



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN EL PROCESO DE ACTIVACIÓN
PLAQUETARIA Y SU RELACIÓN CON LA TROMBOSIS**

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

AUTOR: FELIPE LAGOS CONTRERAS

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

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Proyecto ANID-FONDECYT N° 1220339.

Agradezco a mi familia, que siempre ha sido un apoyo incondicional, en especial a mi madre, que su formación y crianza me llevaron hasta este punto de inflexión crucial de mi vida hacia lo profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	5
5. MARCO TEÓRICO	6
5.1. Plaquetas: Descubrimiento, origen y estructura celular.	6
5.2 Funcionalidad plaquetaria y hemostasia.	8
5.2.1 Activación plaquetaria y trombosis.	8
5.2.2 Secreción de gránulos y su acción	11
5.2.3 Formación del coágulo	12
5.2.4 Hemostasia	12
5.2.5 Papel de las plaquetas en la hemostasia y la trombosis	13
5.3 Generalidades de la mitocondria.	14
5.4 Rol de la mitocondria en la plaqueta: Estructura y funciones.	16
5.4.1 Importancia de la mitocondria en la apoptosis y sobrevivencia plaquetaria.	18
5.5 Disfunción mitocondrial plaquetaria y trombosis.	23
5.6 Inhibidores mitocondriales con actividad antiplaquetaria y antitrombótica.	24
6. CONCLUSIONES	27
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trombopoyesis en megacariocitos.	7
Figura 2. Fases de la respuesta plaquetaria posterior a la lesión vascular.	9
Figura 3. Principales agonistas y proteínas de adhesión en la plaqueta.	10
Figura 4. Mitocondria, estructura general.	15
Figura 5. La fosforilación oxidativa.	16
Figura 6. Complejos de la membrana mitocondrial.	19
Figura 7. Vía intrínseca.	21

1. RESUMEN

La plaqueta proveniente de los megacariocitos a través de la trombopoyesis es el principal actor encargado de mantener la hemostasia, que es aquel mecanismo encargado de mantener el equilibrio entre los procesos de coagulación y fibrinólisis, los cuales reparan fisiológicamente aquellos sucesos en que ocurren daños vasculares. En sitios de lesión vascular, se produce la activación de las plaquetas donde estas ruedan, se adhieren y se unen firmemente, al subendotelio a través de receptores de membrana plaquetaria. La mitocondria en la plaqueta además de la regulación energética por vía de la glucólisis y fosforilación oxidativa regula los procesos trombóticos a través de la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual significaría una gran diana de investigación para la farmacología y la aplicación antitrombótica.

Palabras clave: *Mitocondria, plaquetas, Trombosis, hemostasis, activación.*

2. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son elementos celulares anucleados que poseen un diámetro aproximado de 3 μm , con forma de disco biconvexo, en condiciones normales, provenientes de los megacariocitos, con un rol esencial en la hemostasia.

En un comienzo descritas como partículas inertes, que, sin embargo, hoy en día, por el contrario, se conoce su complejidad constitutiva y bioquímica dada a la variedad de funciones que cumplen en la hemostasia, mecanismo que se encarga de conservar y proteger al sistema cardiovascular de pérdidas exageradas de sangre, ya sea por alteración del endotelio vascular o bien por rupturas o lesiones de la región vascular.

El equilibrio entre los mecanismos pro y antitrombóticos, permite que en condiciones normales las plaquetas circulantes que corresponden alrededor de las dos terceras partes de la masa plaquetaria total, no se adhieran a la superficie endotelial vascular como tampoco entre sí. Cuando este equilibrio se pierde por una lesión endotelial, las plaquetas se adhieren al endotelio y estructuras subendoteliales, generando la activación y agregación de éstas generando, la estructura primordial del tampón hemostático primario.

La respuesta de la activación plaquetaria que originan procesos como la adhesión, cambio de forma, agregación y secreción. Dependen de interacción entre los receptores internos de las plaquetas con sustancias del medio externo. Dentro de los principales receptores con sus ligandos se encuentran, receptores de ADP, receptores de epinefrina, receptores de serotonina, receptores de tromboxano A₂, receptores de vasopresina, receptor del factor activador de plaquetas, receptores de trombina, receptores de colágeno y receptores para la adhesión.

3. OBJETIVOS

Objetivo general: Describir la funcionalidad mitocondrial en el proceso de activación plaquetaria y su relación con la trombosis.

Objetivos específicos:

1. Relacionar los procesos e importancia del funcionamiento mitocondrial en la activación plaquetaria.
2. Establecer la relación mecanística entre la disfunción mitocondrial plaquetaria y la trombosis.

4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

Búsqueda sistemática de fuentes de información a través de internet desde la plataforma Google académico.

La búsqueda y selección de documentos se basó a través de los siguientes criterios:

- ✚ Se comienza la búsqueda con conceptos claves en inglés como “mitochondria, hemostasis, platelets, platelet activation, reactive oxygen species, thrombosis”.
- ✚ El documento debe ser publicado y aceptado en revistas de importancia científica o almacenado en hemerotecas, como, Nature, Science, Blood, Scielo, Pubmed, ELSEVIER.
- ✚ Incluyendo a los documentos que aporten información fundamental y conceptual, con respecto a la temática en cuestión, de preferencia se considerarán de mayor relevancia aquellos documentos publicados desde el 2018.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Plaquetas: Descubrimiento, origen y estructura celular.

Las plaquetas son elementos celulares anucleados que provienen de los megacariocitos. En condiciones normales sin ser activadas poseen la forma de un disco biconvexo, con un diámetro alrededor de 3 μm y en circulación poseen una concentración que varía entre 150.000 y 450.000 plaquetas por μl y tienen una vida media de 7 a 10 días. (1)

Los megacariocitos originan las plaquetas por desprendimiento de fragmentos de su citoplasma. Estas células de la médula ósea son descendientes de una célula pluripotente diploide, la *célula madre* hematopoyética, que puede formar precursores eritroides, granulocíticos y megacariocíticos. Su diferenciación y proliferación hasta la línea megacariocítica es un proceso regulado por numerosas citoquinas y factores de crecimiento hematopoyéticos. (2)

Las plaquetas se originan desde el desprendimiento del citoplasma de los megacariocitos como se observa en la (fig.1). Células que se encuentran en la medula ósea, provenientes de la célula madre hematopoyética, cuyo proceso se ve regulado por citoquinas y factores de crecimiento, así como también han mostrado la capacidad de ser activados por la estimulación de agonistas plaquetarios como por ejemplo la trombina, la epinefrina o el ionóforo de Ca^{2+} A23187. (3-5).

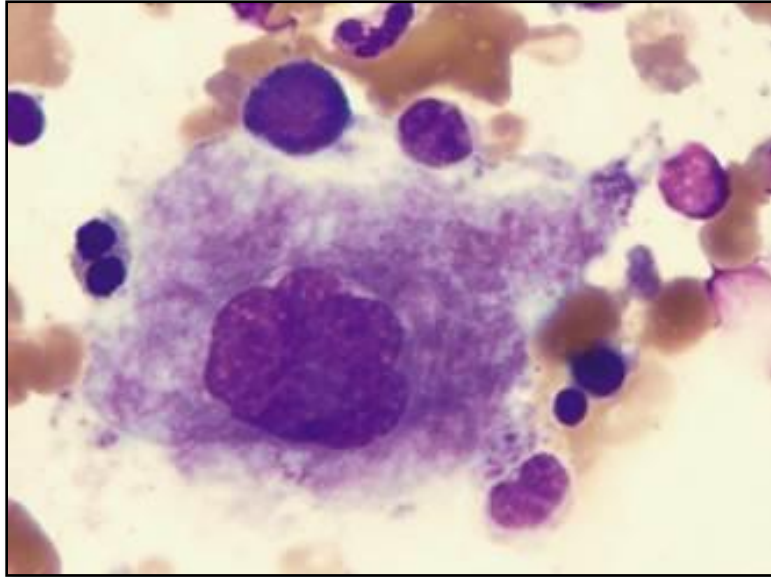


Figura 1. Trombopoyesis en megacariocitos Se desarrolla en la zona vascular de la médula ósea, es decir, el megacariocito migra hasta las sinusoides, donde se favorece la producción de plaquetas. Tomado de Gonzales, A. et al. 2019 (2)

Donde el principal agente responsable de la regulación de la producción de plaquetas es la trombopoyetina (TPO) que se encarga de mantener constante el número normal de plaquetas (6). Gracias a esto la alteración del número de plaquetas como en una transfusión de plaquetas o una trombocitopenia tiende al reestableciendo del recuento normal de plaquetas (7-10). Otros reguladores que incluyen a las interleucinas IL-3, IL-6, IL-11, el factor inhibidor de la leucemia y Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Que promueven la liberación de células hematopoyéticas desde el megacariocito. (8). Por el contrario, esta acción es inhibida por reguladores negativos incluyendo el PF4 y el TGF β . (10, 11).

