



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

“Estimulación adrenérgica y hemostasia en salud y enfermedad: Efectos de la razón de concentración y tiempo de estimulación de epinefrina y norepinefrina sobre la adhesión plaquetaria a células endoteliales”.

DIEGO IGNACIO ARAVENA ORTEGA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO

Director de memoria

Dr. Felipe Simón Pino

Facultad de Ciencias de la Vida

Universidad Andrés Bello

Profesor patrocinante

Dr. Alfonso Paredes Vargas

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad De Chile

Santiago - Chile.

2022

“...Esas noticias describen un hallazgo, el final del camino, la guinda de la torta.

Lo que no muestran es cómo quedó la cocina en la que se preparó esa torta”.

Gabriel León

Pandemia

2022

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	XII
SUMMARY.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema adrenérgico	1
1.2 Receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción de señales ..	1
1.3 Factores que determinan la respuesta adrenérgica.....	4
1.4 Endotelio y regulación de la hemostasia.....	5
1.5 Sistema adrenérgico y su relación con la hemostasia	6
1.6 Endotelio, hemostasia y sobreestimulación adrenérgica	7
1.7 Pregunta de investigación.....	7
2. HIPÓTESIS.....	8
3. OBJETIVOS:.....	8
3.1 Objetivo general:	8
3.2 Objetivos específicos:	8
4. MATERIALES Y MÉTODOLOGÍA.....	9
4.1 Reactivos utilizados, composición y procedencia	9
4.2. Soluciones utilizadas.....	9
4.3 Soluciones de catecolaminas:.....	10
4.4 Cultivo celular Endotelial: EA.hy926	10
4.5 Ensayo de viabilidad celular.....	11

4.6 Purificación de plaquetas	11
4.7 Ensayo de adhesión celular con catecolaminas	13
4.8 Ensayo de adhesión celular con catecolaminas y antagonistas adrenérgicos.	13
4.9 Fijación de placas	14
4.9.1 Análisis de adhesión plaquetaria	14
4.9.2 Análisis estadístico.....	15
5. RESULTADOS	18
5.1 Curva de viabilidad de EA.hy926 con catecolaminas en distintas concentraciones.	18
5.2 La estimulación transitoria de EPI y NE aumenta la adhesión plaquetaria a células endoteliales.	20
5.3 La estimulación persistente de EPI y NE tiene efectos distintos sobre la adhesión plaquetaria dependiendo de la concentración de catecolaminas.	20
5.4 La inhibición de RA- α_1 y β_1 previene el aumento de la adhesión plaquetaria a células EA.hy926 en condiciones de estimulación patológicas y persistentes.	23
5.5 La inhibición de RA- β_2 no previene el aumento de la adhesión plaquetaria inducido por concentraciones patológicas de catecolaminas en estimulación persistente.....	23
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES	31
8. PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	32

8.1 Presentaciones en congresos.....	32
8.2 Publicaciones	32
9. REFERENCIAS	34

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transducción de los distintos subtipos de receptores adrenérgicos.....	3
Figura 2. Esquema general del procedimiento experimental.	16
Figura 3. Representación de la aplicación de los distintos tratamientos sobre el cultivo de células endoteliales EA.hy926.....	17
Figura 4. Curva de viabilidad de EA.hy926 ante catecolaminas.	19
Figura 5. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación transitoria (3 horas) con NE y EPI.	21
Figura 6. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con NE y EPI.	22
Figura 7. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con NE y EPI e inhibición farmacológica de RA- α 1 con terazosina.	24
Figura 8. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con NE y EPI e inhibición farmacológica de RA- β 1 con bisoprolol.	25
Figura 9. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con NE y EPI e inhibición farmacológica de RA- β 2 con butoxamina.	26

TABLAS

Tabla 1: Reactivos utilizados, composición y procedencia.....	9
Tabla 2: Soluciones utilizadas y composición.....	9

Tabla 3. Grupos experimentales y tratamientos del objetivo específico	
1	15
Tabla 4. Grupos experimentales y tratamientos del objetivo específico	
2	15

FINANCIAMIENTO

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Fisiopatología Integrativa de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Universidad Andrés Bello y fue financiada por el Fondo para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología (FONDECYT) N.º 1201039 y por el Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia, IMII (ICN 2021_045).

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico con especial cariño a cada persona que, en mi camino de crecimiento como científico y como persona, creyó siempre en mis capacidades. Sepan que su apoyo fue una parte fundamental de esta memoria.

Una dedicatoria especial a ti, Tata Mario. Un abrazo donde quiera que estés. Gracias por marcarme en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero, en primer lugar, agradecer a mi familia. Mi madre, Ivonne, que siempre ha dado lo mejor por sus hijos; mi papá Marcelo, quien siempre ha puesto a su familia por delante; mis hermanos, en especial Joaquín y Marcelo, quienes son una parte fundamental de mi día a día; a mis padrinos, mi tata Iván, siempre preocupado y orgulloso de cada paso que doy en mi carrera profesional y a mi Chochita, mi segunda madre, incondicional y consentidora como ninguna otra persona en esta vida. A mi padre, José, quien ha demostrado ser una persona presente en mi camino de desarrollo profesional y personal, preocupándose de mi bienestar constantemente

A mi tutor, el Dr. Felipe Simon por confiarme un espacio en el Laboratorio de Fisiopatología Integrativa de la Universidad Andrés Bello para cumplir con esta última etapa de mi pregrado, comprender mis tropiezos y circunstancias personales e instarme a seguir constantemente. También agradecer a mi grupo de laboratorio, Yolanda, Felipe, Cristóbal, Alejandro y Sebastián por los buenos momentos, los cafés, la confianza, la disposición a colaborar, enseñarme constantemente y su amistad. Igualmente agradecer a los miembros de nuestro laboratorio vecino por generar siempre un ambiente cálido, colaborativo y de confianza.

Por supuesto que quiero agradecer a cada uno de mis amigos, a los que me acompañaron en la facultad todo este tiempo, con quienes reí y lloré por diversos motivos. Muchas gracias, *“Malditas Víboras”*. Una mención especial a mi amigo Ticho, cuya amistad se siente presente a pesar de la distancia.

Agradezco a Felipe, mi compañero de vida y pilar fundamental en este y muchos procesos; y a su familia, personas conscientes y acogedoras como pocas se conocen.

Un especial agradecimiento a mis mentoras en lo personal y profesional. La Cata, quien me guió e inspiró, sembrando una semilla de deseo por el conocimiento y otra de espíritu social. La Caro, quien fue en un instante mi profesora y guía en mi pasión por la biología, pero que la vida quiso mantener como una de mis mejores amigas. Y la Claudia, mi tutora de práctica, una mujer empoderada, inteligente y comprensiva, quien significó un gran salto en mi vida profesional.

Finalmente, un agradecimiento particular a mis niños del Preu, muchas gracias por entregarme su confianza y admiración, espero que mi paso por su vida haya sido positivo. También a los profes y amigos que hice en esa hermosa institución enfocada en cambiar vidas, a la cual dediqué, un tiempo al menos, en todo mi pregrado.

ABREVIATURAS

(F): Condición fisiológica.

(P): Condición patológica.

AC: Adenil-ciclasa.

ACD: Buffer ácido cítrico dextrosa.

AD: Adrenalina.

BIS: Bisoprolol.

BUT: Butoxamina.

Ca²⁺: Ion calcio.

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico.

CE: Célula endotelial.

CO₂: Dióxido de carbono.

DAG: Diacil-glicerol.

DE: Desviación estándar.

DMEM Low: Medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EPI: Epinefrina.

EPI/NE: Razón de concentración de epinefrina y norepinefrina

FBS: Suero fetal bovino.

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfonato.

ICAM-I: Proteína de adhesión intercelular tipo I.

IP₃: Inositol-trifosfato.

LPS: Lipopolisacárido.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

NA: Noradrenalina.

NE: Norepinefrina.

PBS: Buffer fosfato salino.

PIP₂: Fosfatidil-inositol bifosfato.

PKA: Proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico.

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio.

PLC: Fosfolipasa C.

RA: Receptor adrenérgico.

SA: Sistema adrenérgico.

SNA: Sistema nervioso autónomo.

SNS: Sistema nervioso simpático.

TER: Terazosina.

VCAM-I: Proteína de adhesión celular vascular tipo I.

vWF: Factor de von Willebrand.

WP: Weibel Palade.

RESUMEN

El endotelio es un regulador importante de la hemostasia y es altamente reactivo a las catecolaminas. El sistema adrenérgico es un regulador de diversos parámetros homeostáticos y varios estudios lo han relacionado a la regulación de la hemostasia. Se ha reportado que condiciones fisiológicas y patológicas influyen diferencialmente en las concentraciones plasmáticas de las catecolaminas circulantes y el tiempo en que este cambio es mantenido, lo cual podría relacionarse con la disfunción endotelial conllevando a coagulopatías. A pesar de que este fenómeno se ha estudiado con agonistas y antagonistas adrenérgicos específicos, no hay reportes acerca del efecto en la coagulación de la razón de concentración de epinefrina y norepinefrina y el tiempo de estimulación. La hipótesis de este trabajo es que la estimulación persistente de la razón de concentración de epinefrina y norepinefrina (EPI/NE) patológica aumenta la adhesión de plaquetas a células endoteliales. Para responder esta hipótesis, células endoteliales se co-cultivaron con plaquetas teñidas previamente con una sonda fluorescente (protocolo aprobado por el Comité Institucional de Bioética, Universidad Andrés Bello, N° 002/2020) y se expusieron a una razón de concentración de epinefrina y norepinefrina como se reporta en condiciones fisiológicas y patológicas por 3 horas para una estimulación transitoria y 24 horas para una estimulación persistente. Luego, agonistas adrenérgicos específicos, terazosina, bisoprolol y butoxamina se aplicaron para evaluar la contribución de cada receptor a este fenómeno.

Los resultados muestran que en estimulación transitoria tanto concentraciones fisiológicas como patológicas de catecolaminas aumentan la adhesión plaquetaria a células endoteliales, por otra parte, en estimulación

persistente, las concentraciones de catecolaminas muestran efectos diferenciados, ya que concentraciones fisiológicas disminuyen la adhesión plaquetaria a células endoteliales, mientras que las concentraciones patológicas la aumentan.

Con respecto al bloqueo farmacológico de los distintos tipos de receptores adrenérgicos, tanto el bloqueo de α_1 y β_1 previenen el aumento en la adhesión plaquetaria observado en concentraciones patológicas de catecolaminas durante una estimulación persistente, mientras que el bloqueo de β_2 no demostró lograr una prevención completa del aumento en la adhesión. Como conclusión podemos mencionar que el aumento en la adhesión plaquetaria a células endoteliales depende tanto de la razón de concentración de epinefrina y norepinefrina como del tiempo de estimulación. Además, los subtipos de receptores adrenérgicos desempeñan una contribución diferencial a este fenómeno.

