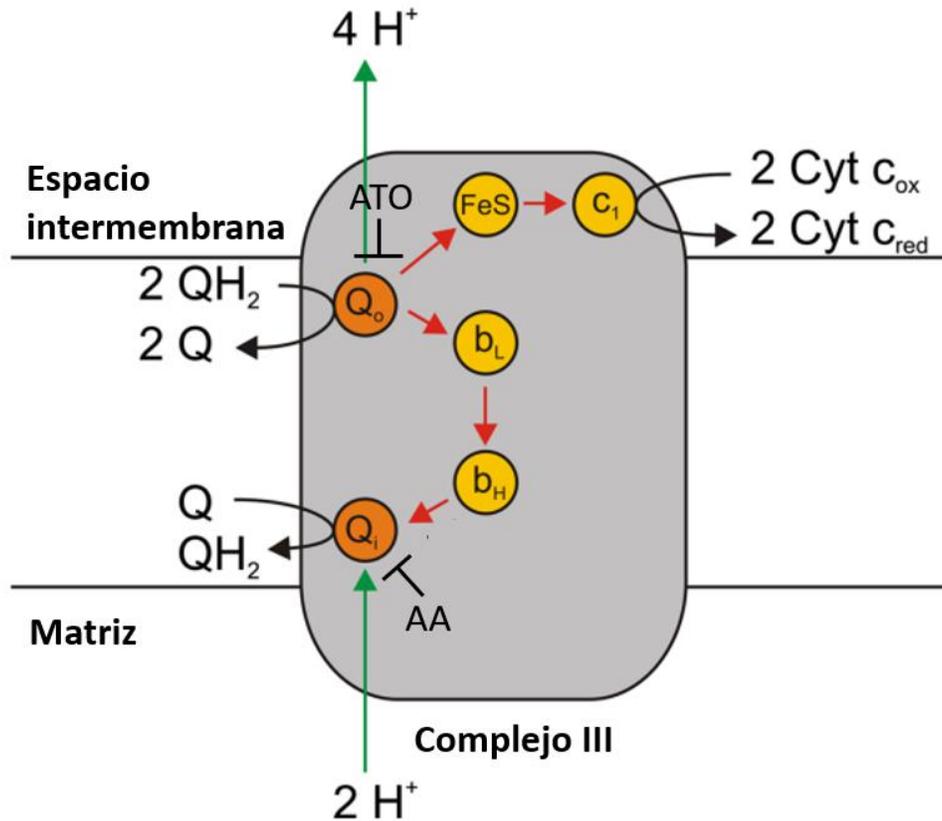


Figura N° 7: Representación del sitio de inhibición de AA y ATO en el complejo III. AA se une al sitio de reducción de quinona Q_i , mientras que ATO se une al sitio activo de Q_o . Tomado y adaptado de Labs, M. 2016. (110)

4.7.4 Complejo IV

El complejo IV o también denominado citocromo-c-oxidasa (COX) consta de 14 subunidades en mamíferos desde que NUDFA4 una estructura anteriormente asignada al complejo 1 se ha añadido actualmente como una subunidad COX periférica que se encuentra débilmente unida (111), este es el cuarto de 5 complejos que forman la cadena respiratoria mitocondrial, realizando la transferencia de electrones del citocromo C

reducido (CYTc) al aceptor final de electrones junto con la reducción de oxígeno molecular a H₂O mientras bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna, proceso oxidativo propuesto como un marcador clave de la función mitocondrial. (44, 112)

El citocromo C se acopla al dominio del espacio intermembrana de COX2 que contiene un centro de cobre denominado CuA que acepta los electrones; posteriormente, los electrones pasan a un grupo hemo a en COX1, luego a un sitio hemo a₃-CuB y finalmente al oxígeno, que se reduce a agua (113).

4.7.4.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial IV

4.7.4.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico participa en procesos fisiopatológicos como la neurotransmisión, vasodilatación, inflamación, agregación plaquetaria y apoptosis; es considerado un potente inhibidor de carácter reversible que actúa tanto en el complejo I y IV (114), efecto que provoca a concentraciones bajas donde inhibe específicamente al complejo IV, mientras que a concentraciones altas este es capaz de inhibir al complejo I, II y III, ya sea nitrosilando u oxidando los tioles de proteínas y eliminando el hierro de los centros Fe-S (115).

Los efectos que suceden al añadir NO exógenamente a través de donadores de NO (SNAP y SNP) en plaquetas mostraron que su acción ocurre de manera dependiente a la dosis, ya sea inhibiendo la agregación de plaquetas inducida por ADP como por colágeno en concentraciones de 5 a 50 mM, además de reducir la liberación de serotonina (115), afectando la función plaquetaria y la formación de coágulos sanguíneos (116). También se debe tener en cuenta que las plaquetas pueden contener NO sintasa y la producen en cantidades significativas lo que puede llevar a pensar que este puede actuar como un regulador de la producción de energía, aunque se debe destacar que entre estos donantes de óxido nítrico el SNAP no provocó un cambio en la glucólisis de plaquetas intactas (115).