Las plaquetas pueden poseer diferentes tamaños lo que se asocia a una heterogeneidad intrínseca en los megacariocitos donde el DNA aumentado se asocia a un incremento de tamaño plaquetario que por el contrario un DNA disminuido se traduce en plaquetas de menor tamaño (12). Esta diferencia de tamaños también se asocia a una alteración por el envejecimiento que se menciona como heterogeneidad adquirida, donde el tamaño de las

plaquetas disminuye. Además, el tamaño plaquetario posee una relación lineal con el contenido de ARN que posee (13, 14).

5.2 Funcionalidad plaquetaria y hemostasia.

5.2.1 Activación plaquetaria y trombosis.

En sitios de lesión vascular, visible en la (fig.2) se produce la activación de las plaquetas donde estas ruedan, se adhieren por medio de agonistas y proteínas (fig.3) y se unen firmemente al subendotelio a través de receptores de membrana plaquetaria primarios que son, glicoproteína (GP) VI que se une al colágeno (donde el principal ligando de la GPVI es el colágeno, sin embargo, la laminina y la fibrina también se han considerados como ligandos. (15-18)) y GPIb α principal ligando del complejo GPIb-IX-V, que a su vez se une a factor de von Willebrand y otros ligandos gracias al reconocimiento del factor de von Willebrand y colágeno que se exponen en la pared del endotelio vascular lesionado, donde se desencadena la activación rápida (19-21).

La activación de la integrina α IIb β 3 esta mediada por la proteína calmodulina que se une en el segmento citoplasmático de la GPVI, que es una secuencia de carga positiva que se encuentra cercana a la membrana, además en este segmento está presente los sitios de unión para las quinasas de la familia Src (Fyn y Lyn) a través de una secuencia rica en prolina que se encuentra involucradas en la traducción de señal GPVI dependiente. La GPVI está coasociado con el receptor FcR γ necesario para la expresión superficial de GPVI. El entrecruzamiento de GPVI/FcR γ y la unión a ligandos multivalentes, producen la fosforilación dando lugar a la activación basada en tirosina del inmunorreceptor (ITAM) dentro de la cola citoplásmica de FcR γ por la quinasa de la familia Src, Lyn, Lo que, por consiguiente, resulta en el reclutamiento y ensamble de la tirosina, lo que resulta en la

activación de la fosfolipasa C γ 2 (PLC γ 2). Elevando la concentración del Ca²⁺ citosólico activando la integrina α IIb β 3 (18, 22-27)

El reordenamiento del citoesqueleto y el cambio de forma causado por la activación de las vías de señalización produce que, la afinidad de la integrina plaquetaria α IIb β 3 hacia los ligandos, fibrinógeno, factor de von Willebrand (VWF), fibronectina y vitronectina se vea aumentada. Además, el adenosín difosfato y el tromboxano A2 (TxA₂) secretados por las plaquetas activadas, son agonistas plaquetarios que se unen a los receptores purinérgicos y al receptor tromboxano respectivamente, reforzando la agregación plaquetaria ligada a la integrina α IIb β 3(28, 29).

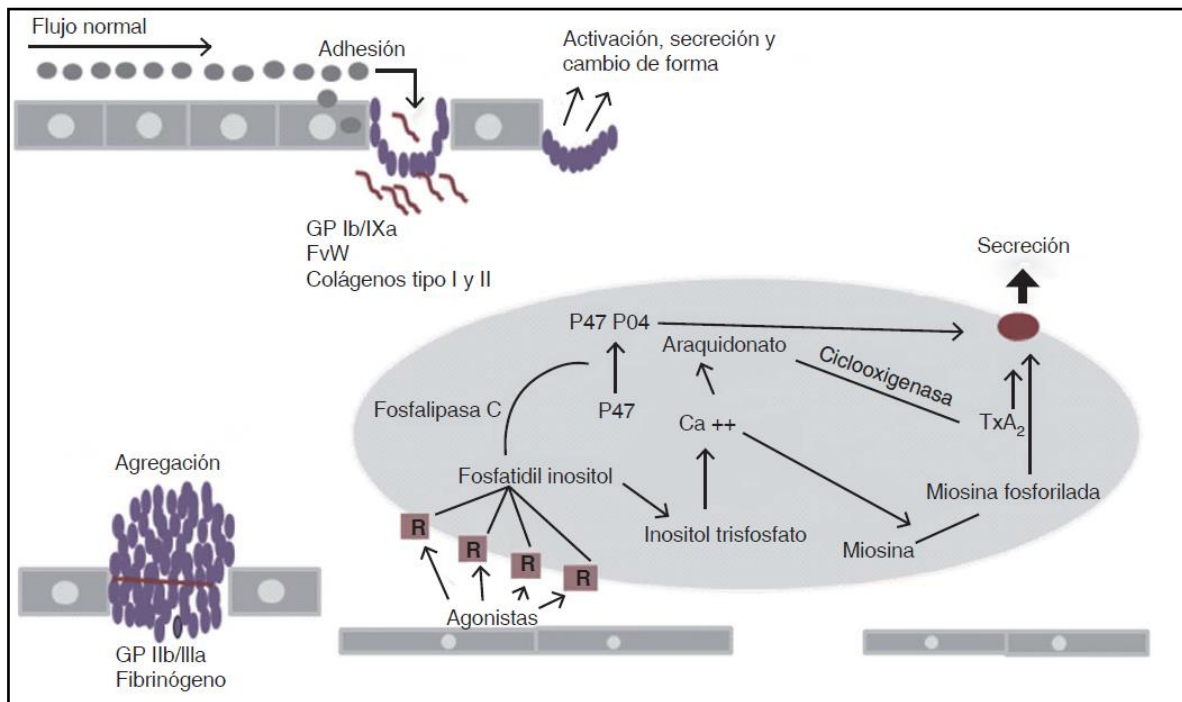


Figura 2. Fases de la respuesta plaquetaria posterior a la lesión vascular. La adhesión plaquetaria al subendotelio está directamente ligada al colágeno, factor de von Willebrand y GPIb/IXa. La agregación depende de la GPIIb/IIIa y el fibrinógeno el factor de unión. La

enzima ciclooxigenasa convierte al araquidonato en tromboxano A₂ (TxA₂) un agente agonista y vasoconstrictor. Tomado de Flores, O. et al. 2014 (30)

La formación de TxA₂ en las plaquetas se produce cuando la fosfolipasa A₂ libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. gracias a las enzimas ciclooxigenasa (COX-1) y tromboxano sintasa, el ácido araquidónico se convierte en TxA₂ (31). Además, la activación plaquetaria potencia la coagulación a través de la expresión de fosfatidilserina (PS) y la liberación de factores procoagulantes que inducen a la generación de trombina y fibrina (32-35).