SUMMARY

Title: “Adrenergic stimulation and hemostasis in health and disease: effects of the concentration rate of epinephrine and norepinephrine on platelet adhesion to endothelial cells”.

The endothelium is an important regulator of hemostasis and is highly reactive to circulating catecholamines. The adrenergic system is a regulator of several hemostatic parameters and several studies have associated it with hemostasis regulation. It has been reported that physiological and pathological conditions differentially influence the plasma concentrations of adrenergic catecholamines, depending on the time this change is maintained, which could be related to endothelial dysfunction driving coagulopathies. Despite of this phenomenon has been studied with specific adrenergic agonists and antagonists, there are no reports on coagulation respect to the effect of the plasma concentration ratio of epinephrine and norepinephrine and its stimulation time. The hypothesis of this work is that persistent stimulation with a pathologic concentration ratio of epinephrine and norepinephrine (EPI/NE) increases platelet adhesion to endothelial cells. To demonstrate it, endothelial cells were co-cultured with fluorescent stained platelets (protocol approved by the Institutional Bioethics Committee, Universidad Andrés Bello, N° 002/2020) and different concentration ratio of epinephrine and norepinephrine as reported in physiological and pathological conditions for 3 hours for a transient stimulation and, 24 hours for a persistent stimulation. Then, specific adrenergic antagonists such as, terazosin, bisoprolol and butaxamine were applied to evaluate the contribution of each receptor to this phenomenon.

Results show that in transient stimulation, both physiologic and pathologic catecholamines concentrations increase. In the other hand, in persistent stimulation, catecholamines concentrations show different effects, since physiologic concentration diminishes platelet adhesion to endothelial cells, but pathologic concentration increases the adhesion depends on the concentration ratio and stimulation time of epinephrine and norepinephrine. Also, adrenoreceptor subtypes perform a different contribution to this phenomenon.

Regarding the pharmacologic blocking of the several types of adrenergic receptors, blocking of α_1 or β_1 prevents the increase of platelets adhesion to endothelial cells observed during persistent stimulation with pathologic concentration of catecholamines, while β_2 blocking did not show to prevent completely the increase of the adhesion. As conclusion it can be mentioned that increase of platelet adhesion to endothelial cells depends on both catecholamines concentration ratio and stimulation time. Moreover, the subtypes of adrenergic receptors perform a different contribution to this phenomenon.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema adrenérgico

La respuesta del organismo a diversos estímulos tanto externos como internos está dada por sistemas de regulación hormonales y nerviosos. Un ejemplo de esto es el sistema adrenérgico, el cual converge ambos mecanismos, es decir, es un sistema neuro-hormonal. (Goldstein, D. 2010)

El sistema adrenérgico es parte del sistema nervioso autónomo (SNA), conformando su componente simpático (SNS). Sus neuro-hormonas efectoras son catecolaminas y corresponden a la norepinephrina (NA) o norepinefrina (NE) como se conoce su forma sintética, liberada por neuronas postganglionares directamente hacia los órganos efectores, pudiendo difundir al torrente sanguíneo; y la adrenalina (AD) o epinefrina (EPI) en su forma sintética, liberada principalmente por células de la médula adrenal hacia la sangre. Bioquímicamente, la norepinefrina es sustrato en la biosíntesis de epinefrina. Esta última posee un grupo N-metilo transferido gracias a la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa. (Goldstein, D. 2010)

Las catecolaminas adrenérgicas regulan diversos parámetros a nivel fisiológico. Algunos ejemplos son la regulación de la presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia y capacidad ventilatoria, tono de la vejiga, etc. También regulan procesos a nivel molecular y metabólico, como la glucogenólisis y gluconeogénesis e incluso la hemostasia. (Revisado en Zoulhal, H. et al., 2008)

1.2 Receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción de señales

Las diversas funciones que ejercen estas dos neuro-hormonas se llevan a cabo gracias a la presencia de receptores adrenérgicos (RAs). Estos

receptores corresponden a receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G heterotrimérica (GPCR) (Guimaraes & Moura, 2001) y presentan una amplia distribución en el organismo, existiendo en prácticamente todos los tejidos.

Actualmente se distinguen dos grandes grupos de RAs: α y β , de los cuales se distinguen los subgrupos, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 . Cada uno de los subgrupos de RAs se encuentra acoplado a una proteína G particular, actuando, por lo tanto, mediante distintos mecanismos transduccionales. Los RA- α_1 se encuentran acoplados a proteína G_q , por lo que su activación induce la disociación de la subunidad G_{α_q} , estimulando a la enzima fosfolipasa C (PLC), aumentando los niveles de inositol-trifosfato (IP_3) y diacil-glicerol (DAG) a partir de la hidrólisis de fosfatidilinositol trifosfato (PIP_3), lo que conlleva, finalmente, a un aumento de la concentración intracelular de ion calcio ($\uparrow[Ca^{2+}]_i$). Esto converge en la activación de la proteína efectora quinasa C (PKC) (Sorriento et al., 2011). Por otro lado, los RA- β , se encuentran acoplados a proteína G_s , por lo que su activación induce la disociación de la subunidad G_{α_s} , estimula la actividad de la enzima adenil-ciclasa (AC), aumentando la concentración intracelular de AMP cíclico ($\uparrow[cAMP]$) a partir de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP), convergiendo en la activación de la proteína efectora quinasa A (PKA) (Chapman et al., 2014). Con respecto a los RA- α_2 , estos se acoplan a la proteína G_i , por lo que, al activarse, ejercen una inhibición sobre la AC mediante la subunidad G_{α_i} , disminuyendo la concentración intracelular de cAMP ($\downarrow[cAMP]$) (Chapman et al., 2014), es decir, es un efecto antagónico a la actividad de los RA- β . Los mecanismos de transducción se esquematizan en la **figura 1**.

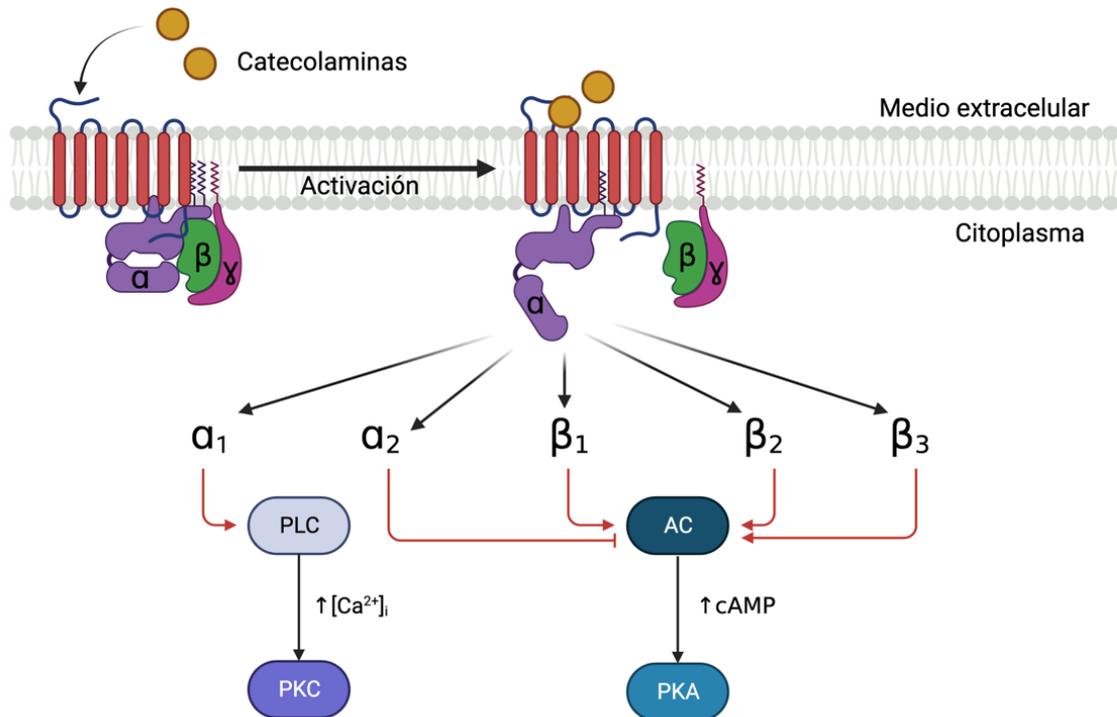


Figura 1. Mecanismos de transducción de los distintos subtipos de receptores adrenérgicos. Al unirse a su catecolamina agonista, el receptor induce la disociación de la subunidad α de la proteína G del complejo $\beta\gamma$. Dependiendo del tipo de proteína G a la que esté acoplado el receptor, será el mecanismo transduccional utilizado.

1.3 Factores que determinan la respuesta adrenérgica

La complejidad del sistema adrenérgico no solo radica en la diversidad de receptores y sus distintos mecanismos de transducción de señal, sino también en la distribución diferencial y preferencial de estos en distintos tejidos además de la concentración de EPI y NE circulantes y locales. Se ha observado que distintas condiciones modifican la concentración basal de catecolaminas aumentando una o ambas de manera particular (revisado en Zouhal, H. et al., 2008), por ejemplo, se ha determinado que una concentración fisiológica plasmática promedio en reposo es de 0,034 y 0,52 ng/dL de EPI y NE (Khort, W. et al., 1993), respectivamente, pero al realizar ejercicio moderado durante 90 minutos se registra un aumento de hasta el doble de NE, pero no de EPI (Christensen, N. et al., 1979). Notablemente, se han registrado aumentos considerables de estas catecolaminas en condiciones de inflamación sistémica. El trabajo de Ostrowski, et al., 2013 describe aumentos en la concentración plasmática de hasta dos veces en el caso de EPI y 18 veces en el caso de NE en shock séptico.

Cuando ocurre un estímulo a nivel fisiológico, los cambios en la concentración de catecolaminas plasmáticas ocurren de manera transitoria. Sin embargo, cuando existen condiciones de inflamación sistémica, por ejemplo, la sepsis, las catecolaminas aumentan, manteniendo elevadas las concentraciones plasmáticas por periodos prolongados.

1.4 Endotelio y regulación de la hemostasia

Las células endoteliales (CEs) corresponden a las células que conforman la pared interna de los vasos sanguíneos (endotelio). Estas células se caracterizan por ser muy activas tanto en condiciones normales como patológicas, respondiendo constantemente a su entorno (Aird, W., 2002). Probablemente, una de las funciones más relevantes del endotelio es la regulación de la hemostasia.