4.7.5 Complejo V

El complejo V o FoF1-ATP sintasa presenta como función principal el hacer uso de la fuerza motriz de protones generada en los procesos anteriores para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, su estructura está compuesta por dos subcomplejos: el subcomplejo FO incrustado en la membrana -a través del cual fluyen los protones- y el subcomplejo F1 soluble, este último siempre está compuesto por tres copias de subunidades α y β (que llevan los sitios de unión de nucleótidos) y una de cada una de las subunidades γ , δ y ϵ (que constituyen el tallo central del complejo, siendo la subunidad α y β homólogas pero solo la subunidad β catalítica -representado en la figura N° 8 (5,4).

La forma de producción de ATP es debida a un proceso de rotación de sus subunidades, donde la energía electroquímica que ha sido contenida en el gradiente de protones se vuelve energía mecánica al rotar las subunidades y nuevamente en energía química como ATP, este mecanismo está constituido por un anillo de subunidades C asociadas al tallo central

donde se genera torsión y cambios conformacionales en el dominio catalítico $\alpha_3\beta_3$ de la parte F1 para sintetizar ATP (117).

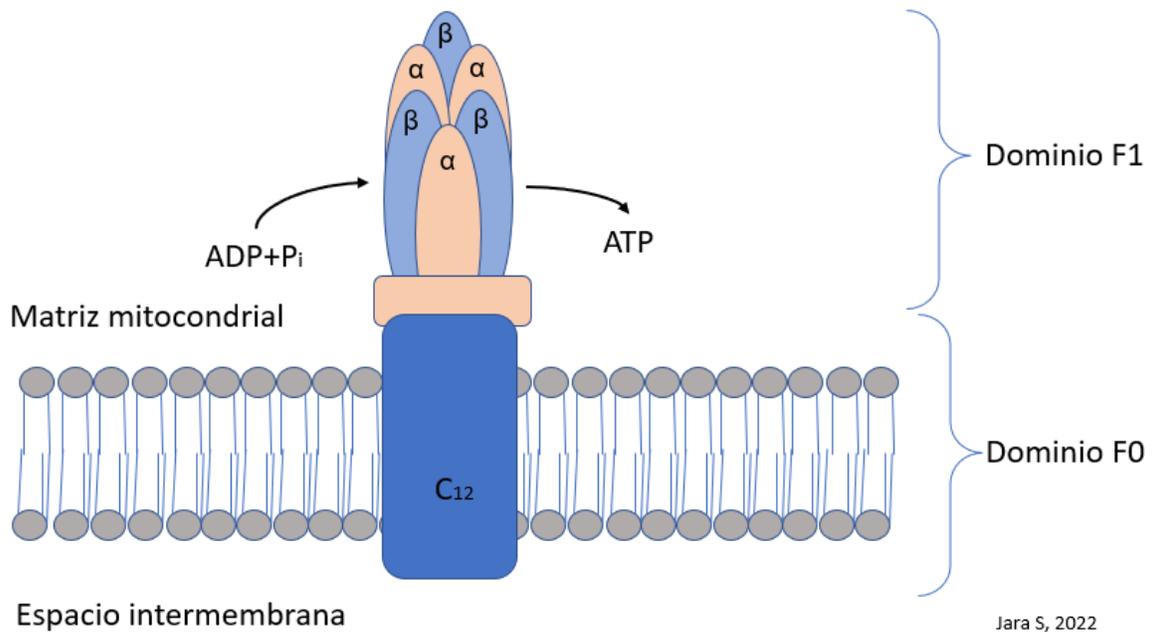


Figura N° 8: Estructura de la ATP sintasa. El complejo F1 se encuentra sobre la membrana con los dímeros $\alpha\beta$ y cada una de las subunidades γ , δ y ϵ , los protones circulan a través de las subunidades C donde se genera la torsión. Elaboración propia Jara S. (2022).

Otros estudios también han encontrado una segunda función para este complejo que consiste en generar corrientes dependientes de Ca^{2+} lo cual formaría poros de transición de permeabilidad dependientes de Ca^{2+} , involucrados en las primeras etapas de la muerte celular (117).

4.7.5.1 Inhibidores dirigidos al complejo mitocondrial V

Entre los usos que presentan los inhibidores dirigidos hacia FoF1 ATP sintasa se encuentra su acción como antimicrobianos, aunque debido al aumento de cepas resistentes se ha dado lugar a una mayor investigación de estos compuestos con el objetivo de identificar inhibidores que no presenten efectos adversos (prolongar el intervalo QT, hepatotoxicidad o miopatía) y no presenten resistencia, sucesos que ocurren en estos inhibidores (118).

Entre los inhibidores dirigidos a este complejo -descritos en la Tabla N° 4- se encuentran quienes se unen a sitios específicos de la Fo/F1 sintasa, siendo la oligomicina el ejemplo más utilizado para referirse a estos inhibidores cuya acción es unirse a la subunidad C de la Fo/F1 sintasa (119), además pueden encontrarse los desacopladores que como su nombre indica inhiben el acoplamiento entre el transporte de electrones y las reacciones de fosforilación, encontrándose entre ellos el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona o CCCP un desacoplador clásico de la OXPHOS (120).

Tabla 4: Inhibidores dirigidos hacia el complejo V.

