



# Universidad de Oviedo

Grado en Medicina  
Trabajo de Fin de Grado

*“Modulación de la función plaquetaria mediante productos derivados de plaquetas”*

Autor: Pelayo Miranda Sanz

Tutoras: Laura Gutiérrez Gutiérrez, Andrea Acebes Huerta

# ÍNDICE

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	4
3. Material y métodos .....	5
a. Selección de muestras para el estudio .....	5
b. Reactivos .....	5
c. Obtención de bioproductos derivados de plaquetas: Señuelos plaquetarios .....	5
d. Ensayos de agregación plaquetaria .....	6
e. Procesamiento de datos .....	7
4. Resultados y discusión .....	7
a. Estandarización de la dosis de Tirofiban .....	7
b. Estrategias basadas en bioproductos derivados de plaquetas para revertir el efecto del Tirofiban .....	11
5. Conclusiones .....	16
6. Bibliografía .....	19

## Resumen

Las plaquetas juegan un papel principal en la hemostasia primaria mediante numerosos receptores en su superficie, entre los que podemos destacar GPIb-IX-V, GPVI,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, todos ellos involucrados en la activación, adhesión y agregación plaquetaria. El Tirofiban es uno de los fármacos que tiene como diana el último de estos receptores para el tratamiento de trastornos de agregación plaquetaria. Sin embargo, debido a los riesgos de hemorragia asociados a su uso, sería idóneo encontrar un producto capaz de revertir rápidamente los efectos del Tirofiban. Por ello, se ha planteado un estudio para evaluar la capacidad de los señuelos plaquetarios, derivados de plaquetas, para modular la trombosis en un entorno de laboratorio, mediante ensayos de agregación plaquetaria. Se presentan los resultados obtenidos hasta el momento, incluyendo la estandarización de la dosis de Tirofiban, las distintas estrategias para producir la reversión de los efectos del Tirofiban y la duración de la acción antiagregante del Tirofiban. Se concluye que el Tirofiban inhibe específicamente la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y se destaca la necesidad de encontrar un producto que pueda revertir rápidamente sus efectos, debido a que no ha sido posible encontrarlo. Además, se mencionan las limitaciones del estudio y la importancia de futuras investigaciones.