La coagulación es una parte importante de la regulación de la hemostasia. En condiciones normales permite mantener la sangre en el interior del vaso lesionado (Patthy, L. 1985). Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas en las que este proceso se encuentra desregulado, puede desencadenar en graves consecuencias en la salud, como trombosis (Juhan-Vague, I. et al., 2002) o hemorragia (Boks, A. L. 1986), es por ello que la regulación de la hemostasia ocurre a diferentes niveles: por un lado existe un estado que promueve la coagulación, que incluye proteínas procoagulantes como factores de coagulación (por ejemplo factor V y factor VIII), protrombina, fibrinógeno y factor de von Willebrand (vWF), entre otras; y proteínas antifibrinolíticas como el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-I). Por otro lado, existe el estado anticoagulante, que incluye proteínas fibrinolíticas como el activador tisular del plasminógeno (tPA), el plasminógeno y otras. El desequilibrio entre estos dos estados puede analizarse en un contexto clínico midiendo proteínas relevantes y sus actividades, indicando si un paciente presenta un estado procoagulante, dando paso a la formación de trombos o embolias, o un estado anticoagulante, aumentando el riesgo hemorrágico (Furie, B. 2008).

1.5 Sistema adrenérgico y su relación con la hemostasia

Desde el siglo pasado hasta la actualidad, diversas observaciones han demostrado una relación entre el SA y parámetros de coagulación en varios modelos de estudio, principalmente *in vitro* y en animales, pero también en humanos. Para poner en perspectiva, en 1947, los investigadores encontraron una relación entre el aumento de EPI y un incremento en la actividad fibrinolítica (Biggs R., et al., 1947). Estudios han sugerido que la estimulación RA- α_1 en conejos mediante norepinefrina induce trombosis glomerular (Latour, J. et al., 1985).

Con respecto a los humanos, es importante resaltar el papel de la actividad SA y las condiciones fisiopatológicas en varios parámetros, incluida la coagulación. Por ejemplo, se describió una relación positiva entre la inducción de estrés (factor relevante en el aumento de catecolaminas) y el aumento del dímero-D, un indicador de actividad trombótica (Wirtz, P. H. et al., 2006). Adicionalmente, el uso de agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos genera efectos positivos en el tratamiento de algunas enfermedades, incluyendo la hemofilia A, en donde la infusión de epinefrina aumentó la actividad del factor VIII (también conocido como factor antihemofílico) promoviendo la coagulación en los pacientes (Ingram, G. I. C. 1961). Asimismo, en pacientes que padecen de hiperplasia prostática benigna, el tratamiento con inhibidores selectivos de RA- α_1 disminuyó la agregación plaquetaria mejorando la supervivencia de los sujetos del estudio (Alan, C. et al., 2011).

1.6 Endotelio, hemostasia y sobreestimulación adrenérgica

Resultados de nuestro laboratorio (no publicados a la fecha) muestran que la estimulación de los RA- α_1 mediante fenilefrina *in vitro* aumenta la adhesión de plaquetas a las CEs. Por otro lado, la estimulación persistente de los RA- β con isoproterenol induce un aumento en la adhesión plaquetaria en condición endotóxica. Estos resultados sugieren que tanto la estimulación α_1 y β de manera independiente pueden aumentar la adhesión de plaquetas a CEs, aunque es relevante destacar que la estimulación β solo promueve la adhesión plaquetaria en un contexto inflamatorio (en este caso, pretratamiento con LPS).

Se ha reportado que la activación persistente de los RA- β produce disfunción endotelial (Johansson et al., 2015), induciendo la expresión de proteínas de adhesión del endotelio como ICAM-I y VCAM-I (Xiao et al., 2018) entre otros factores que promueven la coagulación. Por tanto, esta evidencia apunta a que la estimulación de los RA- α_1 y RA- β en CEs contribuye a la pérdida de la hemostasia.

1.7 Pregunta de investigación

Los antecedentes presentados anteriormente indican que la actividad adrenérgica se relaciona con la alteración de la hemostasia. Sin embargo, no hay trabajos que evalúen la acción conjunta de las catecolaminas EPI y NE sobre la hemostasia usando una razón de concentración EPI/NE fisiológica o patológica, y en tiempos de estimulación transitorio o persistentes. Así, nos preguntamos si la razón de concentración de EPI/NE, fisiológica o patológica, pueden ejercer efectos diferenciales sobre la hemostasia.

2. HIPÓTESIS

La estimulación *in vitro* de 24 horas de epinefrina y norepinefrina (EPI/NE) en una razón de concentración 1:130, considerada patológica, aumenta la adhesión de plaquetas a células EA.hy926; proceso que es mediado diferencialmente por los receptores adrenérgicos α_1 , β_1 y β_2 .

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la estimulación durante 24 horas con EPI y NE en una razón de concentración de EPI/NE 1:5, considerada fisiológica y 1:130, considerada patológica, sobre la adhesión de plaquetas a células EA.hy926 y la contribución de los receptores adrenérgicos α_1 , β_1 y β_2 al fenómeno.

3.2 Objetivos específicos:

- Evaluar la adhesión de plaquetas a células EA.hy926 estimuladas con una razón de concentraciones EPI/NE 1:5 o 1:130 a 3 horas y 24 horas.
- Evaluar el efecto sobre la adhesión plaquetaria a células EA.hy926 de la inhibición farmacológica de receptores adrenérgicos α_1 , β_1 y β_2 cuando son estimuladas 24 horas con una razón de concentración EPI/NE 1:130.

4. MATERIALES Y MÉTODOLÓGÍA

4.1 Reactivos utilizados, composición y procedencia

Tabla 1: Reactivos utilizados, composición y procedencia

RECTIVO	COMPOSICIÓN	MARCA
DMEM Low	Medio DMEM Low con adición de 50 U/mL de penicilina y estreptomina (Sigma)	GIBCO, NY
FBS	FBS inactivado y filtrado	GIBCO, NY
TRIPSINA 1X	0,25 g de tripsina porcina y 0,38 g de EDTA tetrasódico en 9 mL de PBS	GIBCO, NY
DMSO	Dimetilsulfóxido para cultivo celular	Sigma
EPI	(-) Epinefrina	Cayman Chemical co.
NE	(-) Norepinefrina bitartrato hidrato.	Cayman Chemical co.

4.2. Soluciones utilizadas

Tabla 2: Soluciones utilizadas y composición

NOMBRE	COMPOSICIÓN
Buffer HEP	NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; HEPES 3,8 mM; EGTA 5 mM.
Buffer ACD	Ácido cítrico 39 mM; citrato de sodio 73 mM; glucosa 135 mM.
Buffer HEPES-Tyrodes libre de MgCl₂	NaCl 134 mM; NaHCO ₃ 12 mM; KCl 2,9 mM; NaH ₂ PO ₄ 0,34 mM; HEPES 5 mM; glucosa 5 mM; BSA 1%.
Buffer PBS 1X (pH 7,4)	NaCl 68,5 mM; 1,34 mM KCl; 1,73 mM KH ₂ PO ₄ ; Na ₂ HPO ₄ X 2H ₂ O 5,3 mM
PFA 3.7% (pH 6,9)	3,7 g de PFA, 100 mL de PBS 1X

4.3 Soluciones de catecolaminas:

Materiales: (-) Epinefrina, (-) Norepinefrina bitartrato hidrato. DMSO, DMEM-Low 1% FBS.

Metodología: Se prepararon soluciones stock de 5 mM de (-) Epinefrina (EPI) y 10 mM de (-) Norepinefrina bitartrato hidrato (NE) en DMSO. Las soluciones se mantuvieron a -20° C, como indica la ficha técnica de los reactivos. Para las soluciones de trabajo, se tomó una alícuota de 50 µL de solución stock de EPI en 950 µL de DMEM-Low 1% FBS y 25 µL de solución stock de NE en 975 µL de DMEM-Low 1% FBS para un volumen final de 1 mL.

4.4 Cultivo celular Endotelial: EA.hy926

Materiales: Células EA.hy926 (ATCC, USA), Tripsina 1X, PBS 1X, DMEM Low 10% FBS, tubo de centrifuga de 15 mL, placa de cultivo 10 cm de diámetro.

Método: Para cada nuevo pasaje se vació el medio de la placa madre y se lavó con PBS 1X. Se agregó 1 mL de tripsina 1:10 PBS y se incubó a 37°C por 5 minutos. Luego, se agregaron 2 mL de medio DMEM-Low 10% FBS para lavar la placa y recuperar las células suspendidas en un tubo de centrifuga de 15 mL. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL DMEM Low 10% FBS. Se colocó en la placa de 10 cm de diámetro un volumen equivalente a 1×10^6 células y se añadieron 10 mL de DMEM Low 10% FBS. La placa se llevó a incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂.

4.5 Ensayo de viabilidad celular.

Materiales: (-) epinefrina, (-) norepinefrina bitartrato, DMSO, DMEM Low 1% FBS, isopropanol-HCl 0,1%, MTT, PBS, placa de 96 pocillos.

Método: Células EA.hy926 (ATCC, USA) fueron crecidas a 37°C en una atmósfera 5%:95% CO₂:Aire en medio DMEM-Low 10% FBS. Las células fueron mantenidas, se trataron con tripsina 1X y posteriormente fueron sembradas para experimentos en placas de 96 pocillos a una concentración de 15000 en 100 µL de DMEM-Low 1% FBS. Las células se llevaron a incubación con sus respectivos tratamientos, con DMSO 10% como control de muerte celular durante 24 horas. Se lavó la placa con PBS y se añadieron 100 µM de MTT 0,5 mg/mL preparado en medio DMEM Low 1% FBS y se llevaron a incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂ durante 4 horas. Luego se añadió isopropanol-HCl 0,1% y se resuspendió vigorosamente. La cuantificación se realizó mediante colorimetría por absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Para calcular el porcentaje de viabilidad de las células en cada condición se utilizó la siguiente fórmula en cada réplica y se obtuvo la media

$$\frac{A_{\text{obs}} - A_{\text{Bcl}}}{A_{\text{ctl}} - A_{\text{Bcl}}} * 100$$

Donde A_{obs} : Absorbancia de la condición experimental

A_{Bic} : Absorbancia del blanco

A_{ctl} : Absorbancia del control positivo

4.6 Purificación de plaquetas

Materiales: Sangre anticoagulada con citrato, HEPES, HEPES-Tyrode's, ACD, sonda DiO, tubos de centrifuga de 15 mL.