Fuente: Elaboración propia Jara S. (2022)

Clasificación	Compuestos	Referencia
Péptidos y no péptidos	Melitina, melitina-amida, efrageptina, leucinostatina, ascafina-8, aureina 2.2, aureina 2.3, careina 1.8, careina 1.9, citropina 1.1, dermaseptina, maculatina 1.1, maganina II, MRP, anoplina, cupienina 1A, laticina 1, laticina 3A, laticina 5, melitina, pandinina 2, Aurovertina A-T, Oligomicina y derivados: 33-azidooligomicina A, 33-triazoliloligomicina A, 33-O-formiloligomicina A, 33-dehidrooligomicina A, 7S-dihidrooligomicina A, 7S 11R-tetrahidrooligomicina A, derivado de Tri-O-acetilo, YO-001A, Venturicidina A, B y C, Poligodial, Tomatidina y sus derivados, efrageptina D-F, yaku'amida A, ent-yaku'amida A, yaku'amida B, pretioviridamida, tioviridamida, tioalbamida, neotioviridamida, tioholgamissde A, tioestreptamida S87, JBIR-140, pretioviridamida, tioholgamida B, tioestreptamida S4, leucinostatinas (LCS-A y LCS 7)	(118, 119, 121)
Fenoles y polifenoles	Resveratrol, genisteina, piceatanol, quercetina, quercetina-3-β-D glucósido, proantocianidinas, flavonoles, polifenoles de cacao, bioflavonoides: silimarina, baicaleína, silibinina, rimantadina, amantidina, epicatequian; hidroquinona, dihidrotimoquinona, catecol, resorcinol, timoquinona, dihidromiricetina, curcumina, alquifosfocolina, erucilfosfohomocolina, dimetoxicurcumina	(118)
Catiónicos	alquifosfocolinas, rosamine, gboxin	(121)
Ligandos endógenos	Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), HAMLET, 3-yodotironamina, A-KG, 2-HG	
Moléculas pequeñas	Citreoviridina, nerolidol, deglucoruscina	
Moduladores sintéticos	Benzodiazepina (Bz)-423, PK11195, JM-20, dexpramipexol, leflunomida, J147, ATR-101, BRB06584, 8-CL-adenosina, sorafenib, Apt63	

4.7.5.1.1 Oligomicina

La oligomicina es un potente inhibidor de la ATP sintasa reconocido desde 1958 (122), el sitio de unión de esta corresponde a la subunidad C ubicada en el canal de protones en la porción Fo, cuyo efecto resulta en un bloqueo de la translocación de protones, esta unión ocurre debido a que en su estructura presenta un anillo de lactona macrocíclico que juega el papel principal en las interacciones con Fo, pero también una fracción desoxiazúcar involucrada en la unión (122), la unión de la oligomicina, por otra parte, puede realizarse por la unión de varias moléculas de oligomicina mediante hélices α de subunidades C adyacentes lo que impediría el flujo de protones a través de Fo y bloquearía tanto la síntesis como hidrólisis de ATP (119).

El efecto encontrado en plaquetas estimuladas con trombina o colágeno y este inhibidor muestra un compromiso en la liberación de ATP y la expresión superficial de P-selectina, así como la interacción plaqueta-neutrófilo estimulada por TRAP (posiblemente por la externalización deficiente de P-selectina), por otra parte no presenta una reducción significativa en los niveles intracelulares de ROS, un retraso significativo en la formación del coagulo de fibrina ni en la agregación inducida por trombina o colágeno, mostrando que no tuvo un efecto significativo sobre el nivel de ATP celular en las plaquetas (109).

4.7.5.1.2 Resveratrol

El resveratrol es un producto natural polifenólico compuesto por dos anillos de fenol unidos entre sí por un puente de etileno -Representado en la figura N°9- (123), es clasificada como una fitoalexina ampliamente presente en el vino tinto y varios frutos que forman parte de la dieta como el maní, uvas, moras y cacahuets que presenta poca o ninguna toxicidad incluso a dosis altas; estas sustancias se caracterizan por tener bajo peso molecular y poseer la propiedad de inhibir el progreso de enfermedades e infecciones, tener propiedades anticancerígenas, antimutagénicas, antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes, incluida la inhibición de la agregación plaquetaria (124).