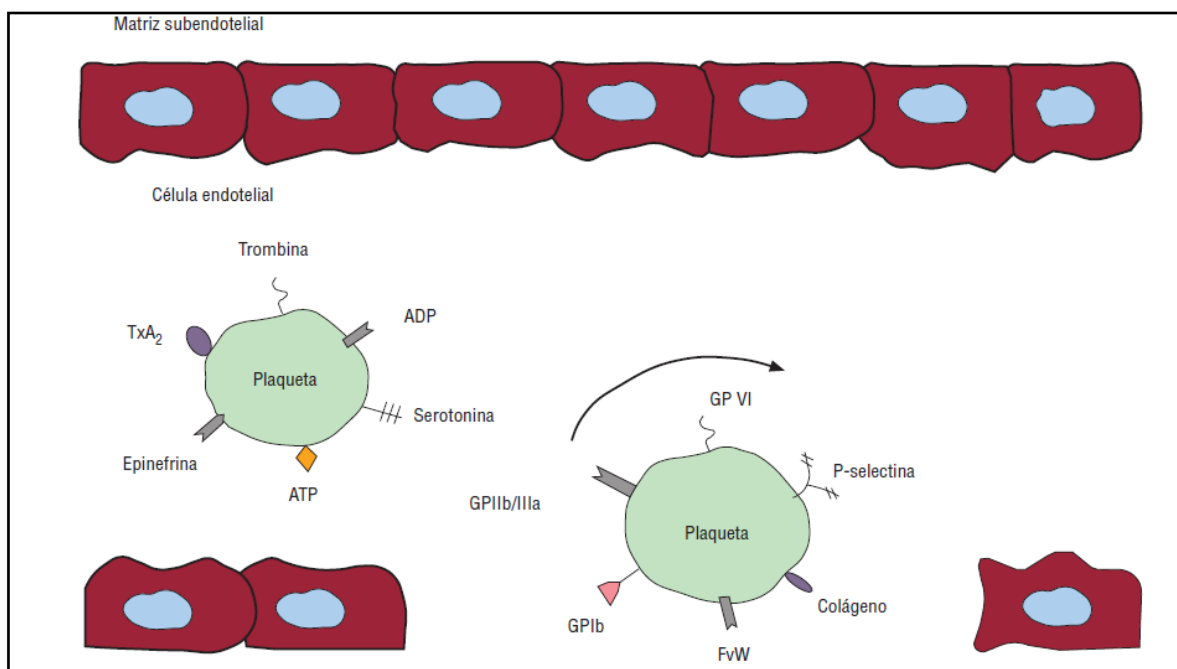


Figura 3. Principales agonistas y proteínas de adhesión en la plaqueta. Estos participan en el proceso de activación plaquetaria. (ADP)adenosín difosfato; (ATP)adenosín trifosfato; (FvW) factor de von Willebrand; (GP) glucoproteína; (TxA₂) tromboxano A₂. Tomado de López, A. et al. 2013 (36)

5.2.2 Secreción de gránulos y su acción

Las GPVI presentes en la activación plaquetaria, conducen a la formación y liberación de TXA₂ y además a la secreción del contenido de los gránulos de almacenamiento densos y alfa (37).

Gránulo denso posee más de 200 moléculas pequeñas que incluyen al calcio, ATP, ADP, 5-HT y epinefrina, éste se une a la membrana plasmática de la plaqueta a través de receptores de proteínas complejos como el VAMP8, donde libera su contenido al espacio vascular extracelular. Resultando en el envío de señales a las plaquetas a través de receptores que poseen en su superficie, uno de ellos es el receptor purinérgico P2Y_x. P2Y₁ y P2Y₁₂ (38).

Gránulo alfa cada plaqueta posee alrededor de 60 a 80 gránulos alfa. Los cuales poseen partículas más grandes, así como proteínas que se liberan a la superficie de la plaqueta, como la P-selectina, que cumple un rol estructural en la formación del trombo ya sea para la atadura entre plaquetas o con células del vaso(38, 39).

Gránulo lisosomal cumple una importante participación en la degradación de la proteína función dada por sus interacciones con la pared vascular y por la degradación de los componentes de la matriz subendotelial. Además, se afirma que probablemente juegan un papel en la cicatrización de heridas después de activación plaquetaria inicial y formación de coágulos(38)

5.2.3 Formación del coágulo

Las plaquetas circulan cerca de la pared del vaso gracias a las propiedades biofísicas que constituyen a la sangre junto con las fuerzas de cizalla dentro del vaso. Lo que permite la acción rápida en respuesta de una lesión vascular, en general esta respuesta ocurre en diferentes etapas comenzando por la adhesión a la matriz extracelular del subendotelio con la interacción de los receptores específicos que incluyen la unión del complejo GP1b/V/IX al factor de Von Willebrand, así como los receptores GPVI y α IIb β 1 al colágeno de la matriz extracelular (1, 40, 41).

Esta adhesión tiene como resultado la transducción de señales hacia la plaqueta que generan la formación inicial de trombos comúnmente llamado tapón plaquetario, que a su vez produce la unión de nuevas plaquetas que se encuentran en circulación, activándose dentro del trombo gracias interacciones plaqueta-plaqueta por el receptor de integrina α IIb β 3(1, 40, 41).

Las plaquetas circulantes y aquellas que no se encuentran del todo asociadas al trombo plaquetario, poseen una retroalimentación positiva para su activación por la presencia secundarias a través de las oxigenasas COX-1 y 12-LOX y la secreción de gránulos, que tienen como resultado la formación del trombo(1, 30, 40, 41)

5.2.4 Hemostasia

La hemostasia es aquel mecanismo encargado de mantener el equilibrio entre los procesos de coagulación y fibrinólisis, los cuales reparan fisiológicamente aquellos sucesos en que ocurre daño vascular. Además, mantiene la sangre en un estado líquido, que permite la circulación en los vasos sanguíneos. La hemostasia primaria es contemplada por las

plaquetas con las fases de adhesión, agregación y liberación del contenido plaquetario. La hemostasia secundaria corresponde a la fase de coagulación, donde los actores principales son los factores de coagulación (42, 43).

Deficiencias en el sistema hemostático se traduce en una tendencia hemorrágica, por otro lado una sobre activación puede resultar en trombosis que ocluye la luz del vaso(44).

Las deficiencias en el sistema hemostático conllevan a patologías, como, púrpuras, que son trastornos en la hemostasia primaria, tales como púrpuras vasculares, donde existe una alteración vascular o púrpuras trombopénicas, causadas por una disminución de la presencia del componente plaquetario donde la patología de mayor relevancia es la trombocitopenia inmune primaria (PTI) causada por autoanticuerpos antiplaquetarios, con una forma infantil y otra crónica presente en adultos; también púrpuras trombopáticas, causadas por un fallo en las características plaquetarias , ya sean congénitas, como el síndrome de Bernard-Soulier y trombostenia de Glanzmann, o adquiridas por ejemplo, hepatopatías, enfermedades renales o por la ingesta de antiplaquetarios(45).

La formación del tapón hemostático en lesiones vasculares en condiciones fisiológicas donde no existe una alteración hemostática se traduce en la recuperación de vaso, pero cuando existe una sobre activación del sistema hemostático produce la formación de las placas ateroscleróticas, las cuales son responsables de las complicaciones tromboembólicas de la aterosclerosis.(31)

5.2.5 Papel de las plaquetas en la hemostasia y la trombosis

El rol principal de las plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo en la hemostasia es detener el sangrado producto de una lesión vascular o traumatismo tisular a través de la

formación del coágulo (46). Las plaquetas además de ejercer su rol hemostático son componentes muy activos en el torrente sanguíneo, por lo que son encargados de modular las condiciones patológicas, por ende, un déficit en su activación o por el contrario una sobre activación generaría sangrados incontrolados o patologías trombóticas respectivamente (47-50).

Cuando las plaquetas son estimuladas por agonistas como el colágeno y la trombina que provocan la secreción del contenido de los gránulos, se produce un cambio de la transbica de los fosfolípidos de la membrana que lleva los fosfolípidos procoagulantes, principalmente la fosfatidilserina (PS), a la superficie de las plaquetas. También se forman micropartículas con actividad procoagulante. El PS expuesto acelera la acción enzimática de la tenasa y protrombinasa de la vía de la coagulación, lo que resulta la generación de trombina. (51). La trombina actúa escindiendo los receptores activados por proteasa en la superficie de las plaquetas(52). Lo que resulta en la activación de GPIIb/IIIa, formación de TxA2 y secreción del contenido de los gránulos. La trombina también convierte el fibrinógeno en fibrina que se forma dentro y alrededor del plaquetas agregadas y da estabilidad al tapón hemostático o trombo (31). Por lo que las plaquetas tienen un rol fundamental en el desarrollo hemostático ya que en cualquier suceso en que la función 'plaquetaria se vea afectada se traduce directamente en la alteración de la hemostasia(50).