Método: Se obtuvieron 10 mL de sangre completa de voluntarios de sexo masculino sanos de entre 18 y 40 años que no hayan sido donantes de sangre ni hayan consumido algún fármaco que pudiese afectar la adhesión plaquetaria (AINEs o anticoagulantes) en al menos 2 semanas previo a la extracción. Se realizó una flebotomía con mariposa en la vena media cefálica o basílica (dependiendo de accesibilidad) y se recuperó la sangre en tubos vacutainer de 2,5 mL con citrato de sodio como anticoagulante. Se transfirió la sangre a un tubo de centrifuga de 15 mL y se centrifugó a 200 g a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se recuperó el sobrenadante (plasma rico en plaquetas) y se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga de 15 mL. Se añadió HEPES en una proporción 1:1 y se centrifugó a 400 g con las condiciones anteriores. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga y se añadió ACD en proporción 1:10 con respecto al volumen de sobrenadante obtenido. El tubo se llevó a centrifugación a 3000 g a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de HEPES-Tyrode's para contar plaquetas en cámara de Neubauer. Se añadieron 4 μ L de DiO por cada 1×10^6 de plaquetas y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Luego, el tubo se llevó a centrifugación a 3000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el sobrenadante en 1 mL de ACD. Este último paso se repitió 3 veces. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en el volumen necesario de DMEM-Low 1% FBS. **(Ver figura 2)**

4.7 Ensayo de adhesión celular con catecolaminas

Materiales: Placa de 96 pocillos, células EA.hy926, DMEM-Low 10% FBS, DMEM-Low 1% FBS, EPI, NE.

Método: Se sembraron 25000 células EA.hy926 por pocillo en 200 μ L de medio DMEM-Low 10% FBS y se incubaron por 24 horas a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Luego, se retiró el medio y se lavó la placa una vez con PBS 1X tibio. Se añadieron 45 μ L de una solución stock 10 mM de NE para la concentración final patológica y 1 μ L de la misma solución stock para la concentración final fisiológica. Conjuntamente se añadió 1 μ L de EPI desde una solución stock 5 mM de EPI para la concentración final fisiológica y 1,5 μ L de la misma solución para la concentración final patológica para alcanzar la razón EPI/NE respectiva. Luego, se añadieron 100 μ L de plaquetas en DMEM-low 1% FBS a cada grupo experimental. El volumen final de experimentación fue de 200 μ L. El tiempo de co-cultivo fue de 3 horas para estimulación transitoria y 24 horas para persistente. **(Ver figura 3)**

4.8 Ensayo de adhesión celular con catecolaminas y antagonistas adrenérgicos.

Materiales: Placa de 96 pocillos, células EA.hy926, DMEM-Low 10% FBS, DMEM-Low 1% FBS, EPI, NE, Terazosina, Bisoprolol, Butoxamina.

Metodología: Una hora antes de repetir la metodología para concentración patológica y estimulación persistente en 5.5, se añadieron 2 μ L de terazosina de un stock de 100 μ M, para lograr una concentración experimental de 200 nM. En

otra condición, se añadieron 20 μL de un stock de 10 μM de butoxamina para una concentración final de 1 μM . En la última condición se añadieron 2 μL de bisoprolol 20 μM para una concentración final experimental de 200 nM. (**Ver figura 3**)

4.9 Fijación de placas

Materiales: PFA 3.7%, PBS 1X

Metodología: Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X tibio. Posteriormente se incubaron las placas con 50 μL de PFA 3.7% durante 15 minutos. Finalmente, el PFA se lavó con PBS 1X tibio 3 veces para eliminar posibles cristales. La placa se mantuvo con 100 μL de PBS 1X a 4°C hasta su análisis.

4.9.1 Análisis de adhesión plaquetaria

Metodología: Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante Fluid live cell imaging®. El análisis de fluorescencia se realizó mediante ImageJ® con la siguiente estrategia: Calidad de imagen 8 bit > Invertir color > ajustar *threshold* > análisis de área. Una vez obtenidos los datos de área fluorescente total, esta se normalizó por el número de células respectiva de cada imagen. El resultado de fluorescencia/nº de células de cada imagen se normalizó por el control obteniendo la adhesión plaquetaria relativa (control = 1 unidades arbitrarias).

4.9.2 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron en Prism7 ®. Se aplicó ANOVA de una vía con un post-test de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados se presentan en media \pm desviación estándar (DE).

Tabla 3. Grupos experimentales y tratamientos del objetivo específico 1

Grupo	Epinefrina (ng/mL)	Norepinefrina (ng/mL)	Razón de concentración (EPI/NE)	Tiempo de cultivo (Horas)
Control	0	0	-	3
				24
EPI/NE (F)	0,05	0,28	1:5 (F)	3
				24
EPI/NE (P)	0,072	9,43	1:130 (P)	3
				24

Nota: las concentraciones se obtuvieron del estudio de Ostrowski, et al, 2013.

Tabla 4. Grupos experimentales y tratamientos del objetivo específico 2

Grupo	Epinefrina (ng/mL)	Norepinefrina (ng/mL)	Razón de concentración (EPI/NE)	Inhibidor adrenérgico	Tiempo de cultivo (Horas)
Control	0	0		-	24
Control Inhibición	0	0		+	24
EPI/NE (P)	0,072	9,43	1:130 (P)	+	24

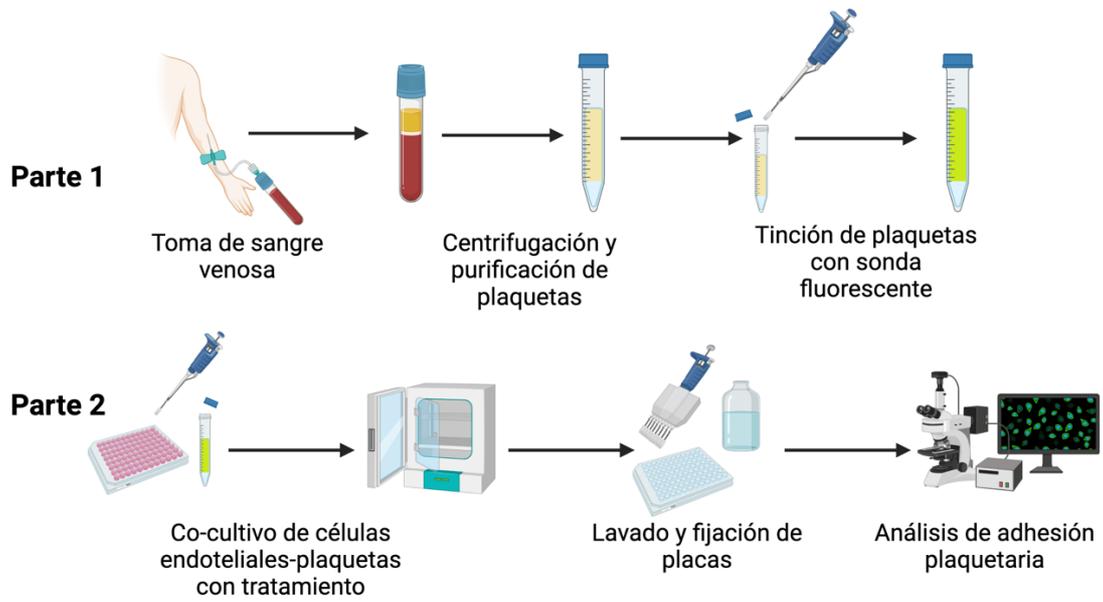


Figura 2. Esquema general del procedimiento experimental. En la parte 1 se representa el proceso de obtención de plaquetas desde la muestra de sangre completa. En la parte 2 se representa el proceso general de co-cultivo y posterior análisis de las placas.

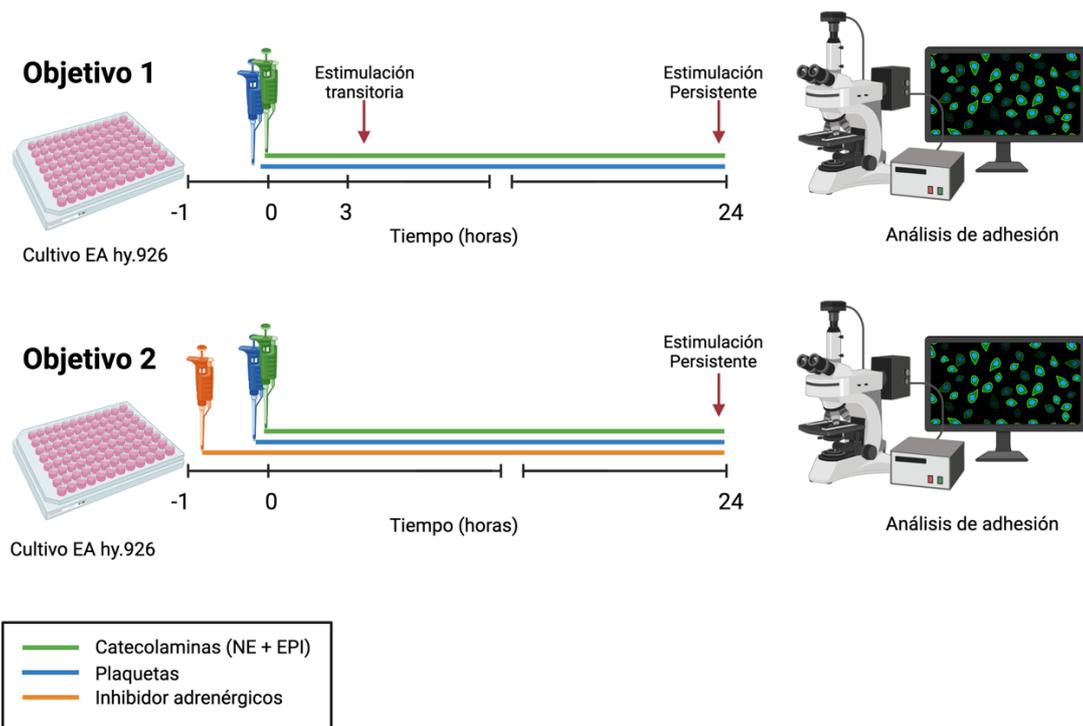


Figura 3. Representación de la aplicación de los distintos tratamientos sobre el cultivo de células endoteliales EA.hy926. En el objetivo 1 se realiza un tratamiento con catecolaminas epinefrina (EPI) y norepinefrina (NE) en una razón de concentración fisiológica o patológica en tiempos transitorios (3 horas) o persistentes (24 horas). Junto con las catecolaminas, se añaden las plaquetas purificadas y teñidas. Los tiempos de lectura (fin del co-cultivo) se señalan con una flecha sobre la línea de tiempo. En el objetivo 2 se realiza un pretratamiento una hora antes con inhibidores adrenérgicos: terazosina, bisoprolol o butoxamina. Posteriormente se realiza tratamiento con catecolaminas EPI o NE en concentraciones patológicas y se añaden las plaquetas teñidas. El co-cultivo se finaliza a las 24 horas.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de viabilidad de EA.hy926 con catecolaminas en distintas concentraciones.