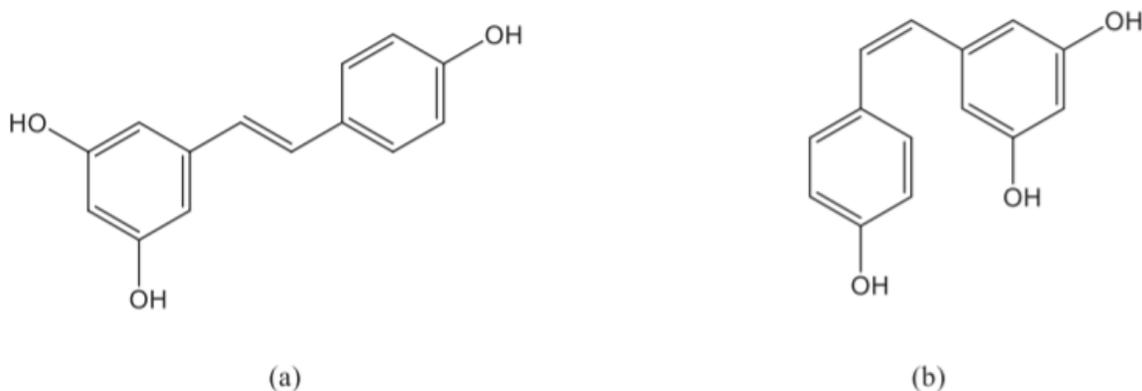


Figura N° 9: Estructura química de resveratrol con su configuración trans (a) y cis (b): Este polifenol posee dos anillos de fenol unidos entre sí por un puente de etileno, en términos de prevalencia la forma trans se encuentra dominante y es la que principalmente se atribuye las propiedades de este producto. Tomado y adaptado de Tian, B. 2019. (123).

Entre sus propiedades inhibe simultáneamente la agregación plaquetaria y estimula la apoptosis plaquetaria, presentando un gran potencial terapéutico en pacientes con condiciones trombóticas o trombocitosis al prevenir la coagulación patológica (125), encontrándose que principalmente inhibe proteínas asociadas a la membrana, como la ATPasa FOF1, inhibiendo su actividad tanto en cerebro como hígado de rata y también actuando en otras proteínas de la cadena transportadora de electrones, reduciendo en alrededor del 20% la actividad del complejo III, además esta aumenta los niveles de AMP/ADP en relación con el ATP lo que presuntamente podría inducir la estimulación de la proteína AMPK, explicándose de esta forma el efecto pleiotrópico del resveratrol y sus beneficios para la salud (126).

Otra temática a destacar es que las ROS celular y mitocondrial se elevan durante el almacenamiento de las plaquetas, efecto que suele ocurrir en plaquetas para transfusión y se presupone que esto es causado por el estrés oxidativo, con esto como base en otro estudio se encontró que no se vio alterado el volumen plaquetario, el recuento de plaquetas, los niveles de pH y glucosa con el tiempo en plaquetas tratadas con resveratrol, además de evitar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial durante el almacenamiento, encontrándose una mejoría en la senescencia plaquetaria (127).

Finalmente siendo clasificados los efectos de este componente en dos grupos, cuando es ejercida a bajas dosis ($< 50 \mu\text{M}$) y las ejercidas a altas dosis ($> 50\mu\text{M}$). En primer lugar, a bajas dosis aumenta la biogénesis mitocondrial, disminuye la producción de ROS en mitocondrias e induce sobreexpresión de superóxido dismutasa de manganeso, actuando como una molécula antioxidante. En segundo lugar, las dosis altas de resveratrol promueven la disfunción mitocondrial in vivo y la actividad prooxidante de este fitoquímico (126).

4.7.6 Otros inhibidores

4.7.6.1 Peroxinitrito (ONOO⁻)

Esta molécula posee la capacidad inhibitoria de múltiples complejos, específicamente se ha encontrado que presenta capacidad inhibitoria del complejo I, II, V y menormente del complejo III y IV (128), en plaquetas a una concentración de 100 uM presenta una inhibición en la secreción de alrededor de un 60% mientras que solo un 30% en la agregación, a 200 uM inhibió en un 12% la citocromo oxidasa, 20% succinato deshidrogenasa y un 30% la NADH-ubiquinona oxidoreductasa, inhibe la secreción de gránulos densos más fuertemente que la agregación y presenta un efecto inhibitor sobre la secreción de plaquetas (no sobre la agregación) que se puede atribuir a la reducción en la producción de energía mitocondrial (129).

4.7.6.2 Nitrito

El nitrito (NO₂) es un metabolito bioactivo del NO, el cual es considerado como una reserva endocrina del NO en sangre y tejidos, por otra parte, los efectos fisiológicos en mitocondrias in vitro son la generación y reducción de nitrito, regular la función mitocondrial a través de la nitrosilación de la citocromo C oxidasa y la S-nitrosación del complejo I (130), no presenta efectos sobre la agregación plaquetaria a concentraciones fisiológicas, pero ocasiona una inhibición significativa al añadir eritrocitos a plasma rico en plaquetas (20% hematocrito) a concentraciones de nitrito de 0,1 a 10 mM, no produce inhibición de la agregación inducida por colágeno; sin embargo en presencia de eritrocitos

a 0,1mM el NO₂ inhibe la agregación, la liberación de ATP de las plaquetas y la expresión de P-selectina, que puede ser explicado por la reducción del nitrito a NO que es aumentada en una condición desoxigenada lo que podría ayudar a promover el flujo sanguíneo en condiciones de hipoxia (131).

4.7.6.3 MPP⁺

MPP⁺ corresponde al ion 1-metil-4-fenilpiridinio, un compuesto causante de toxicidad neuronal que presenta acción en la cadena respiratoria mitocondrial, este afecta significativamente la agregación inducida por agonistas tanto en sangre total como en plasma rico en plaquetas, así como una inhibición de la liberación de ATP de los gránulos densos cuyos efectos no estaban relacionados con la citotoxicidad no específica de MPP⁺, en cambio, no ocasiona un cambio en el nivel de glutatión intracelular ni en el nivel basal de Ca⁺² citoplasmático (132).