5.3 Generalidades de la mitocondria.

Son las centrales energéticas de las células eucariontes, encargadas de la producción de ATP en el metabolismo aeróbico, se localizan en los lugares de mayor requerimiento energético(53). Su estructura visible en la (fig.4) se compone de una membrana externa y una interna, que generan dos compartimentos, el espacio intermembranoso y una matriz central delimitada por la membrana interna(53). La membrana mitocondrial externa es altamente permeable donde se presentan múltiples copias de la proteína denominada porina, formando canales acuosos a través de una bicapa lipídica. El espacio Intermembranoso está situado entre las membranas externa e interna, contiene enzimas que le permiten transferir la energía

del ATP obtenida. Posee una alta concentración de protones debido a la cadena respiratoria(54).

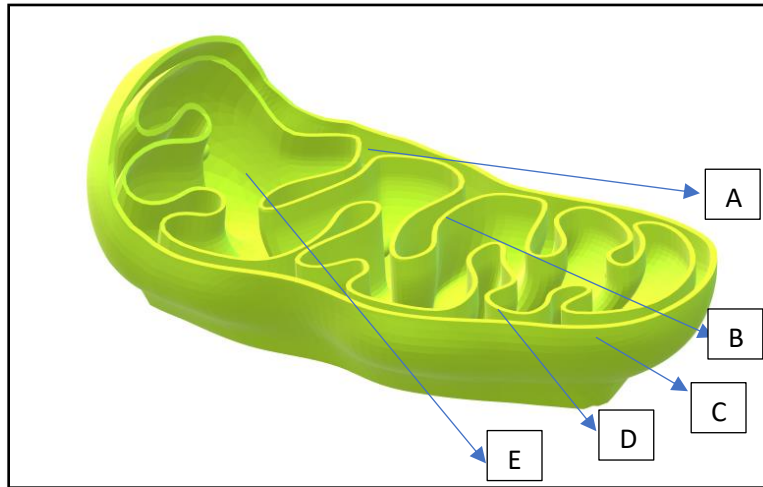


Figura 4. Mitocondria, estructura general. (A) espacio intermembranoso; (B) membrana interna;(C) membrana externa;(D) crestas mitocondriales; (E) Matriz. Elaboración propia Lagos. F. 2022.

La membrana interna es muy impermeable al paso de iones y pequeñas moléculas. Las mitocondrias deben hacer de su membrana interna una barrera suficientemente impermeable como para permitir un gradiente de protones estable. En la matriz se produce el ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos, y por otro lado en la membrana interna tiene lugar la fosforilación oxidativa. La membrana mitocondrial interna y las crestas compartimentarían las funciones metabólicas(53, 54).

En la membrana interna tiene lugar la cadena de transporte de electrones (ETC) El ETC consta de cinco complejos de fosforilación oxidativa (fig.5)(55)

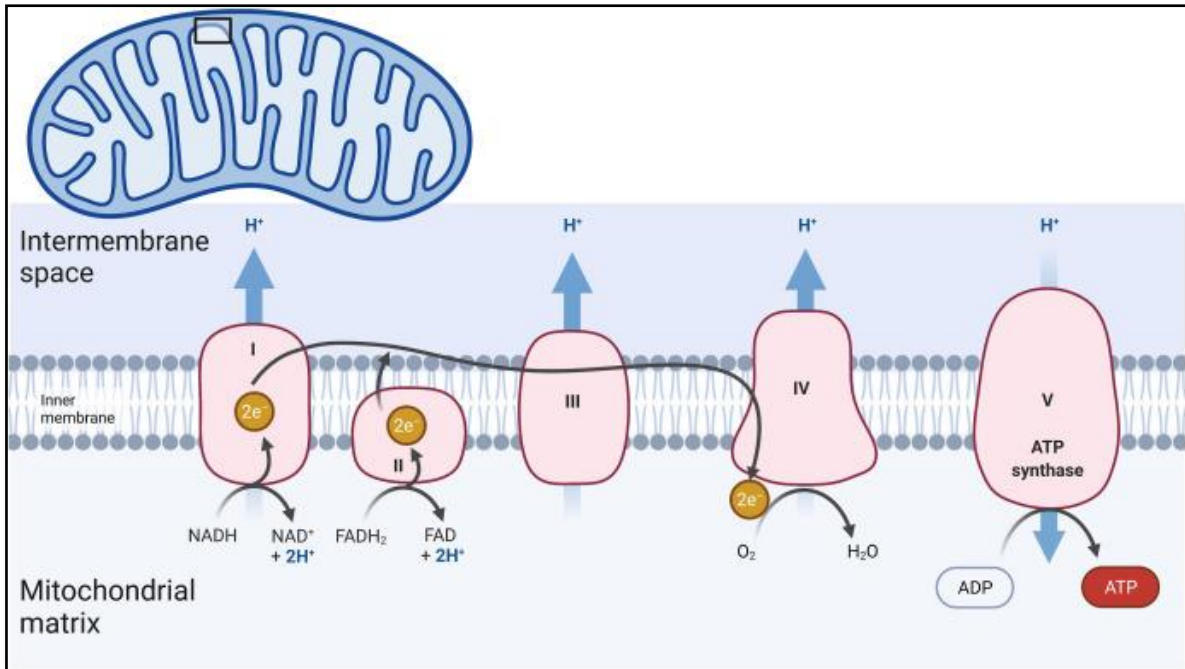


Figura 5. La fosforilación oxidativa. tiene lugar la producción de ATP y la respiración mitocondrial, complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (ubiquinol), complejo IV (citocromo c oxidasa) y complejo V (ATP sintasa). Tomado de Zhang, Y. et al. 2022 (55).

5.4 Rol de la mitocondria en la plaqueta: Estructura y funciones.

La función primaria de las mitocondrias es la producción de ATP, Pero también llevan a cabo parte del metabolismo de los ácidos grasos mediante un proceso denominado β -oxidación y actúan como almacén de calcio(13, 56). La producción de energía representada en moléculas de ATP es la función más importante de la mitocondria (53). Esta energía se obtiene a través de la respiración celular, proceso que implica tres etapas: la oxidación del piruvato, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (13, 53, 56, 57). La cadena de transporte de electrones genera un gradiente de protones entre la matriz y el espacio intermembrana que se utiliza para producir ATP (53, 54).

El metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los ácidos grasos (AG) y el metabolismo de los aminoácidos convergen en las mitocondrias, donde la oxidación del combustible puede modificarse en respuesta a los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la demanda de energía de la célula en diversas condiciones (56). Cuando se restringe la oxidación de la glucosa y de ácidos grasos, se ve un aumento de la glucólisis aeróbica, con la razón de satisfacer el requerimiento energético para la respuesta por parte de las plaquetas, lo que indica una flexibilidad en la vía metabólica a la hora de responder a un déficit energético y señal trombótica (57). “La flexibilidad se define como la diferencia entre la capacidad que existe para que una vía dada aumente a una capacidad máxima y la dependencia mínima absoluta de esa vía.” Las plaquetas absorben glucosa desde el exterior, pero utilizan fácilmente el glucógeno y AG endógenos en ausencia de esta, lo que indica una flexibilidad relativa para oxidar glucosa, AG endógenos y glutamina. Aunque la glutamina contribuye mínimamente a la respiración celular mitocondrial los principales combustibles oxidativos son la glucosa y los AG (57).

La flexibilidad de combustible de las plaquetas impulsó la investigación de la dependencia funcional de las plaquetas del ATP de la glucólisis y el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial. La inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial, o la inhibición del metabolismo de la glucosa, no afectan la agregación plaquetaria. Pero si una inhibición casi total de la agregación ocurre cuando se usan en combinación, lo que sugiere que las plaquetas tienen suficiente glucólisis para satisfacer la necesidad de ATP incluso cuando se manipula la maquinaria de ATP mitocondrial (57).