Para determinar la factibilidad del uso de las catecolaminas en las concentraciones reportadas, se realizó una curva de viabilidad celular con MTT.

El fundamento de este ensayo colorimétrico consiste en el análisis indirecto de la metabolización de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan mediante reductasas mitocondriales, permitiendo, entonces, la estimación de la células viables y metabólicamente activas en función de la intensidad de color púrpura (Stockert J, C. et al., 2018). Se utilizó como control positivo de muerte celular DMSO al 10%. Se realizaron 3 curvas, cada una representando un tratamiento distinto: epinefrina, norepinefrina o ambas, en concentraciones crecientes. Las catecolaminas demuestran tener un amplio rango de tolerancia en las concentraciones evaluadas, tanto de manera individual, como en conjunto. Los resultados gráficos se muestran en la **figura 4.**

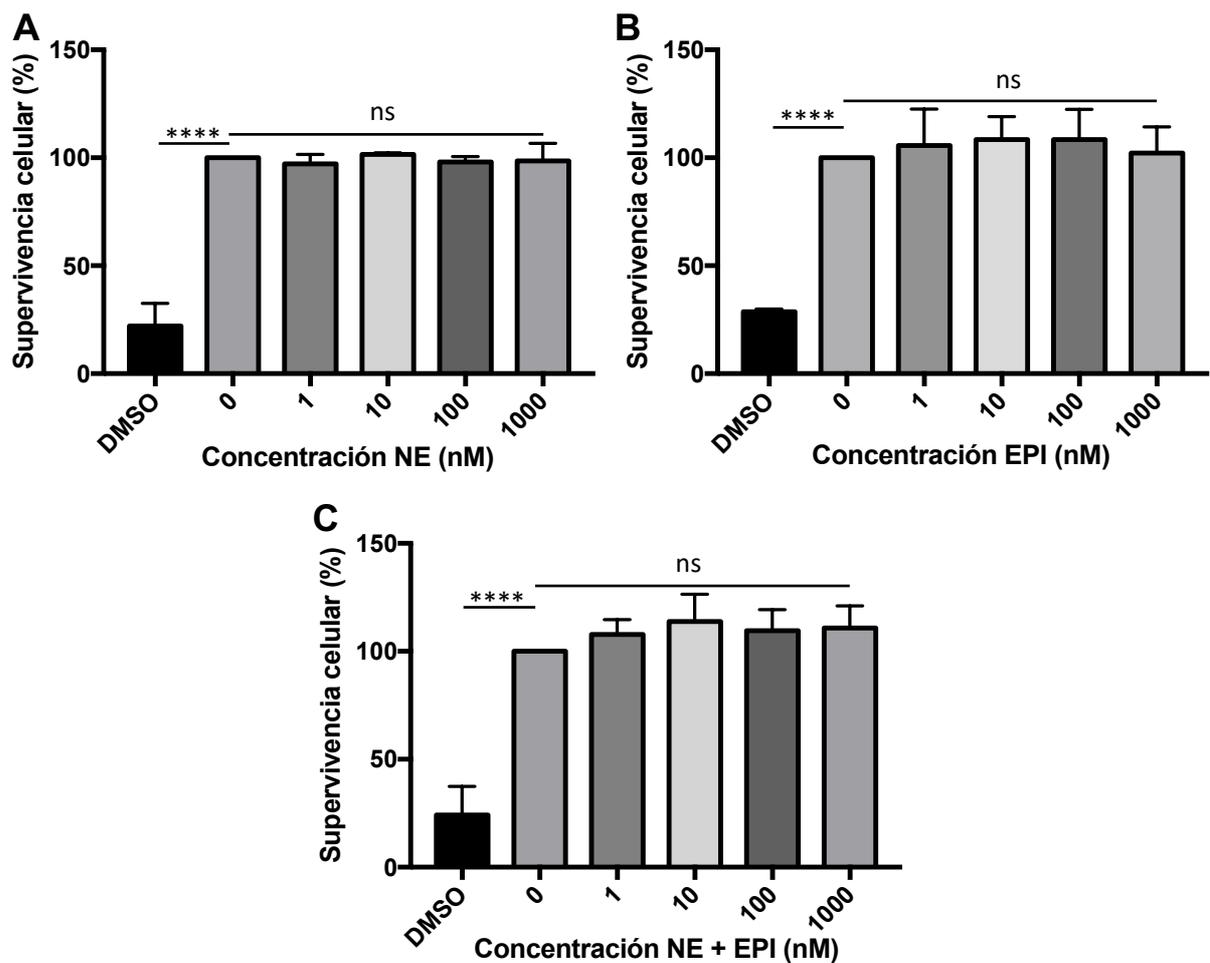


Figura 4. Curva de viabilidad de EA.hy926 ante catecolaminas. Los gráficos muestran el porcentaje (%) de supervivencia celular frente al grupo control negativo (0 nM). Como control de muerte celular, se utilizó DMSO al 10%. (A) Concentraciones crecientes de norepinefrina (NE). (B) Concentraciones crecientes de epinefrina (EPI). (C) Concentraciones crecientes de norepinefrina más epinefrina (NE + EPI). Los resultados se presentan en Media \pm DE. (ns)= no significativo; (****) = $p < 0,0001$

5.2 La estimulación transitoria de EPI y NE aumenta la adhesión plaquetaria a células endoteliales.

Para simular una condición de estimulación transitoria, las células se incubaron con tratamientos y plaquetas durante 3 horas. La **figura 5** muestra el gráfico de adhesión plaquetaria relativa a la condición control. Se puede observar que tanto a concentraciones fisiológicas (F) (0,28 y 0,05 ng/mL de NE y EPI, respectivamente), equivalente a una razón de concentración EPI/NE de 1:5; como patológicas (P) (9,43 y 0,072 ng/mL de NE y EPI, respectivamente), correspondientes a una razón de concentración EPI/NE de 1:130), la adhesión de plaquetas es significativamente mayor, siendo aún más en la razón de concentración patológica

5.3 La estimulación persistente de EPI y NE tiene efectos distintos sobre la adhesión plaquetaria dependiendo de la concentración de catecolaminas.

Para simular una estimulación persistente, las células se incubaron 24 horas con sus respectivos tratamientos y plaquetas. En la **figura 6** se puede observar que, en concentraciones fisiológicas (F), la adhesión plaquetaria disminuye levemente con respecto al control. Sin embargo, en concentraciones patológicas (P), la adhesión plaquetaria es significativamente mayor con respecto al control sin tratamientos. Cabe destacar que, en comparación a la condición de estimulación transitoria, el área de fluorescencia por campo, que representa a la cantidad de plaquetas adherida es notablemente mayor (datos no mostrados).

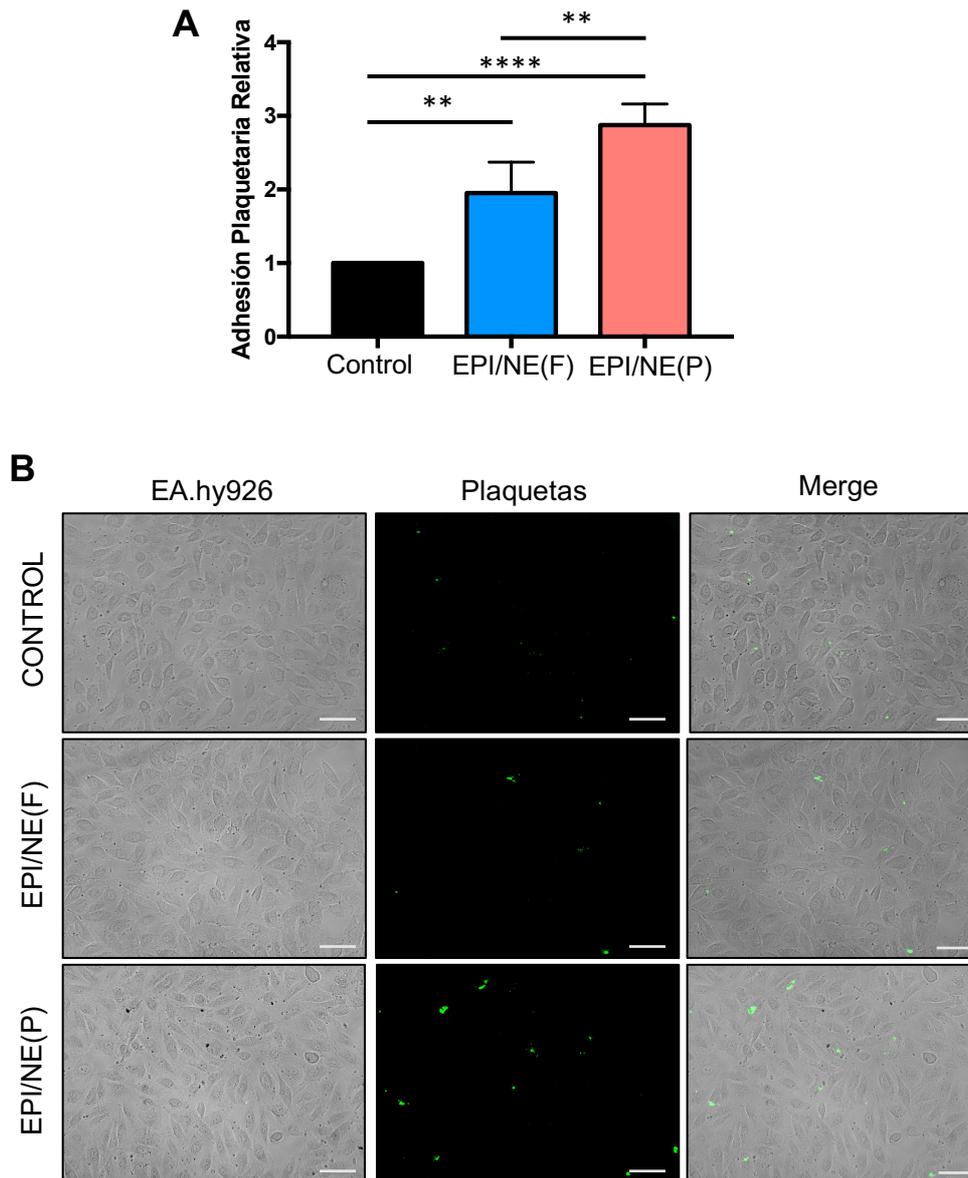


Figura 5. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación transitoria (3 horas) con NE y EPI. (A) Cuantificación de la adhesión plaquetaria con respecto al control sin tratamiento. (B) Imágenes representativas de la adhesión de plaquetas (verde, tinción DiO) a células endoteliales EA.hy926 en las tres condiciones correspondientes. EPI/NE (F): norepinefrina y epinefrina en concentraciones fisiológicas. EPI/NE (P): norepinefrina y epinefrina en concentraciones patológicas. Los resultados se presentan en Media \pm DE. (**) $p < 0,01$; (****) $p < 0,0001$. Barra de escala: 100 μ m