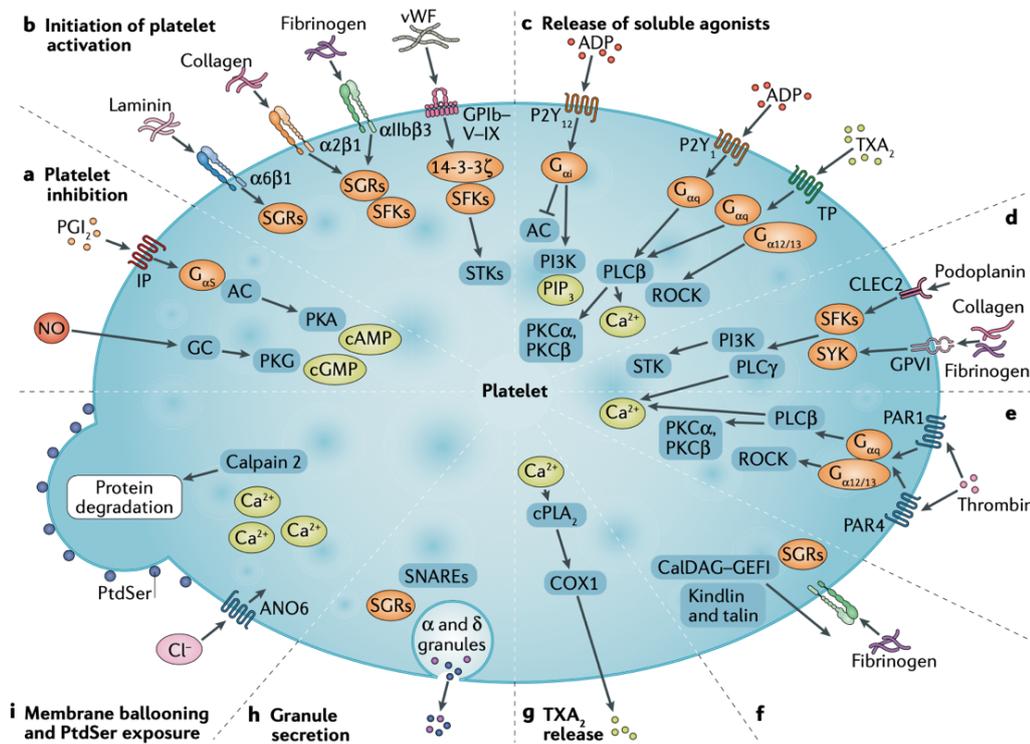
## **Abstract**

Platelets play a major role in primary hemostasis through numerous receptors located in their surfaces, amongst we can highlight GPIb-IX-V, GPVI,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, all of them involved in platelet activation, adhesion and aggregation. Tirofiban is one of many drugs which target the last one of the aforementioned receptors for the treatment of platelet aggregation disorders. However, due to the bleeding risks associated with its use, it would be desirable to find a product capable of rapidly reversing the effects of Tirofiban. Therefore, a study has been designed to evaluate the ability of platelet decoys, derived from platelets, to modulate thrombosis in a laboratory setting, using platelet aggregation assays. The results obtained so far are presented, including the standardization of the dose of Tirofiban, the different strategies to produce reversal of the effects of Tirofiban, and the duration of the antiaggregatory action of Tirofiban. It is concluded that Tirofiban specifically inhibits  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin and the need to find a product that can rapidly reverse its effects is highlighted, since it has not been possible to find one yet. In addition, the limitations of the study and the importance of future research are mentioned.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son componentes sanguíneos carentes de núcleo con diversidad de funciones, que principalmente juegan un papel central en la hemostasia primaria, mediante la adhesión, agregación y formación del tapón plaquetario. Otras funciones que desempeñan las plaquetas están relacionadas con la inmunidad y la respuesta inflamatoria, así como la angiogénesis, entre otras (Rubenstein *et al.*, 2018).

En la membrana plaquetaria vamos a encontrar numerosos receptores (Figura 1) que van a ser los responsables de todos y cada uno de los procesos que van a dar lugar a la formación, en última instancia, del tapón plaquetario. Entre estos receptores podemos encontrar una serie de glicoproteínas (GP), entre las que destacaremos el complejo GPIb-IX-V, GPVI y la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ ; consideradas las glicoproteínas más importantes por ser mediadoras de la adhesión, activación y agregación plaquetaria, respectivamente (Gremmel *et al.*, 2016).



*Figura 1. Receptores presentes en la membrana plaquetaria que participan en la activación de la plaqueta, con sus agonistas y las cascadas de señalización intracelular. Imagen tomada de: van der Meijden, et al. 2019*

El complejo GPIb-IX-V, el segundo receptor más común en la membrana plaquetaria (Clemetson *et al.*, 2019), tiene como ligando principal el Factor de von Willebrand (FvW). El colágeno es reconocido por la glicoproteína GPVI y la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , principalmente. En la hemostasia, la unión de cualquiera de estos ligandos a sus receptores, va a tener como resultado una serie de señalizaciones (aún en estudio, pero mediadas en parte por quinasas de la familia Src; la cascada de señalización PLC $\gamma$ 2, PI3K-Akt y PKG; vía de las proteína-cinasas activadas por mitógenos; y LIM dominio quinasa 1) (Li, 2019) que van a convertir a la integrina  $\alpha IIb\beta 3$  en un receptor de alta afinidad, fundamental para la adhesión plaquetaria y la posterior formación del trombo a través de la formación de puentes de fibrinógeno interplaquetarios.

En paralelo, GPVI, cuyo ligando principal es el colágeno tipo I y tipo III (aunque también la fibrina). Con la unión del colágeno a GPVI se produce la dimerización del receptor, que resulta en la fosforilación de una serie de tirosín-quininas, cuya activación va a reclutar aún más quinasas y proteínas, con la última activación de fosfolipasa C gamma 2 (PLC $\gamma$ 2) y el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Haining *et al.*, 2019) e iniciando la activación plaquetaria mediante la liberación de los gránulos  $\alpha$  y  $\delta$ , así como de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (van der Meijden *et al.*, 2019).

Finalmente, la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , el receptor más expresado en la membrana plaquetaria (Huang *et al.*, 2019), tiene múltiples ligandos, entre los que podemos encontrar: fibrinógeno, fibronectina, trombospondina-1 y FvW, todos ellos mediante el reconocimiento de una cadena péptidica (Arginina-Glicina-Aspartato, RGD), presente en

las estructuras de estos ligandos, por el dominio extracelular de la integrina (Bledzka *et al.*, 2019). En condiciones de reposo, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  se encuentra en un estado de baja afinidad y no puede unirse al fibrinógeno soluble. Sin embargo, la activación plaquetaria inducida por agonistas fisiológicos (tromboxano A2 y ADP, productos de la activación plaquetaria) desencadena una señalización que resulta en un aumento de expresión y un cambio de conformación de la  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  en la membrana plaquetaria. Los receptores activados de  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , que se agrupan en la superficie de las plaquetas, adquieren la capacidad de unirse al fibrinógeno y al FvW, lo que permite la formación de puentes entre las plaquetas. La unión del fibrinógeno y el FvW a la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  también activa una vía de señalización *outside-in* que desencadena una cascada de señalización que va a concluir con la agregación irreversible de las plaquetas y el aumento del tamaño del tapón plaquetario (Huang *et al.*, 2019).