5. CONCLUSIONES

Las plaquetas desempeñan un rol de gran importancia implicándose en la hemostasia y trombosis, encontrándose implicadas en la fisiopatología de enfermedades trombóticas y trastornos hemorrágicos, al interior de estas se pueden encontrar las mitocondrias una de las fuentes energéticas más importantes de las mismas donde ocurren los procesos necesarios para que estas actúen rápidamente en caso situaciones de estrés.

Existen medicamentos para prevenir la formación de trombos que buscan evitar que la plaqueta obtenga la energía necesaria para actuar en situaciones de estrés, pero la frecuencia en la que ocurren ECV ha ido en aumento. La importancia de las interacciones entre compuestos antiagregantes plaquetarios y su efecto mitocondrial marca una gran diferencia en próximos usos contra eventos trombóticos, aunque uno de los principales motivos por los que no son utilizados abiertamente recaen en su incapacidad de evitar que ocurran hemorragias durante el tratamiento, siendo la gran limitación de las terapias antitrombóticas actualmente utilizadas.

Por ello, los anticoagulantes con propiedades inhibitorias de OXPHOS presentan como objetivo mayormente al complejo I y el complejo III, dentro de estas la metformina presenta un uso más allá del tratamiento habitual al inhibir la formación de trombos incluso in vivo, presentando un gran potencial como agente antitrombótico, aunque se requiere conocer el mecanismo que lo ocasiona. Por otra parte, los inhibidores del complejo III estudiados no resultan suficientes para lograr una inhibición de trombos por ellos mismos. En cambio, el inhibidor del complejo V resveratrol resulta prometedor en tratamientos para pacientes con condiciones trombóticas o trombocitosis al inhibir la agregación y estimular

la apoptosis, efectos que con una mayor investigación puede llevar al desarrollo de una terapia antiplaquetaria que presente menos efectos secundarios y a la vez una mayor comprensión de la actividad antitrombótica, ya que el inhibidor más conocido de este complejo (Oligomicina) no presenta un efecto antiagregante significativo. Por esto, es de gran importancia en investigación clínica conocer la función específica que presenta cada compuesto y de esta forma tener en cuenta el uso que pueden tener en la prevención de las enfermedades cardiovasculares y su posible uso en tratamientos.

Finalmente, es necesario destacar que es fundamental la inhibición simultánea de la producción de ATP glucolítico y ATP oxidativo, debido a que la respuesta plaquetaria logra ser mantenida por el ATP glucolítico y este mantiene las funciones de agregación, ya que existe la problemática de que inhibidores a altas concentraciones causan disfunción mitocondrial, presentan toxicidad y cambios en los niveles de ROS, mientras que a concentraciones menores como las utilizadas normalmente en el tratamiento de pacientes no ocurren alteraciones en la inhibición.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Engbers MJ, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. Venous thrombosis in the elderly: incidence, risk factors and risk groups. *J Thromb Haemost.* 2010;8(10):2105-12.
2. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology.* 2020;76(25):2982-3021.
3. Cardiovascular diseases [Internet]. Who.int. [citado el 23 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/>.
4. McEwen BJ. The influence of diet and nutrients on platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(2):214-26.
5. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. Who.int. [cited 23 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
6. Young JA, Tolentino M. Stroke evaluation and treatment. *Top Stroke Rehabil.* 2009;16(6):389-410.
7. Fuentes F, Palomo I, Fuentes E. Platelet oxidative stress as a novel target of cardiovascular risk in frail older people. *Vascul Pharmacol.* 2017;93-95:14-9.
8. Chung I, Lip GY. Virchow's triad revisited: blood constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(5-6):449-54.
9. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *European Heart Journal.* 2005;26(1):3-4.
10. Smyth SS, Whiteheart S, Italiano JE, Bray P, Coller BS. Platelet Morphology, Biochemistry, and Function. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, et al., editors. *Williams Hematology, 9e.* New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.
11. Hoffman M. 8 - Regulation of Hemostasis and Thrombosis. In: Brown DL, editor. *Cardiac Intensive Care (Third Edition).* Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 81-9.e2.

12. Janmey PA, McCulloch CA, Miller RT. Extracellular Regulation of Cell-to-Matrix Adhesion. In: Bradshaw RA, Stahl PD, editors. *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press; 2016. p. 192-8.
13. Ludhiadch A, Muralidharan A, Balyan R, Munshi A. The molecular basis of platelet biogenesis, activation, aggregation and implications in neurological disorders. *Int J Neurosci*. 2020;130(12):1237-49.
14. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34-45.
15. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(3):166-79.
16. Melchinger H, Jain K, Tyagi T, Hwa J. Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:153.
17. Sopova K, Tatsidou P, Stellos K. Platelets and platelet interaction with progenitor cells in vascular homeostasis and inflammation. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(5):555-62.
18. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(3):299-309.
19. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-8.
20. Yau JW, Teoh H, Verma S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15:130.
21. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2331-6.
22. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17(11):1423-36.
23. Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2011;8(9):502-12.
24. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J*. 2017;38(11):785-91.
25. Flood VH, Scott JP. 38 - Bleeding and Thrombosis. In: Kliegman RM, Lye PS, Bordini BJ, Toth H, Basel D, editors. *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*: Elsevier; 2018. p. 682-700.e1.

26. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359(9):938-49.
27. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet*. 2005;365(9465):1163-74.
28. López JA, Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thromb Res*. 2009;123 Suppl 4:S30-4.
29. Stone JR. Chapter 4 - Diseases of Small and Medium-sized Blood Vessels. In: Buja LM, Butany J, editors. *Cardiovascular Pathology (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 125-68.
30. Olaf M, Cooney R. Deep Venous Thrombosis. *Emerg Med Clin North Am*. 2017;35(4):743-70.
31. Wang L, Li Y, Guo R, Li S, Chang A, Zhu Z, et al. Optimized bioluminescence analysis of adenosine triphosphate (ATP) released by platelets and its application in the high throughput screening of platelet inhibitors. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223096.
32. Rawat V, Browne M, Bellringer M, Greer N, Kolandai-Matchett K, Rockloff M, et al. A tale of two countries: comparing disability weights for gambling problems in New Zealand and Australia. *Qual Life Res*. 2018;27(9):2361-71.
33. Elsevier. Gómez Ayala A-E. El paciente en tratamiento con antiagregantes plaquetarios. *Farm prof (Internet)*. 2007;21(11):36-42.
34. De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Broos K, Salles, II, Deckmyn H. Antiplatelet drugs. *Br J Haematol*. 2008;142(4):515-28.
35. Spectre G, Varon D. New antiplatelet agents. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(5):365-70.
36. Di Minno MND, Guida A, Camera M, Colli S, Di Minno G, Tremoli E. Overcoming limitations of current antiplatelet drugs: a concerted effort for more profitable strategies of intervention. *Annals of medicine*. 2011;43(7):531-44.
37. Benimana O, Zhao L, Kong Y, Li Z, Xie Z. The progress in the research of antiplatelet agents (1995-2017). *Future Med Chem*. 2017;9(10):1087-110.
38. McFadyen JD, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;15(3):181-91.
39. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.

40. Hearne A, Chen H, Monarchino A, Wiseman JS. Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicol In Vitro*. 2020;67:104907.
41. Ravi S, Chacko B, Sawada H, Kramer PA, Johnson MS, Benavides GA, et al. Metabolic plasticity in resting and thrombin activated platelets. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123597.
42. Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med*. 2004;25(4):365-451.
43. Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, Mirandola P, Galli D, Vitale M, et al. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
44. Mansilla N, Racca S, Gras DE, Gonzalez DH, Welchen E. The Complexity of Mitochondrial Complex IV: An Update of Cytochrome c Oxidase Biogenesis in Plants. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
45. Griffiths LA, Flatters SJ. Pharmacological Modulation of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy. *J Pain*. 2015;16(10):981-94.
46. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019;8(7).
47. Lepropre S, Kautbally S, Octave M, Ginion A, Onselaer MB, Steinberg GR, et al. AMPK-ACC signaling modulates platelet phospholipids and potentiates thrombus formation. *Blood*. 2018;132(11):1180-92.
48. Zhang Y, Ye J. Mitochondrial inhibitor as a new class of insulin sensitizer. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2(4):341-9.
49. Wang L, Wu Q, Fan Z, Xie R, Wang Z, Lu Y. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(6):1213-23.
50. Barile CJ, Herrmann PC, Tyvoll DA, Collman JP, Decreau RA, Bull BS. Inhibiting platelet-stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2539-43.
51. Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:294.
52. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(7):902-14.

53. Holper L, Ben-Shachar D, Mann JJ. Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(5):837-49.
54. Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*. 2018;87:167-227.
55. Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1998;1364(2):222-35.
56. Reil E, Höfle G, Draber W, Oettmeier W. Quinolones and their N-oxides as inhibitors of mitochondrial complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1997;1318(1):291-8.
57. Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*. 2014;462(3):475-87.
58. Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1406-20.
59. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1787(5):384-92.
60. Lazo CR, Guillot TS, Miller GW. Rotenone. In: Aminoff MJ, Daroff RB, editors. *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 74-5.
61. Dao TB, Duong TH, Dao NV, Vo HC, Pham NK, Nguyen HT, et al. Berectones A and B: Two new rotenoids from the aerial parts of *Boerhavia erecta*. *Nat Prod Res*. 2021:1-6.
62. Kitagawa M, Ikeda S, Tashiro E, Soga T, Imoto M. Metabolomic Identification of the Target of the Filopodia Protrusion Inhibitor Glucopiericidin A. *Chemistry & Biology*. 2010;17(9):989-98.
63. Zhou X, Fenical W. The unique chemistry and biology of the piericidins. *The Journal of Antibiotics*. 2016;69(8):582-93.