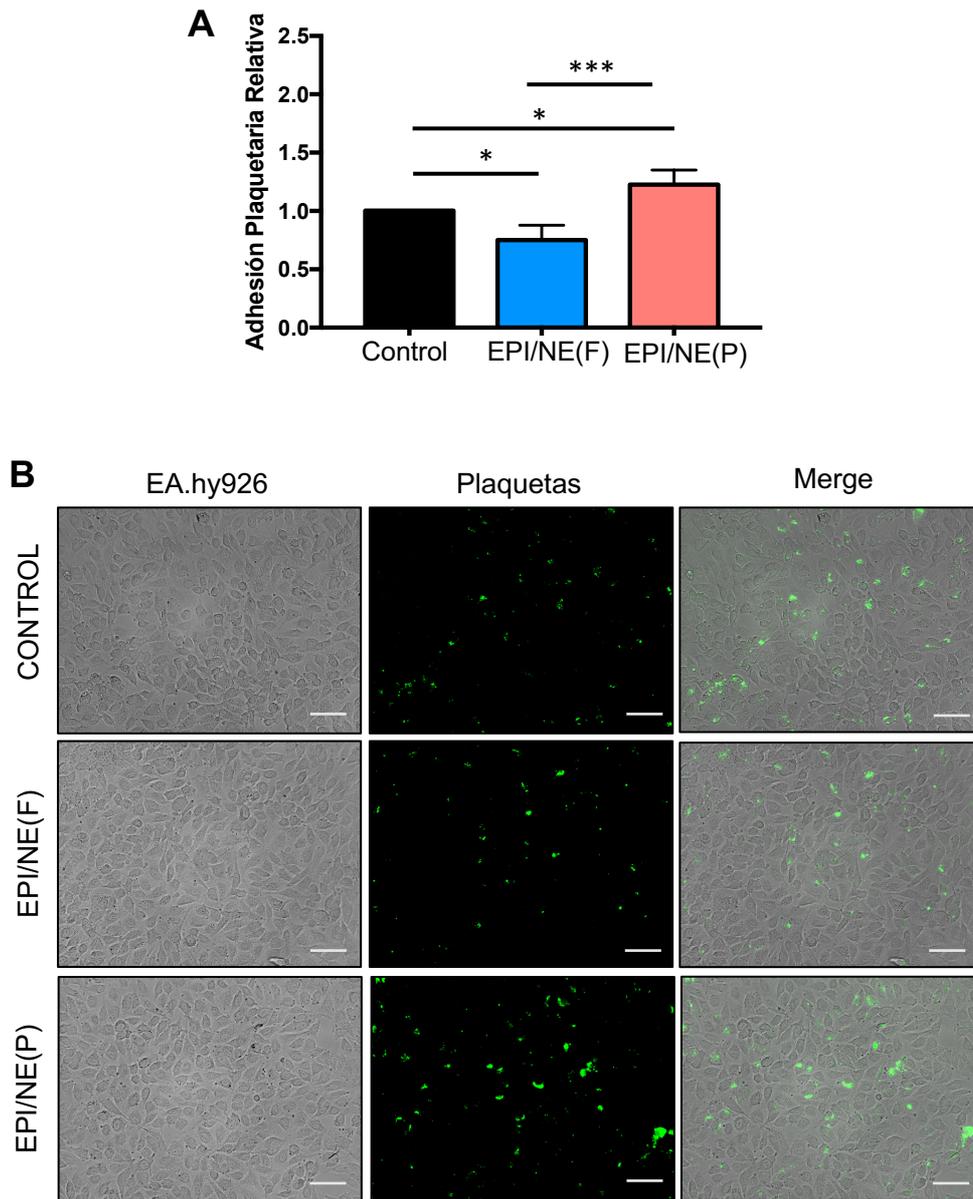


Figura 6. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con NE y EPI. (A) Cuantificación de la adhesión plaquetaria con respecto al control sin tratamiento. (B) Imágenes representativas de la adhesión de plaquetas (verde, tinción DiO) a células endoteliales EA.hy926 en las tres condiciones correspondientes. EPI/NE (F): norepinefrina y epinefrina en concentraciones fisiológicas. EPI/NE (P): norepinefrina y epinefrina en concentraciones patológicas. Los resultados se presentan en Media \pm DE. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$. Barra de escala: 100 μ m.

5.4 La inhibición de RA- α_1 y β_1 previene el aumento de la adhesión plaquetaria a células EA.hy926 en condiciones de estimulación patológicas y persistentes.

Los RA- α_1 y β_1 se inhibieron farmacológicamente realizando un pretratamiento una hora antes con terazosina (TER) y bisoprolol (BIS) respectivamente, en condiciones separadas. Posteriormente, se realizó la incubación con el tratamiento de catecolaminas en concentraciones patológicas por 24 horas. En las **figuras 7 y 8**, se puede observar que la adhesión plaquetaria no aumenta de manera significativa con respecto al control sin tratamiento para la inhibición de RA- α_1 y RA- β_1 respectivamente.

5.5 La inhibición de RA- β_2 no previene el aumento de la adhesión plaquetaria inducido por concentraciones patológicas de catecolaminas en estimulación persistente.

La inhibición farmacológica de los RA- β_2 se realizó con butoxamina (BUT), pretratando las células una hora antes con el fármaco, para posteriormente realizar el tratamiento con catecolaminas en concentraciones patológicas durante 24 horas. La **figura 9** muestra cómo, aun con este tratamiento, la adhesión plaquetaria relativa al control sin tratamiento aumenta de manera leve, pero significativa.

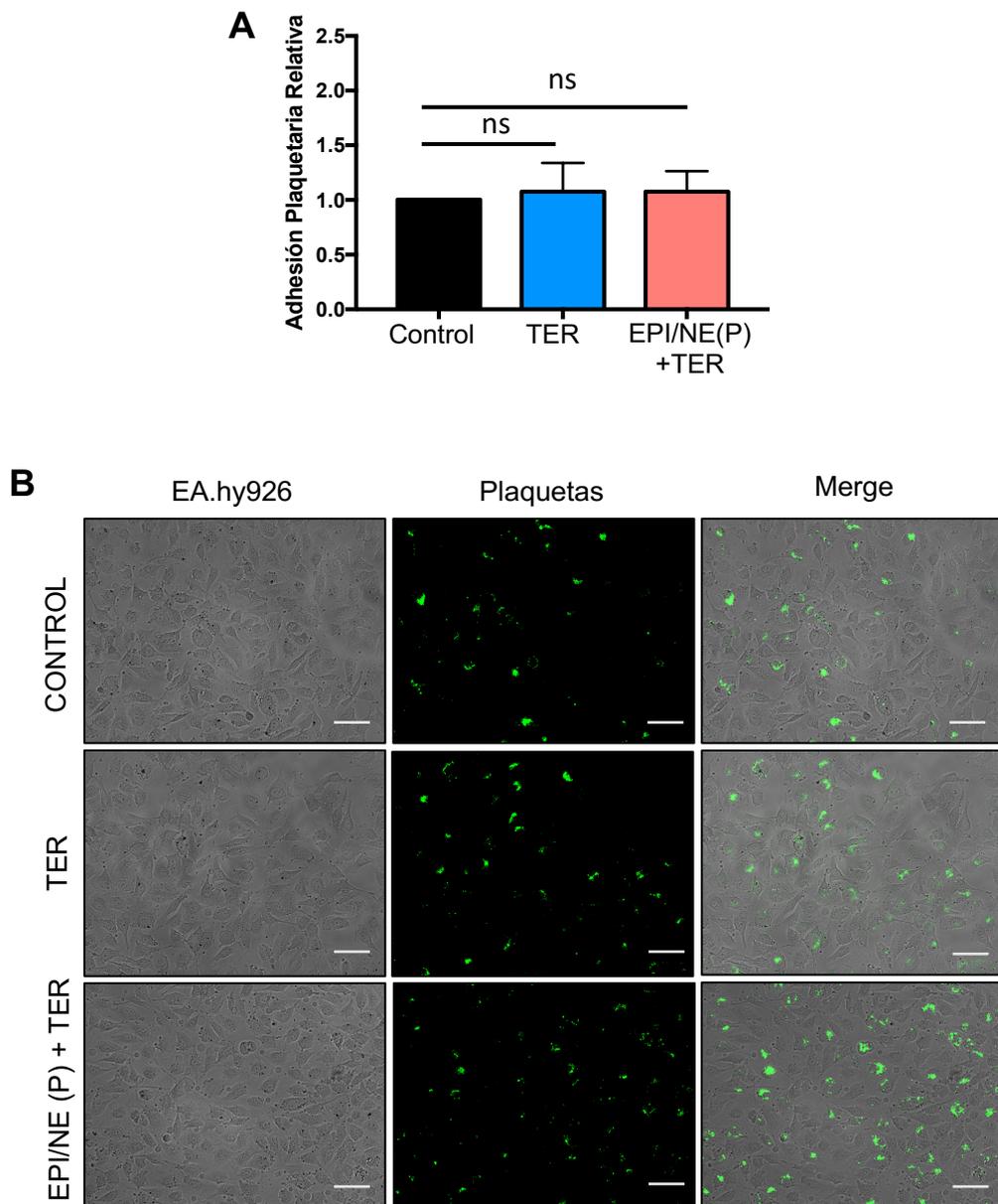


Figura 7. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con EPI y NE en una razón de concentración EPI/NE de 1:130 (P) e inhibición farmacológica de RA- α 1 con terazosina. (A) Cuantificación de la adhesión plaquetaria con respecto al control sin tratamiento. (B) Imágenes representativas de la adhesión de plaquetas (verde, tinción DiO) a células endoteliales EA.hy926 en las tres condiciones correspondientes. TER: terazosina. EPI/NE (P): norepinefrina y epinefrina en concentraciones patológicas. Los resultados se presentan en Media \pm DE. (ns): no significativo. Barra de escala: 100 μ m.