Existen numerosos agentes terapéuticos que van a tener esta integrina como diana para ejercer un efecto antiagregante, actualmente tres aprobados por la mayoría de países y en uso en las guías clínicas: Abciximab (un anticuerpo monoclonal), Eptifibatide y Tirofiban. El Tirofiban (comercializado bajo el nombre Aggrastat™) es un derivado sintético no peptídico de tirosina, con menor grado de afinidad por  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  que otros inhibidores de la misma clase (Huang *et al.*, 2019), aunque con alta selectividad, y que se une de forma reversible a ella, que actúa como un mimético de RGD, evitando la unión del fibrinógeno a las plaquetas y la posterior agregación plaquetaria en el sitio de lesión (Yang *et al.*, 2019).

Debido a que el Tirofiban se ha relacionado con un aumento de riesgo de hemorragias leves, además de una tendencia a incrementar las hemorragias mayores, así como un aumento en la necesidad de transfusiones y la frecuencia de

trombocitopenia en pacientes que han sido intervenidos mediante angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) (Dannenberg, et al. 2018); los inhibidores de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , como el Tirofiban, han quedado relegados a terapias de rescate, de acuerdo con las guías clínicas de la Sociedad Europea de Cardiología (van den Werf, et al. 2009). Es por este motivo, los casos en los que se produzcan complicaciones que atenten contra la vida del paciente, que sería ideal disponer de un producto que sea capaz de revertir la acción del Tirofiban de manera rápida.

## **2. OBJETIVOS**

Desde el Laboratorio de Investigación en plaquetas del ISPA dirigido por la Dra. Laura Gutiérrez, hemos caracterizado preliminarmente un nuevo bioproducto derivado de plaquetas, que consiste en los dominios extracelulares de los receptores de la superficie de las plaquetas (denominados decoys o señuelos). Este nuevo bioproducto derivado de plaquetas tendría la capacidad de unirse a sustratos/ligandos de receptores plaquetarios naturales o secuestrar otras moléculas (solubles) con afinidad para esos receptores (i. e. Tirofiban). Por esta razón podría aplicarse en el tratamiento de desórdenes autoinmunes como trombocitopenia inmune, para modular la trombosis, o para prevenir la evasión inmune mediada por plaquetas (inhibiendo el potencial metastásico de las células tumorales), o incluso, como antídoto contra los venenos de serpientes (hemorrágicos o coagulantes). En este sentido, planteamos el siguiente estudio, donde pretendemos evaluar la capacidad de estos señuelos plaquetarios de modular la trombosis en un escenario *in vitro*, simulando pacientes que precisan de un tratamiento con Tirofiban de forma aguda, y así tratar de evitar que se produzcan los eventos comentados con anterioridad.

Concretamente planteamos los siguientes objetivos:

1. Comprobar la especificidad de acción del Tirofiban sobre la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , de manera que no afecte de forma secundaria a otros receptores partícipes en la agregación.
2. Encontrar un señuelo de plaquetas que sea capaz de revertir o incluso prevenir la acción antiagregante del Tirofiban, mediante el secuestro de la molécula o por competición con el receptor sobre el que actúa.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

**Selección de muestras para estudio.** Se han obtenido muestras de sangre provenientes de pacientes del área sanitaria IV del SESPA, preseleccionadas previamente por el Laboratorio de Hematología del HUCA, de tal manera que no presenten alteraciones significativas en el hemograma ni en la coagulación. Se tratan de muestras ya analizadas en el laboratorio y que de otra manera serían desechadas.

**Reactivos.** TIROFIBAN (Aggrastat™) (0.05 mg/mL) y agonistas de los receptores plaquetarios: ristocetina (0.5 mg/mL); colágeno (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); PMA (100 ng/mL).

**Obtención de bioproductos derivados de plaquetas: Señuelos plaquetarios.** Partiendo de plaquetas procedentes de donantes, tras digestión con proteasas de diferente naturaleza se purificó una mezcla que contiene los fragmentos extracelulares de los receptores de plaquetas (en adelante señuelos plaquetarios) (Figura 2)