5.4.1 Importancia de la mitocondria en la apoptosis y sobrevivencia plaquetaria.

Para mantener la capacidad de responder rápidamente a los factores estresantes o al daño de los vasos sanguíneos (trombosis), se necesita una fuente de energía y metabolitos altamente eficientes para orquestar la respuesta. La mitocondria alberga procesos energéticos clave como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), los cuales están involucrados en la producción de trifosfato de adenosina (ATP). También se asocian a las mitocondrias con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la homeostasis del Ca^{+2} y la regulación de la apoptosis. En plaquetas las mitocondrias cumplen funciones metabólicas, en la activación, la producción de ATP, incluso en la regulación de los procesos celulares y la viabilidad (53, 57).

En la membrana interna de la mitocondria se encuentran inserto cinco complejos encargados de la fosforilación oxidativa los cuales se observan en la (fig.6) donde los cinco complejos de la cadena de transporte de electrones están insertos en la membrana mitocondrial interna. Los electrones que fluyen a través de la cadena reducen el oxígeno en el complejo IV y generan un potencial de membrana, que impulsa la producción de ATP para el suministro energético basal de las plaquetas (primera sección). En respuesta a un estímulo activador leve, el potencial de membrana aumenta, aumentando la producción de ATP, consumo de oxígeno y generación de especies reactivas de oxígeno, y da como resultado la activación plaquetaria (sección central). Un fuerte estímulo activador o estímulo apoptótico provoca el colapso del potencial de membrana, liberación de citocromo c (c) de la mitocondria y señalización apoptótica (sección inferior), lo cual le otorga un valor fundamental en la mantención de la hemostasis ya son responsables de la actividad energética de las plaquetas a través de la fosforilación oxidativa del cual se obtiene ATP (58-60).

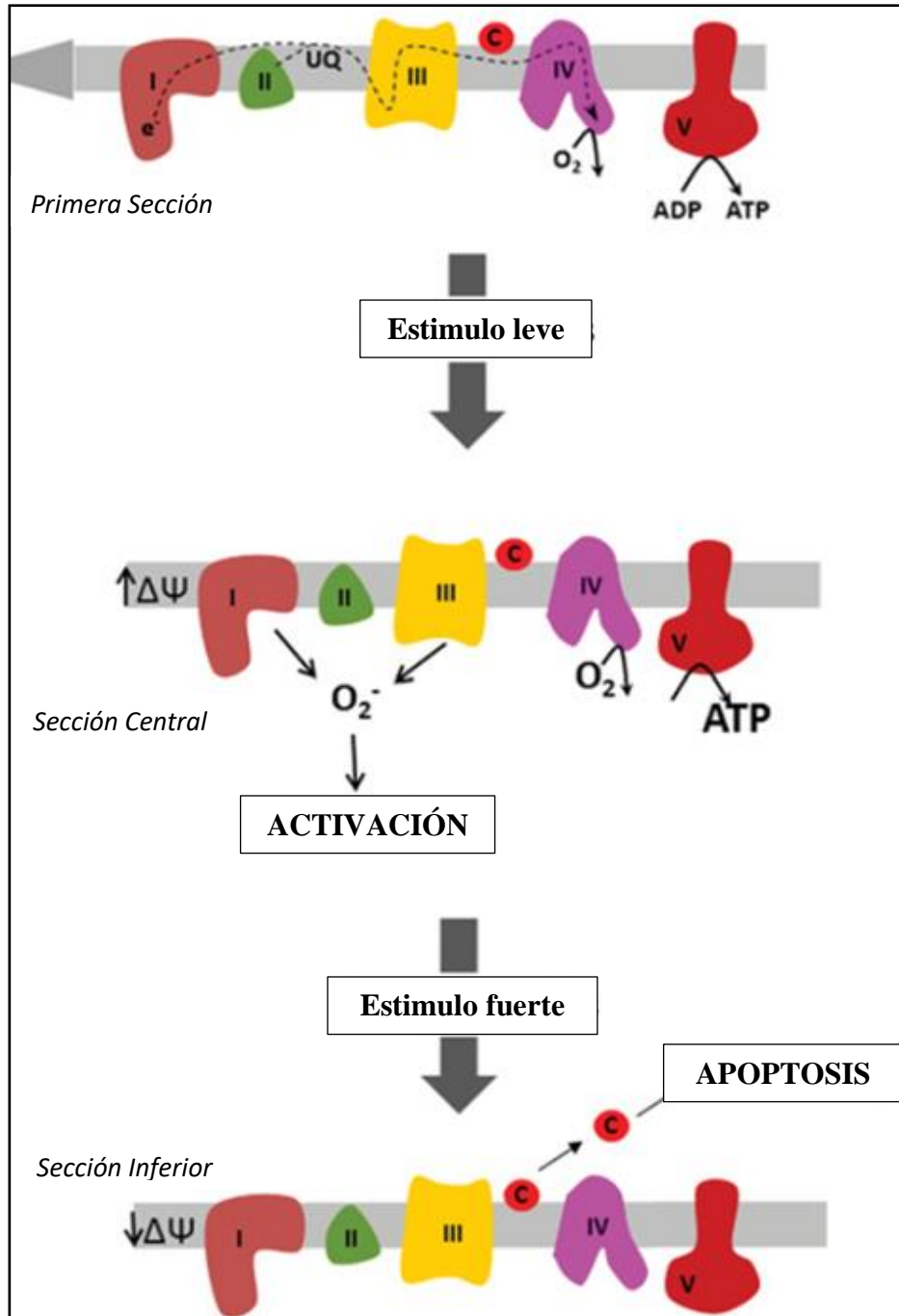


Figura 6. Complejos de la membrana mitocondrial. Ubiquinona (UQ) citocromo c (c)
Tomada y adaptada de Zharikov. S. et al. 2013 (58)

A pesar de la reducida cantidad de mitocondrias que poseen las plaquetas, estas tienen una actividad mayor que el musculo en reposo del mamífero(61). Los procesos de activación

y secreción del gránulo que tienen requerimientos energéticos que son cubiertos por la glucólisis y la fosforilación oxidativa, y que, además adecuan su actividad de acuerdo a la demanda energética de la plaqueta, ya es que capaz de aumentar significativamente la tasas de glucólisis y de la respiración aeróbica en los procesos de activación y secreción(62, 63). Lo anterior indica y asevera un papel crucial de la mitocondria en la formación de trombos, así como también se demuestra que la actividad de bloqueadores farmacológicos de la cadena de transporte de electrones como la antimicina A, el óxido nítrico o el cianuro. disminuyen la secreción de gránulos y la agregación(64, 65).

La evidencia conjunta sugiere que las mitocondrias regulan la activación plaquetaria por medios más complejos que simplemente proporcionar ATP. En donde, por ejemplo, con el tratamiento de plaquetas con peróxido de hidrógeno exógeno, se demuestra que conduce a la activación plaquetaria y la producción intracelular de ROS que se indica como un segundo mensajero integral en la activación plaquetaria inducida por colágeno(66, 67) Algunas interacciones de las ROS en la parte baja de la cascada de coagulación no están en su totalidad comprendidos, pero se ha demostrado que el peróxido activa la fosfolipasa C y el metabolismo del ácido araquidónico que conduce a la inhibición de la liberación de ATP desde los gránulos, la agregación de plaquetas y la movilización del calcio(67).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial puede generar concentraciones altas de superóxido, que se convierten rápidamente en peróxido de hidrogeno ya que es una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta producción de ROS se ve estrechamente ligada con los cambios de potencial de membrana mitocondrial ya que la hiperpolarización de membrana puede resultar en la liberación de electrones de la cadena generando superóxidos. Incluso variados estudios, enlazan el aumento de plaquetas activadas con la hiperpolarización mitocondrial y la generación de ROS(68, 69).