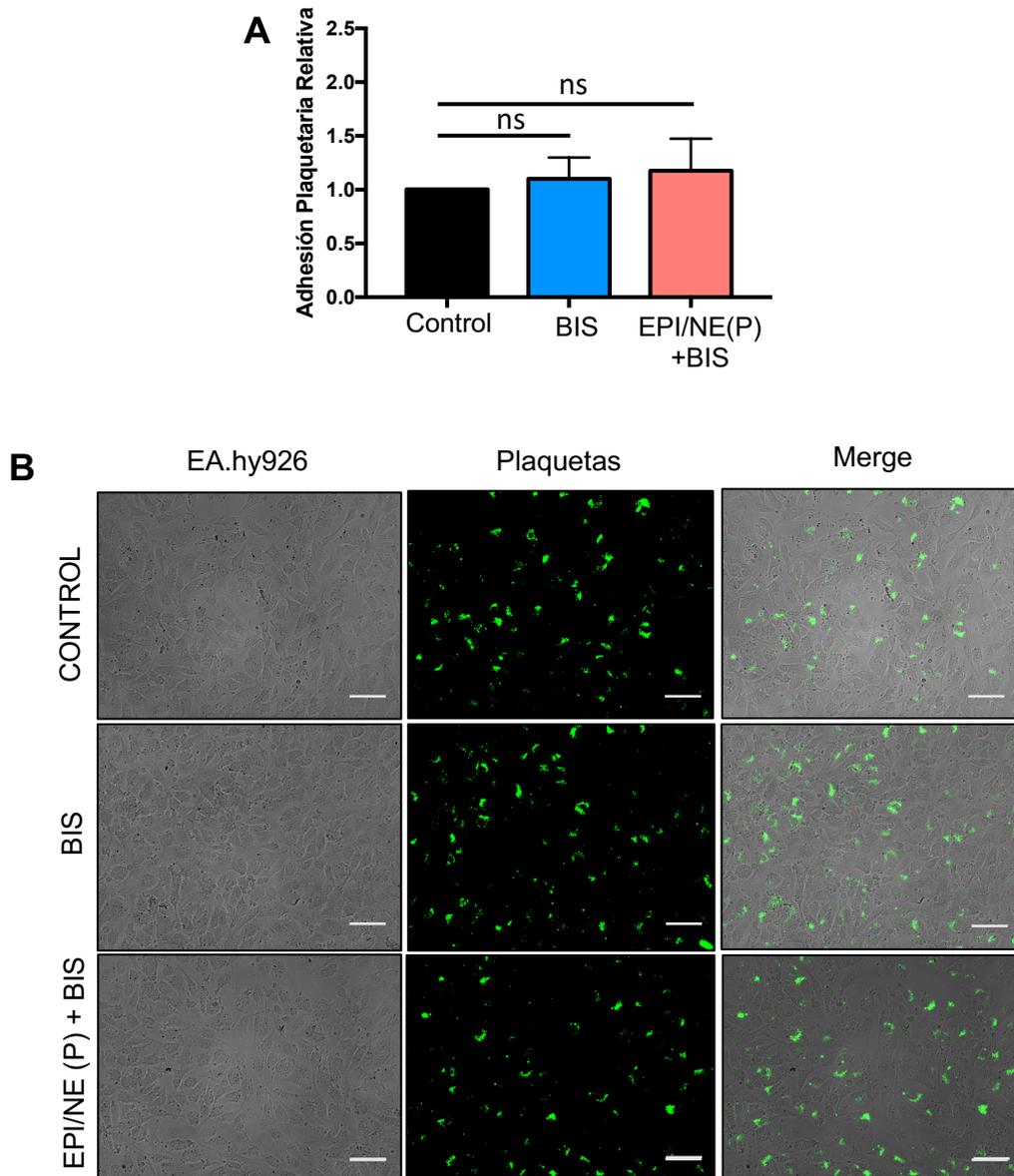


Figura 8. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con EPI y NE en una razón de concentración EPI/NE de 1:130 (P) e inhibición farmacológica de RA- β 1 con bisoprolol. (A) Cuantificación de la adhesión plaquetaria con respecto al control sin tratamiento. (B) Imágenes representativas de la adhesión de plaquetas (verde, tinción DiO) a células endoteliales EA.hy926 en las tres condiciones correspondientes. BIS: bisoprolol. EPI/NE(P): norepinefrina y epinefrina en concentraciones patológicas. Los resultados se presentan en Media \pm DE. (ns): no significativo. Barra de escala: 100 μ m.

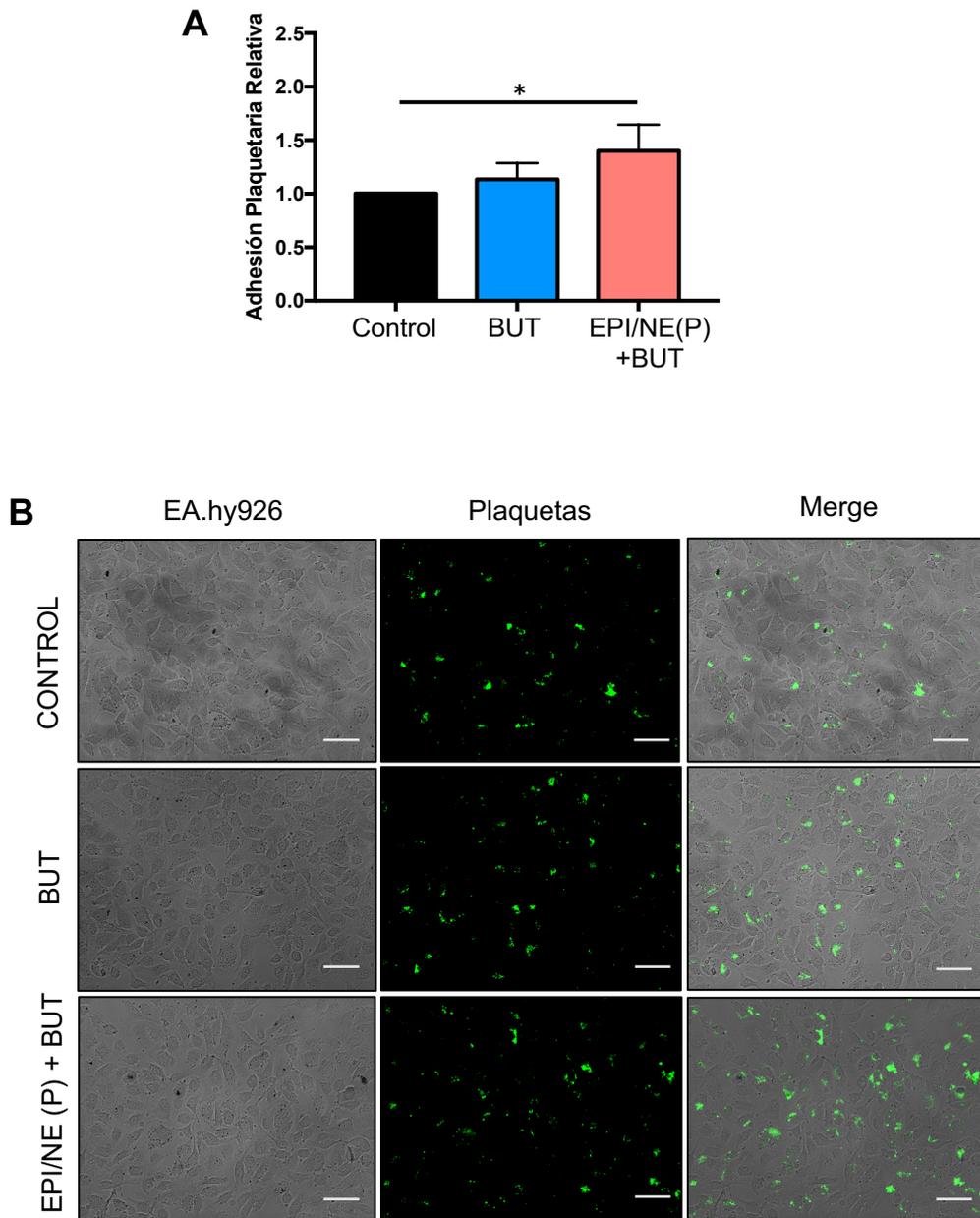


Figura 9. Adhesión plaquetaria relativa en estimulación persistente (24 horas) con EPI y NE en una razón de concentración EPI/NE de 1:130 (P) e inhibición farmacológica de RA- β 2 con butoxamina. (A) Cuantificación de la adhesión plaquetaria con respecto al control sin tratamiento. (B) Imágenes representativas de la adhesión de plaquetas (verde, tinción DiO) a células endoteliales EA.hy926 en las tres condiciones correspondientes. BUT: butoxamina. EPI/NE(P): norepinefrina y epinefrina en concentraciones patológicas. Los resultados se presentan en Media \pm DE. (*) $p < 0,05$. Barra de escala: 100 μ m.

6. DISCUSIÓN

Las catecolaminas adrenérgicas epinefrina y norepinefrina se relacionan con la regulación de distintos parámetros a nivel fisiológico, sobre todo a nivel cardiovascular, donde regulan, entre otros, la frecuencia cardíaca, la presión arterial y, según muestran estos resultados además de la literatura, la hemostasia.

El endotelio es un tejido sensible a la estimulación adrenérgica y también es un gran regulador de la hemostasia. Debido a su relevancia en el desenlace de la coagulación, se ha optado por un nuevo modelo que lo incluya, conocido como el “modelo celular de la coagulación”, ya que su señalización y soporte molecular representa una fracción fundamental de este proceso en el organismo.

En este sentido, el estudio del endotelio, la estimulación adrenérgica y la coagulación ha tomado relevancia desde hace años, debido a que es un sistema sensible ante condiciones tanto fisiológicas como patológicas, cambiando las concentraciones de epinefrina y norepinefrina de manera transitoria o persistente, lo cual puede tener diversos efectos en el organismo. Además, el SA ha sido intervenido farmacológicamente para el tratamiento de distintas enfermedades relativamente comunes. Sin embargo, a pesar de que se han descrito relaciones directas o indirectas entre estos factores, las condiciones de experimentación se han realizado de tres maneras: con estimulación específica de RAs, con inhibición específica de RAs o de manera observacional, como consecuencia del tratamiento farmacológico con agonistas o antagonistas adrenérgicos. Indudablemente, la coagulación es un sistema que involucra un sinnúmero de factores tanto celulares como moleculares, y este panorama se vuelve aún más complejo si tomamos en cuenta que las catecolaminas poseen

una diversidad de receptores mecanísticamente diversos y relativamente inespecíficos a su activación, ya que estas neuro-hormonas presentan promiscuidad en su afinidad, lo cual suma otros factores como la densidad de los RAs en el respectivo tejido, además de la concentración de estas catecolaminas a nivel local.

Este trabajo busca aproximar el estudio de esta relación de estimulación simpática y coagulación hacia una perspectiva algo más cercana a lo que ocurre en el organismo.