64. Höllerhage M, Matusch A, Champy P, Lombès A, Ruberg M, Oertel WH, et al. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. *Exp Neurol*. 2009;220(1):133-42.
65. Degli Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D, Estornell E. Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *The Biochemical journal*. 1994;301 (Pt 1)(Pt 1):161-7.
66. Miyoshi H, Ohshima M, Shimada H, Akagi T, Iwamura H, McLaughlin JL. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1998;1365(3):443-52.
67. Pan J, Lee Y, Cheng G, Zielonka J, Zhang Q, Bajzikova M, et al. Mitochondria-Targeted Honokiol Confers a Striking Inhibitory Effect on Lung Cancer via Inhibiting Complex I Activity. *iScience*. 2018;3:192-207.
68. Murai M, Miyoshi H. Current topics on inhibitors of respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2016;1857(7):884-91.
69. Ōmura S, Miyadera H, Ui H, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, et al. An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(1):60-2.
70. Chan K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ. Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(4):655-69.
71. Palorini R, Simonetto T, Cirulli C, Chiaradonna F. Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death. *Int J Cell Biol*. 2013;2013:243876.
72. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8516-25.
73. Srivastava P, Panda D. Rotenone inhibits mammalian cell proliferation by inhibiting microtubule assembly through tubulin binding. *Febs j*. 2007;274(18):4788-801.
74. Sjövall F, Ehinger JK, Marelsson SE, Morota S, Frostner EA, Uchino H, et al. Mitochondrial respiration in human viable platelets--methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion*. 2013;13(1):7-14.

75. Xin G, Wei Z, Ji C, Zheng H, Gu J, Ma L, et al. Metformin Uniquely Prevents Thrombosis by Inhibiting Platelet Activation and mtDNA Release. *Sci Rep*. 2016;6:36222.
76. Bridges HR, Sirviö VA, Agip A-NA, Hirst J. Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase. *BMC Biology*. 2016;14(1):65.
77. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
78. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*. 2000;275(1):223-8.
79. Fontaine E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:753.
80. Piel S, Ehinger JK, Elmér E, Hansson MJ. Metformin induces lactate production in peripheral blood mononuclear cells and platelets through specific mitochondrial complex I inhibition. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;213(1):171-80.
81. Protti A, Lecchi A, Fortunato F, Artoni A, Greppi N, Vecchio S, et al. Metformin overdose causes platelet mitochondrial dysfunction in humans. *Critical care (London, England)*. 2012;16(5):R180-R.
82. Lalau J-D. Lactic Acidosis Induced by Metformin. *Drug Safety*. 2010;33(9):727-40.
83. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;233(2):203-10.
84. Kluckova K, Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(5):552-64.
85. Gao Y, He L, Zhu J, Cheng J, Li B, Liu F, et al. The relationship between features enabling SDHI fungicide binding to the Sc-Sdh complex and its inhibitory activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Management Science*. 2020;76(8):2799-808.

86. Li S, Li X, Zhang H, Wang Z, Xu H. The research progress in and perspective of potential fungicides: Succinate dehydrogenase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2021;50:116476.
87. Sierotzki H, Scalliet G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*. 2013;103(9):880-7.
88. Geisler JG. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. *Cells*. 2019;8(3):280.
89. Scallet AC, Haley RL, Scallet DM, Duhart HM, Binienda ZK. 3-nitropropionic acid inhibition of succinate dehydrogenase (complex II) activity in cultured Chinese hamster ovary cells: antagonism by L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;993:305-12; discussion 45-9.
90. Wojtovich AP, Brookes PS. The complex II inhibitor atpenin A5 protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of mitochondrial KATP channels. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(2):121-9.
91. Lee O, O'Brien PJ. 1.19 - Modifications of Mitochondrial Function by Toxicants. In: McQueen CA, editor. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 411-45.
92. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Kosareva EA, Talanov EY, Gudkov SV, Dubinin MV. Itaconic acid impairs the mitochondrial function by the inhibition of complexes II and IV and induction of the permeability transition pore opening in rat liver mitochondria. *Biochimie*. 2020;176:150-7.
93. Cordes T, Metallo CM. Itaconate Alters Succinate and Coenzyme A Metabolism via Inhibition of Mitochondrial Complex II and Methylmalonyl-CoA Mutase. *Metabolites*. 2021;11(2):117.
94. Guo L, Shestov AA, Worth AJ, Nath K, Nelson DS, Leeper DB, et al. Inhibition of Mitochondrial Complex II by the Anticancer Agent Lonidamine. *J Biol Chem*. 2016;291(1):42-57.
95. Nath K, Guo L, Nancolas B, Nelson DS, Shestov AA, Lee SC, et al. Mechanism of antineoplastic activity of lonidamine. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866(2):151-62.
96. Zhang JG, Fariss MW. Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(4):751-4.