La hiperpolarización mitocondrial se ve asociada con la activación plaquetaria, la pérdida del potencial de membrana es paso fundamental en el inicio de la apoptosis plaquetaria(70). Vía iniciada por estímulos que inducen a un colapso del potencial de membrana mitocondrial, perdiendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial liberando al citocromo c al citosol de la matriz. Allí el citocromo c se une a APAF-1 (factor activador proteínico apoptótico), iniciando así la cascada de señalización que promueve la autoactivación de la caspasa-9, que activará la caspasa-3, lo cual divide las proteínas del citoesqueleto para inducir la muerte celular apoptótica (fig.7) llamada comúnmente como vía intrínseca(71). Además de la expresión y traslocación de una gran cantidad de proteínas pro y anti-apoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, proteínas encargadas de regular la apoptosis celular intrínseca(72).

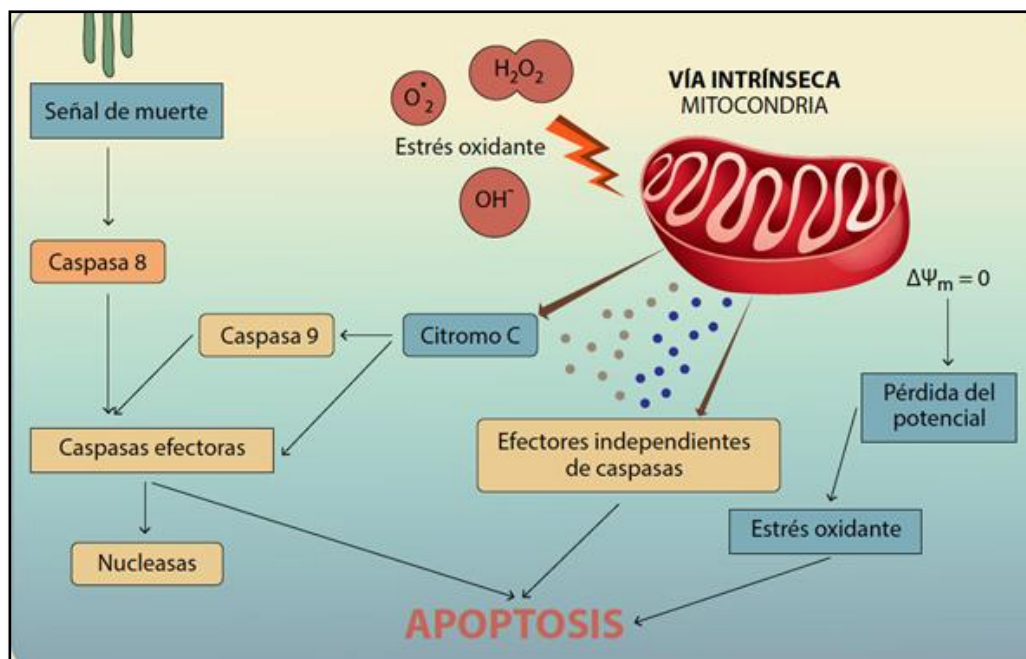


Figura 7. Vía intrínseca. La vía intrínseca corresponde la vía apoptótica mediada por la mitocondria. Tomada y adaptada de Hernández, D. et al. 2019 (71).

Distintos estímulos son suficientes para generar la apoptosis de la plaqueta, como el peróxido de hidrogeno, trombina, colágeno y estrés por cizallamiento extremo(73-77). Estos estímulos en concentración bajas provocan la activación plaquetaria, sin embargo a altas concentraciones propagan vías apoptóticas lo cual es consistente con estudios que indican que la mecánica de este comportamiento en donde los activadores plaquetarios aumentan el potencial de la membrana mitocondrial a baja concentración, que por el contrario la exposición prolongada a concentraciones más altas se traducen en el colapso de la membrana(78).

La trombina es un importante agonista plaquetario fisiológico que incluso activa vías de agregación. Además, se ha señalado que la estimulación plaquetaria con trombina resulta en eventos apoptóticos entre estos la activación de las caspasas-3 y -9, la liberación de citocromo c y la exposición a la fosfatidilserina (PS)(70). Así como también participa en la despolarización del potencial transmembrana interno mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y fuerte expresión de proteínas proapoptóticas Bax y Bak (71). Por otro lado, añade que la trombina, el colágeno y la combinación de trombina más colágeno inducen el procesamiento de la procaspasa-3(76).

Las fuerzas de cizallamiento se definen como “La fuerza, por unidad de área, que el flujo sanguíneo ejerce en la pared vascular, y depende de la viscosidad sanguínea y del perfil de velocidad del flujo sanguíneo.” (79) que en condiciones fisiológicas producen la activación plaquetaria, sin embargo, en condiciones patológicas desencadena eventos apoptóticos entre ellos la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, la activación de la caspasa-3 y la exposición de PS(74).

5.5 Disfunción mitocondrial plaquetaria y trombosis.

Cuando las plaquetas se estimulan intensamente por colágeno y trombina, se forma plaquetas procoagulantes que poseen gran cantidad de gránulos alfa, la modulación del epítipo de GP α IIb β 3, la liberación de micropartículas, la exposición a PS en la superficie celular y la pérdida de $\Delta\Psi_m$. La disfunción mitocondrial es primordial para la actividad procoagulante plaquetaria, ya que gestiona la respuesta hemostática a una lesión del endotelio vascular(36).

Las plaquetas utilizan aproximadamente el 50% de la función mitocondrial para sintetizar ATP(60). Sin embargo la fosforilación oxidativa entrega al rededor del 80% de la producción de ATP en las plaquetas que indicaría cierta dependencia de esta vía energética(80). Por otro lado, en la literatura, existe evidencia consistente, de que en las plaquetas además regulan su función protrombótica a través de la señalización redox y participación en la activación de la apoptosis(81)

Las ROS son subproductos mitocondriales resultantes de una transferencia de electrones ineficiente en la ETC dando lugar a la disfunción mitocondrial. La disfunción de la ETC, particularmente en el complejo III, disminuye la eficiencia del uso de oxígeno, lo que lleva a una acumulación de ROS(82). El ETC en las mitocondrias es capaz de generar superóxido, que se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno a través de la superóxido dismutasa(83).

Investigadores han asociado a la activación plaquetaria estimulada por agonistas como la trombina, el colágeno y la glucosa está regulada por la producción endógena de ROS, ya que mediante la reducción de inhibidores de la nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P)H) oxidasa y eliminadores de superóxido se redujo la agregación plaquetaria y formación de trombos (84). Las mitocondrias son fuente importante de radicales

libres por lo que se asocian a la mejora de la activación plaquetaria (81, 85). Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la producción de ROS y la activación plaquetaria ya que después de tratar a las plaquetas con un activador del sistema del complemento (zimosano A opsonizado,) el cual acelera la producción de ROS y la hiperpolarización en las mitocondrias, se produce un reordenamiento del citoesqueleto de las plaquetas (un indicador de la activación), lo que se podría asociar directamente con la activación de la plaqueta (68).

. La disfunción mitocondrial plaquetaria es un jugador clave en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales potencialmente contribuyen a la activación plaquetaria, donde incluso aportan a la activación de las plaquetas en forma de segundo mensajero incluyendo formas reactivas como el radical hidroxilo, el peróxido de hidrogeno y el anión superóxido, así como también cumple un papel importante en la iniciación de la apoptosis(86-89). Esta disfunción mitocondrial plaquetaria se puede relacionar con diferentes enfermedades cardiovasculares, así como también en el deterioro de las plaquetas almacenadas para transfusión (90). Ya que es una importante fuente de ROS incluso en estado basal, pero en concentraciones bajas(84, 91).

5.6 Inhibidores mitocondriales con actividad antiplaquetaria y antitrombótica.

El ácido salvianólico A, componente activos de *Salvia miltiorrhiza*, que dentro de su actividad farmacológica encontramos propiedades antiplaquetarias y antitrombóticas, ya que inhibe la agregación inducida por ADP , colágeno, trombina en condiciones in vitro(92, 93).