Al comparar la aplicación de la razón EPI/NE fisiológica se puede dar cuenta de dos fenómenos, el primero, es que en un tiempo de 3 horas de cocultivo, en comparación a las 24 horas, la adhesión plaquetaria es basalmente menor. Por otro lado, el efecto de la concentración fisiológica sobre la adhesión es distinto entre estos dos tiempos. Este fenómeno puede ser explicado desde distintas aristas, la primera es que, en una estimulación a tiempos cortos, el efecto en los cambios de adhesión puede deberse a la activación de la célula endotelial y posterior liberación de los cuerpos de Weibel-Palade (WP) por estimulación adrenérgica (van Mourik, J. A. et al., 2002). Los cuerpos de Weibel-Palade son reservas de moléculas relacionadas a la regulación de la hemostasia, conteniendo, entre otras, vWF, PAI-I y tPA. Por otra parte, una estimulación más prolongada, como en un tiempo de 24 horas, induce otros efectos celulares a largo plazo, como la expresión *de novo* de proteínas, las que podrían incluir proteínas de adhesión plaquetaria como ICAM-I y VCAM-I (Xiao et al., 2018). Un análisis molecular es necesario para determinar este cambio y su magnitud en estos tiempos de estimulación y concentraciones.

Con respecto a la inhibición farmacológica de los RA, la inhibición de los RA- α_1 y β_1 logra prevenir el aumento en la adhesión plaquetaria inducido por las concentraciones patológicas de catecolaminas en una situación de estimulación persistente. Sin embargo, la aplicación de butoxamina con consecuente inhibición de RA- β_2 no logra prevenir de manera completa este efecto. Este fenómeno podría tener relación con la complejidad que subyace al SA. No existe literatura consistente que muestre la densidad de distintos receptores adrenérgicos existentes en células EA.hy926 ni el cambio que puedan experimentar en el tiempo debido a distintas señales de estimulación. Estudios han demostrado que la estimulación de receptores β_2 se relaciona fuertemente a la expresión en superficie de proteínas de adhesión a través de los cuerpos de WP (van Mourik, J. A. et al., 2002), por lo tanto, la poca capacidad de prevención de la adhesión plaquetaria aumentada cuando se aplica butoxamina debe ser analizada a más profundidad tanto de manera cinética, para comprobar si existe una contribución de señalización nuclear y posterior expresión de proteínas en el tiempo de 24 horas, como de manera funcional, estudiando, por ejemplo, la densidad de receptores β_2 existente en este tipo de CEs y su potencia en relación a antagonistas transduccionales biológicos como la vía de la proteína G_i .

Dentro de la señalización canónica de los RA, estudios han relacionado la actividad de segundos mensajeros río abajo, como cAMP y DAG con la actividad de canales de Ca^{2+} de membrana, TRPM7 (Takezawa et al., 2004) y TRPC6 (Li et al., 2019), respectivamente, lo que podría explicar, al menos en parte, el aumento de la expresión de proteínas de adhesión, lo que contribuiría directamente a la adhesión plaquetaria a células endoteliales independientemente de que estos RA estimulen o no el aumento de la

concentración de Ca^{2+} citoplasmático desde reservorios internos como el retículo endoplásmico.

En conjunto con todo lo anterior, este trabajo evidencia, en parte, la complejidad que caracteriza al sistema adrenérgico en la regulación de diversos parámetros en el organismo, como la hemostasia. Se puede destacar que el rol de las catecolaminas es relevante en los procesos de coagulación representados, por la adhesión plaquetaria a células endoteliales. Mayores estudios deben realizarse para desglosar de manera más fina la contribución de cada uno de los actores participantes en este fenómeno, como la densidad de receptores adrenérgicos en los distintos endotelios, concentraciones locales de catecolaminas, análisis moleculares que den cuenta de la expresión de proteínas y factores reguladores de la hemostasia tanto en tiempo de estimulación como en concentración de catecolaminas, entre otros.

A pesar de que el sistema adrenérgico comienza sus estudios hace muchos años, las actuales tecnologías y metodologías de investigación podrían re-dirigir su estudio hacia un enfoque más fino, lo que podría abrir puertas en diversas áreas relacionadas a la fisiopatología humana.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la adhesión plaquetaria a células endoteliales EA.hy926 depende tanto de la razón de concentración de epinefrina y norepinefrina, como del tiempo de estimulación que ejerce dicha concentración, siendo las concentraciones patológicas de catecolaminas (la razón EPI/NE de 1:130) un factor que muestra aumentar la adhesión plaquetaria independiente del tiempo de estimulación evaluado. Además, los distintos tipos de receptores adrenérgicos desempeñan un aporte diferenciado a este fenómeno, siendo dependiente de la actividad de α_1 y β_1 , pero no completamente de β_2 .

Futuras investigaciones son necesarias para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno, como puede ser una reprogramación de la expresión y representación de los diversos receptores adrenérgicos en la superficie celular y cambios transcripcionales que deriven en un funcionamiento endotelial que favorezca la persistencia de un fenotipo procoagulante.

8. PRODUCTOS GENERADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

8.1 Presentaciones en congresos

- Diego Aravena, Felipe M. Llancahuen, Felipe Simon. Adrenergic stimulation and hemostasis in health and disease: Effects of concentration and stimulation time of adrenalin and noradrenalin on platelet adhesion to Endothelial Cells. Presentación de póster en XXXVII reunión anual de la Sociedad Chilena de Fisiología, año 2022.

8.2 Publicaciones

- Sebastián Gatica, Diego Aravena, Cesar Echeverria, Juan F Santibanez, Claudia A Riedel, Felipe Simon. (2022) "Effects of adrenergic receptor stimulation on human hemostasis: A systematic review". Aceptado.
- Yolanda Prado, Diego Aravena, Felipe M. Llancahuen, Cristóbal Aravena, Felipe Eltit, Cesar Echeverria, Sebastián Gatica, Claudia A Riedel, Felipe Simon. 2022. "Statins and hemostasis: therapeutic potential based on clinical evidence". Aceptado.
- Felipe M. Llancahuen, Alejandro Vallejos, Diego Aravena, Yolanda Prado, Sebastián Gatica, Carolina Otero, Felipe Simon. 2022. "α1-adrenergic stimulation increases platelet adhesion to endothelial cells mediated by TRPC6". Aceptado.
- Yolanda Prado, Cristóbal Aravena, Diego Aravena, Felipe Eltit, Sebastián Gatica, Claudia A. Riedel, Felipe Simon. 2022. "Small plastics, big inflammatory problems". Aceptado.

- Sebastián Gatica, Cristobal Aravena, Yolanda Prado, Diego Aravena, Cesar Echeverria, Juan F Santibanez, Claudia A Riedel, Felipe Simon. 2022. "Appraisal of the neuroprotective effect of dexmedetomidine: a meta-analysis". Aceptado.

9. REFERENCIAS

- Aird, W. C. (2002). Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Critical Care Medicine*, 30(Supplement_5).
- Alan, C., Kirilmaz, B., Koçoğlu, H., Ersay, A. R., Ertung, Y., Eren, A. E. (2011). Comparison of effects of alpha receptor blockers on endothelial functions and coagulation parameters in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 77(6), 1439–1443.
- Biggs R., MacFarlane, R G., Pilling J. (1947) Observations on fibrinolysis; experimental activity produced by exercise or adrenaline. *Lancet*, 29;1(6448):402-5.
- Boks, A. L., Brommer, E. J., Schalm, S. W., & Van Vliet, H. H. (1986). Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology*, 6(1), 79-86.
- Chapman, N. A., Dupré, D. J., Rainey, J. K. (2014). The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochemistry And Cell Biology*. 92(6), 431–440.
- Christensen, N. J., Galbo, H., Hansen, J. F., Hesse, B., Richter, E. A., Trap-Jensen, J. (1979). Catecholamines and exercise. *Diabetes*, 28 (Supplement_1), 58-62.
- Furie, B. (2008) Mechanisms of thrombus formation. *Mechanisms of Disease*. *New England Journal of Medicine*, 359, 938–49.
- Goldstein, D. (2010) Adrenaline and Noradrenaline. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Guimaraes, S., Moura, D. (2001). Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 319–356.

- Ingram, G. I. C. (1961). Increase in antihaemophilic globulin activity following infusion of adrenaline. *The Journal of Physiology*, 156(2), 217.
- Juhan-Vague, I., Morange, P. E., Alessi, M. C. (2002). The insulin resistance syndrome: implications for thrombosis and cardiovascular disease. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 32(5-6), 269-273.
- Kohrt, W. M., Spina, R. J., Ehsani, A. A., Cryer, P. E., Holloszy, J. O. (1993). Effects of age, adiposity, and fitness level on plasma catecholamine responses to standing and exercise. *Journal of Applied Physiology*. 75(4), 1828-1835.
- Latour, J., Leger-Gauthier, C., Solymoss, B., (1985). Vasoactive agents and production of thrombosis during intravascular coagulation. 2-Alpha-adrenergic stimulation: effects and mechanisms. *Pathology*, 17(3), pp. 429-436.
- Ostrowski, S. R., Meyer, M. A. S., Plovsing, R. R., Møller, K., Johansson, P. I. (2013). Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis. *Journal of Critical Care*, 28(5), 586–596.
- Patthy, L. (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*, 41(3), 657-663.
- Sorriento, D., Trimarco, B., Iaccarino, G. (2011). Adrenergic mechanism in the control of endothelial function. *Translational Medicine*, 1(1), 213–228.
- Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R., Fleig, A. (2004). Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6009–6014.

- van Mourik, J. A., de Wit, T. R., Voorberg, J. (2002) Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochemistry. Cell Biology.* 117, 113–122.
- Wirtz, P. H., Ehlert, U., Emini, L., Rüdüsüli, K., Groessbauer, S., Mausbach, B. T., von Känel, R. (2006). The role of stress hormones in the relationship between resting blood pressure and coagulation activity. *Journal of Hypertension*, 24(12), 2409-2416.
- Xiao, H., Li, H., Wang, J. J., Zhang, J. S., Shen, J., An, X. B., Zhang, C. C., Wu, J. M., Song, Y., Wang, X. Y., Yu, H. Y., Deng, X. N., Li, Z. J., Xu, M., Lu, Z. Z., Du, J., Gao, W., Zhang, A. H., Feng, Y., Zhang, Y. Y. (2018). IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -Adrenergic insult. *European Heart Journal*, 39(1), 60–69.
- Zouhal, H., Jacob, C., Delamarche, P., Gratas-Delamarche, A. (2008). Catecholamines and the effects of exercise, training, and gender. *Sports medicine*, 38(5), 401-423.