97. Muller Florian L, Liu Y, Abdul-Ghani Muhammad A, Lustgarten Michael S, Bhattacharya A, Jang Youngmok C, et al. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochemical Journal*. 2007;409(2):491-9.
98. Valls-Lacalle L, Barba I, Miró-Casas E, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, García-Dorado D. Selective Inhibition of Succinate Dehydrogenase in Reperfused Myocardium with Intracoronary Malonate Reduces Infarct Size. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2442.
99. Huang Y, Sun G, Sun X, Li F, Zhao L, Zhong R, et al. The Potential of Lonidamine in Combination with Chemotherapy and Physical Therapy in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
100. Huang LS, Cobessi D, Tung EY, Berry EA. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol*. 2005;351(3):573-97.
101. Iglesias DE, Bombicino SS, Valdez LB, Boveris A. Nitric oxide interacts with mitochondrial complex III producing antimycin-like effects. *Free Radic Biol Med*. 2015;89:602-13.
102. Barton V, Fisher N, Biagini GA, Ward SA, O'Neill PM. Inhibiting Plasmodium cytochrome bc1: a complex issue. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2010;14(4):440-6.
103. Crofts AR. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:689-733.
104. Cheng H, Yang L, Liu H-F, Zhang R, Chen C, Wu Y, et al. N-(4-(2-chloro-4-(trifluoromethyl)phenoxy)phenyl)picolinamide as a new inhibitor of mitochondrial complex III: Synthesis, biological evaluation and computational simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(16):127302.
105. Kessl JJ, Lange BB, Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Hill P, Meunier B, et al. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem*. 2003;278(33):31312-8.
106. Cheng G, Hardy M, Topchyan P, Zander R, Volberding P, Cui W, et al. Potent inhibition of tumour cell proliferation and immunoregulatory function by mitochondria-targeted atovaquone. *Sci Rep*. 2020;10(1):17872.

107. Ma X, Jin M, Cai Y, Xia H, Long K, Liu J, et al. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy. *Chemistry & biology*. 2011;18(11):1474-81.
108. Banerjee M, Huang Y, Ouseph MM, Joshi S, Pokrovskaya I, Storrie B, et al. Autophagy in Platelets. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2019;1880:511-28.
109. Kulkarni PP, Ekhlak M, Sonkar VK, Dash D. Mitochondrial ATP generation in stimulated platelets is essential for granule secretion but dispensable for aggregation and procoagulant activity. *Haematologica*. 2022;107(5):1209-13.
110. Labs M, Rühle T, Leister D. The antimycin A-sensitive pathway of cyclic electron flow: from 1963 to 2015. *Photosynth Res*. 2016;129(3):231-8.
111. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landázuri MO, et al. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab*. 2012;16(3):378-86.
112. Brischigliaro M, Zeviani M. Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2021;1862(1):148335.
113. Maghool S, Cooray NDG, Stroud DA, Aragão D, Ryan MT, Maher MJ. Structural and functional characterization of the mitochondrial complex IV assembly factor Coa6. *Life Sci Alliance*. 2019;2(5).
114. Sarti P, Arese M, Bacchi A, Barone MC, Forte E, Mastronicola D, et al. Nitric oxide and mitochondrial complex IV. *IUBMB Life*. 2003;55(10-11):605-11.
115. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Wysocka J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(3):789-803.
116. Maclean JA, Schoenwaelder SM. Chapter 5 - Serotonin in Platelets. In: Pilowsky PM, editor. *Serotonin*. Boston: Academic Press; 2019. p. 91-119.
117. Antoniel M, Giorgio V, Fogolari F, Glick GD, Bernardi P, Lippe G. The oligomycin-sensitivity conferring protein of mitochondrial ATP synthase: emerging new roles in mitochondrial pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):7513-36.
118. Narang R, Kumar R, Kalra S, Nayak SK, Khatik GL, Kumar GN, et al. Recent advancements in mechanistic studies and structure activity relationship of F₀F₁ ATP synthase inhibitor as antimicrobial agent. *Eur J Med Chem*. 2019;182:111644.

119. Pagliarani A, Nesci S, Ventrella V. Modifiers of the oligomycin sensitivity of the mitochondrial F1F0-ATPase. *Mitochondrion*. 2013;13(4):312-9.
120. Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2003;1604(2):77-94.
121. Patel BA, D'Amico TL, Blagg BSJ. Natural products and other inhibitors of F(1)F(O) ATP synthase. *Eur J Med Chem*. 2020;207:112779.
122. Symersky J, Osowski D, Walters DE, Mueller DM. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):13961-5.
123. Tian B, Liu J. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J Sci Food Agric*. 2020;100(4):1392-404.
124. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, et al. [Resveratrol: distribution, properties and perspectives]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2013;48(2):79-88.
125. Lin KH, Hsiao G, Shih CM, Chou DS, Sheu JR. Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):575-85.
126. Madrigal-Perez LA, Ramos-Gomez M. Resveratrol Inhibition of Cellular Respiration: New Paradigm for an Old Mechanism. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):368.
127. Wang L, Xie R, Fan Z, Yang J, Liang W, Wu Q, et al. The contribution of oxidative stress to platelet senescence during storage. *Transfusion*. 2019;59(7):2389-402.
128. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxy nitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2004;1658(1):44-9.
129. Rusak T, Tomasiak M, Ciborowski M. Peroxynitrite can affect platelet responses by inhibiting energy production. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(4):769-76.
130. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010;22(2):64-74.
131. Srihirun S, Sriwantana T, Unchern S, Kittikool D, Noulsri E, Pattanapanyasat K, et al. Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxygenation. *PLoS One*. 2012;7(1):e30380.
132. Lim KM, Kim HH, Bae ON, Noh JY, Kim KY, Kim SH, et al. Inhibition of platelet aggregation by 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion (MPP+) through ATP depletion:

Evidence for the reduced platelet activities in Parkinson's disease. *Platelets*. 2009;20(3):163-70.