El xanthohumol es el principal flavonoide prenilado presente en *Humulus lupulus L.* y un ingrediente común que se encuentra en la cerveza (94). Éste flavonoide mejora la función mitocondrial y previene la trombosis sin aumentar el riesgo de sangrado al inhibir la liberación de ADN mitocondrial (ADNmt) y la activación plaquetaria (95). Este es un potente

antioxidante que en bajas concentraciones protege a las células del estrés oxidativo de manera dependiente de la dosis, ya que con una concentración mayor a los 14 μM , se produce el efecto contrario, es decir, una elevada producción de ROS y genotoxicidad (96, 97). Sin embargo, se ha informado que el xanthohumol puede atenuar la agregación de plaquetas sanguíneas inducida por ADP y reducir la expresión del receptor de fibrinógeno en la superficie de las plaquetas (98).

Derivados de quinona e hidroquinona podrían ser potencialmente utilizados como una nueva vía para el desarrollo de fármacos con actividad antiplaquetaria. Ya que poseen un importante potencial antioxidante debido a la capacidad donadora de enlaces de hidrogeno intramoleculares, lo cual es una actividad protectora muy relevante que transforma las ROS tóxicas (radicales oxilo y peroxilo) en especies no tóxicas(99).

Derivados de acilhidroquinona según los investigadores unos de sus derivados generó la disminución de la bioenergética mitocondrial, un proceso central en la activación plaquetaria humana reduciendo la actividad plaquetaria y por ende su actividad trombótica(100).

La metformina es un fármaco que inhibe específicamente el complejo I de la ETC y previene la trombosis tanto venosa como arterial sin efectos de sangrados prolongados significativos, ya que inhibe la activación plaquetaria y la liberación extracelular de ADNmt (101, 102). Además, protege la función mitocondrial ya que reduce la hiperpolarización mitocondrial inducida por plaquetas activadas, y también disminuye los niveles de ATP intracelular, la sobrecarga de ROS y el daño asociado (101).

La isorhamnetina (3-metil quercetina) es un flavonol metilado presente en hojas, flores y frutos de muchas plantas y se ha informado que posee un efecto antiplaquetario ya

que produce la inhibición de la función mitocondrial reduciendo los niveles de ATP necesarios para la actividad trombótica (103).

La mitoquinona (MitoQ) una quinona unida a un grupo TPP por una cadena de alquilo de 10 carbonos inhibe los pasos de activación plaquetaria al reducir los niveles de ROS. Los investigadores indican que posiblemente el efecto antioxidante mitocondrial, posea un efecto antiplaquetario a través de la inhibición de la adhesión y la propagación, la secreción y la agregación plaquetaria (99, 104).

6. CONCLUSIONES

La función mitocondrial en la plaqueta se ve directamente asociado a la mantención de la hemostasis, ya que se demuestra que no solo posee un poder regulatorio a través de la producción de ATP, sino también en la señalización de la activación plaquetaria, a través de la producción de ROS, por ende, la actividad mitocondrial cumple un rol fundamental en la generación del trombo.

La producción de especies reactivas de oxígeno es la segunda vía de regulación plaquetaria que efectúa la mitocondria después de la producción energética.

La farmacología puede seguir este rumbo de acción, ya que la inhibición y/o alteración de la función mitocondrial, afectará directamente la hemostasia, por ende, en la trombosis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*. 2013;121(10):1875-85.
2. González-Villalva A, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, et al. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2019;62:6-18.
3. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, et al. c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*. 1994;369(6481):571-4.
4. Trowbridge EA. Pulmonary platelet production: a physical analogue of mitosis? *Blood Cells*. 1988;13(3):451-65.
5. Schick PK, Wojenski CM, Bennett VD, Ivanova T. The synthesis and localization of alternatively spliced fibronectin EIIIB in resting and thrombin-treated megakaryocytes. *Blood*. 1996;87(5):1817-23.
6. Penington D. Formation of platelets. *Platelets in biology and pathology*. 1981;2:19-41.
7. Stanley ER, Jubinsky PT. Factors affecting the growth and differentiation of haemopoietic cells in culture. *Clin Haematol*. 1984;13(2):329-48.
8. Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl A, Sheridan WP, Ohashi H, Kato T, et al. Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vitro effects on human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-induced thrombocytopenia. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2973-8.
9. Xi X, Caen JP, Fournier S, Schlegel N, Amiral J, Sibony O, et al. Direct and reversible inhibition of platelet factor 4 on megakaryocyte development from CD34+ cord blood cells: comparative studies with transforming growth factor beta1. *Br J Haematol*. 1996;93(2):265-72.

10. Corash L, Tan H, Gralnick HR. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. *Blood*. 1977;49(1):71-87.
11. Bithell TC. The physiology of primary hemostasis. *Wintrobe's clinical hematology*. 1993;1:540-55.
12. Corash L. The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood Cells*. 1989;15(1):81-107.
13. Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Medicina interna de México*. 2018;34:244-63.
14. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008;295(5):E1009-E117.
15. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126(5):683-91.
16. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 2015;126(13):1601-8.
17. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood*. 2006;107(4):1405-12.
18. Ozaki Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O. Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI. *J Thromb Haemost*. 2009;7 Suppl 1:191-4.
19. Qiao JL, Shen Y, Gardiner EE, Andrews RK. Proteolysis of platelet receptors in humans and other species. 2010.
20. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(8):1170-4.
21. Nesheim ME, Furmaniak-Kazmierczak E, Henin C, Côté G. On the existence of platelet receptors for factor V(a) and factor VIII(a). *Thromb Haemost*. 1993;70(1):80-6.
22. Andrews RK, Suzuki-Inoue K, Shen Y, Tulasne D, Watson SP, Berndt MC. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2002;99(11):4219-21.

23. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-61.
24. Locke D, Liu C, Peng X, Chen H, Kahn ML. Fc R γ -independent signaling by the platelet collagen receptor glycoprotein VI. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(17):15441-8.
25. Schmaier AA, Zou Z, Kazlauskas A, Emert-Sedlak L, Fong KP, Nieves KB, et al. Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor to adopt a hemostatic role. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21167-72.
26. Stegner D, Haining EJ, Nieswandt B. Targeting glycoprotein VI and the immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(8):1615-20.
27. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2010;8(7):1456-67.
28. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2341-9.
29. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
30. Flores-Rivera OI, Ramírez-Morales K, Meza-Márquez JM, Nava-López JA. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2014;37(S2):382-6.
31. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science*. 2003;28(3):307-17.
32. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88(5):1525-41.
33. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*. 2007;115(17):2323-30.
34. Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357(24):2482-94.
35. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J*. 2013;34(10):719-28.

36. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13:2-7.
37. Tsuji S, Sugimoto M, Miyata S, Kuwahara M, Kinoshita S, Yoshioka A. Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1999;94(3):968-75.
38. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2017;36(2):195-8.
39. Handagama PJ, Shuman MA, Bainton DF. The origin of platelet alpha-granule proteins. *Progress in clinical and biological research*. 1990;356:119-30.
40. Welsh JD, Muthard RW, Stalker TJ, Taliaferro JP, Diamond SL, Brass LF. A systems approach to hemostasis: 4. How hemostatic thrombi limit the loss of plasma-borne molecules from the microvasculature. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;127(12):1598-605.
41. Welsh JD, Stalker TJ, Voronov R, Muthard RW, Tomaiuolo M, Diamond SL, et al. A systems approach to hemostasis: 1. The interdependence of thrombus architecture and agonist movements in the gaps between platelets. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2014;124(11):1808-15.
42. del Carmen RDS, Sandra GS, Guadalupe BRS, Benjamín RJ, Hernán NZA. Hemostasia y factores asociados a tendencia trombótica. *Contenido/Contents*. 2019;66(4):227-33.
43. Grimaldo-Gómez FA. Fisiología de la hemostasia. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2017;40(S2):398-400.
44. Páramo JA, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 2009:19-23.
45. Fernández JAP, Piérola AA, Díaz SV. Alteraciones de la hemostasia primaria. Púrpuras y alteraciones de las plaquetas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2012;11(22):1337-44.
46. Kotiadis VN, Duchon MR, Osellame LD. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and

- cell health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014;1840(4):1254-65.
47. Palomo I, Pereira J, Palma J. *Hematología: fisiopatología y diagnóstico*. Editorial Universidad de Talca. 2005.
48. Harman D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*. 1972;20(4):145-7.
49. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16(10):1150-80.
50. Bennett JS, Kolodziej MA. Disorders of platelet function. *Dis Mon*. 1992;38(8):577-631.
51. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1998;1376(3):433-53.
52. Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. *Thrombosis and haemostasis*. 1999;82(08):353-6.
53. Darisnelys BN, editor ACTUALIZACIÓN SOBRE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS. MATERIAL COMPLEMENTARIO2020.
54. Janssen RJRJ, Nijtmans LG, Heuvel LPvd, Smeitink JAM. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*. 2006;29(4):499-515.
55. Zhang Y, Wang J, Lei S, Hu Y, Fu L. Utilization of mitochondrial-targeted small molecules in protecting stored platelets against storage lesions. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022;6:100070.
56. Moriau M, Lavenne EP, Scheiff JM, Debeyss CC. The relationship between endothelium, subendothelium, and platelets. *Blood Cells*. 1990;16:73-83.
57. Aibibula M, Naseem KM, Sturmeijer RG. Glucose metabolism and metabolic flexibility in blood platelets. *J Thromb Haemost*. 2018;16(11):2300-14.
58. Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society Transactions*. 2013;41(1):118-23.

59. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2012;1817(6):851-62.
60. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano Jr JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 2005;106(13):4066-75.
61. Akkerman JWN. Regulation of carbohydrate metabolism in platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 1978;39(03):712-24.
62. Akkerman JWN, Holmsen H, Loughnane M. Simultaneous measurement of aggregation, secretion, oxygen uptake, proton production, and intracellular metabolites in the same platelet suspension. *Analytical Biochemistry*. 1979;97(2):387-93.
63. Akkerman JWN, Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca²⁺ secretion. *Blood*. 1981;57(5):956-66.
64. Niu X, Arthur P, Abas L, Whisson M, Guppy M. Carbohydrate metabolism in human platelets in a low glucose medium under aerobic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1996;1291(2):97-106.
65. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Wysocka J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta Biochimica Polonica*. 2004;51(3):789-803.
66. Caccese D, Praticò D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, et al. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation—role of arachidonic acid metabolism. *Thrombosis and haemostasis*. 2000;83(03):485-90.
67. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Paolo Gazzaniga P, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998;91(2):484-90.
68. Matarrese P, Straface E, Palumbo G, Anselmi M, Gambardella L, Ascione B, et al. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A—activation and long-term commitment to cell death. *The FEBS Journal*. 2009;276(3):845-56.
69. Yamagishi S-i, Edelstein D, Du X-l, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 2001;50(6):1491-4.

70. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British journal of haematology*. 1997;99(4):824-31.
71. Hernández Espinosa DR, Barrera Morín V, Briz Tena O, González Herrera EA, Laguna Maldonado KD, Jardínez Díaz AS, et al. El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2019;62:6-19.
72. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood reviews*. 2012;26(2):51-63.
73. Lopez JJ, Salido GM, Gomez-Arteta E, Rosado JA, Pariente JA. Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2007;5(6):1283-91.
74. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Lyubimov E, Freedman J. Thrombin-triggered platelet apoptosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(12):2656-63.
75. Lin KH, Chang HC, Lu WJ, Jayakumar T, Chou HC, Fong TH, et al. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet-activating agents. *Platelets*. 2009;20(8):575-81.
76. Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1999;93(12):4222-31.
77. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Mis L, Lyubimov EV, Garvey B, et al. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;320(2):303-10.
78. Jobe SM, Wilson KM, Leo L, Raimondi A, Molkenin JD, Lentz SR, et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(3):1257-65.
79. Mongrain R, Rodés-Cabau J. Papel de la tensión de cizallamiento en la enfermedad aterosclerótica y la reestenosis tras implantación de *stent* coronario. *Revista Española de Cardiología*. 2006;59(1):1-4.

80. Freedman JE. Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation*. 2005;112(17):2725-34.
81. Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;45(2):158-66.
82. Diaz F, Garcia S, Padgett KR, Moraes CT. A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Human molecular genetics*. 2012;21(23):5066-77.
83. Anand R, Sharma DR, Verma D, Bhalla A, Gill KD, Singh S. Mitochondrial electron transport chain complexes, catalase and markers of oxidative stress in platelets of patients with severe aluminum phosphide poisoning. *Human & experimental toxicology*. 2013;32(8):807-16.
84. Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger Jr, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, et al. Platelet NAD (P) H-oxidase-generated ROS production regulates α IIb β 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway. *Blood*. 2005;106(8):2757-60.
85. Wang Z, Cai F, Chen X, Luo M, Hu L, Lu Y. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. *PloS one*. 2013;8(9):e75044.
86. Slattery DE, Pollack CV. Balancing potency of platelet inhibition with bleeding risk in the early treatment of acute coronary syndrome. *Western Journal of Emergency Medicine*. 2009;10(3):163.
87. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *Journal of thrombosis and Haemostasis*. 2009;7:17-20.
88. Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, et al. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes, and neutrophils, and the oxidative burst from human blood. *Laboratory investigation*. 2013;93(6):690-700.
89. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox biology*. 2014;2:206-10.

90. Akahori M, Uedono Y, Yamagami K, Takeyama N, Kitazawa Y, Tanaka T. Hypoxia alters the energy metabolism and aggregation of washed human platelets. *Haematologia*. 1995;26(4):191-8.
91. Ben-Shachar D, Bonne O, Chisin R, Klein E, Lester H, Aharon-Peretz J, et al. Cerebral glucose utilization and platelet mitochondrial complex I activity in schizophrenia: A FDG-PET study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2007;31(4):807-13.
92. Xiang Y, Ye S, Cai C, Chen J, Zhao X, Zhu N, et al. Salvianolic acid a attenuates limb ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle of rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:551-6.
93. Huang ZS, Zeng CL, Zhu LJ, Jiang L, Li N, Hu H. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8(6):1383-93.
94. Plazar J, Žegura B, Lah TT, Filipič M. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of benzo (a) pyrene (BaP), 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ) and tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) in HepG2 human hepatoma cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007;632(1-2):1-8.
95. Xin G, Wei Z, Ji C, Zheng H, Gu J, Ma L, et al. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* prevents thrombosis without increased bleeding risk by inhibiting platelet activation and mtDNA release. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017;108:247-57.
96. Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Valle A, Roca P. Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(12):2785-94.
97. Carvalho DO, Oliveira R, Johansson B, Guido LF. Dose-dependent protective and inductive effects of xanthohumol on oxidative DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*. 2016;54(1):60-9.
98. Luzak B, Kassassir H, Rój E, Stanczyk L, Watala C, Golanski J. Xanthohumol from hop cones (*Humulus lupulus* L.) prevents ADP-induced platelet reactivity. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2017;123(1):54-60.

99. Fuentes M, Araya-Maturana R, Palomo I, Fuentes E. Platelet mitochondrial dysfunction and mitochondria-targeted quinone-and hydroquinone-derivatives: Review on new strategy of antiplatelet activity. *Biochemical Pharmacology*. 2018;156:215-22.
100. Méndez D, Donoso-Bustamante V, Pablo Millas-Vargas J, Pessoa-Mahana H, Araya-Maturana R, Fuentes E. Synthesis and pharmacological evaluation of acylhydroquinone derivatives as potent antiplatelet agents. *Biochemical Pharmacology*. 2021;183:114341.
101. 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. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-12.
102. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochemical Journal*. 2014;462(3):475-87.
103. Rodríguez L, Badimon L, Méndez D, Padró T, Vilahur G, Peña E, et al. Antiplatelet Activity of Isorhamnetin via Mitochondrial Regulation. *Antioxidants*. 2021;10(5).
104. Méndez D, Arauna D, Fuentes F, Araya-Maturana R, Palomo I, Alarcón M, et al. Mitoquinone (MitoQ) Inhibits Platelet Activation Steps by Reducing ROS Levels. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17).