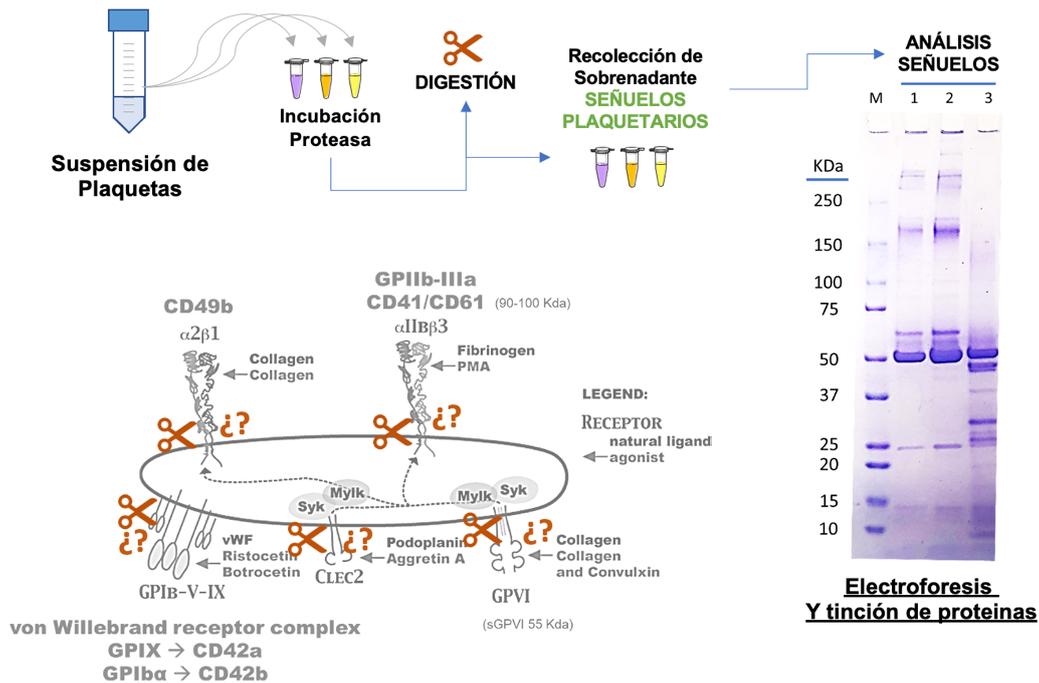


Figura 2. Modo general de obtención de los señuelos plaquetarios utilizados en el estudio. Imagen cedida por el laboratorio de investigación en plaquetas del ISPA.

**Ensayos de agregación plaquetaria.** Se ha realizado el análisis de la agregación plaquetaria con una metodología de recuento plaquetario en las muestras seleccionadas bajo distintas condiciones, empleando para ello un analizador de función plaquetaria: Aggrestar PL-12 (SINNOWA), que realiza ocho recuentos seriados de plaquetas antes y después de añadir agonistas plaquetarios y que, posteriormente, calcula la tasa de agregación comparando el número de plaquetas antes y después de cada recuento. De tal manera, que la reducción del conteo de plaquetas libres se asocia a unos niveles de agregación determinados, ya que las plaquetas libres empiezan a formar agregados, y su conteo disminuye.

En primer lugar, se han realizado los ensayos de agregación de plaquetas en sangre total en condiciones basales, así como en presencia de agonistas de los receptores plaquetarios para inducir agregación plaquetaria, concretamente empleamos PMA, ristocetina y colágeno, para evaluar la respuesta agregante normal al añadir los distintos

agonistas. Así, se han tomado 300µL de sangre, se ha incubado a 37°C durante 10 minutos a 300 revoluciones por minuto, y se han realizado los ensayos en el Aggrestar, añadiendo el agonista correspondiente (PMA, ristocetina, colágeno; todas ellas en las concentraciones especificadas con anterioridad) cuando el agregómetro lo solicitase, a partir del segundo recuento de cada serie.

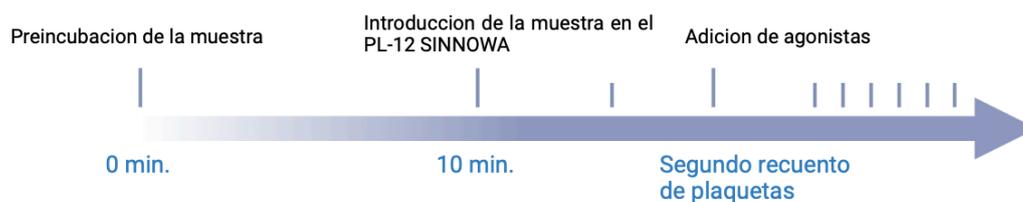


Figura 3. Esquema general de trabajo con el Aggrestar PL-12. Creado con biorender.com

**Procesamiento de datos.** Los datos obtenidos en cada uno de los ensayos de agregación plaquetaria han sido trasladados a una plantilla para calcular cuál es la tasa de agregación máxima (MAR, *Maximum Aggregation Rate*) en cada uno de los ensayos realizados, para posteriormente elaborar una gráfica en la que se representan los valores obtenidos. En aquellas situaciones en las que hayamos realizado más de dos estudios o ensayos en las mismas condiciones se ha añadido además la desviación estándar del valor obtenido.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar las distintas series de ensayos de agregación plaquetaria mencionados en el apartado anterior se han procesado un total de 23 muestras. Así, se han obtenido los siguientes resultados:

## Estandarización de la dosis-respuesta a Tirofiban en condiciones ex vivo.

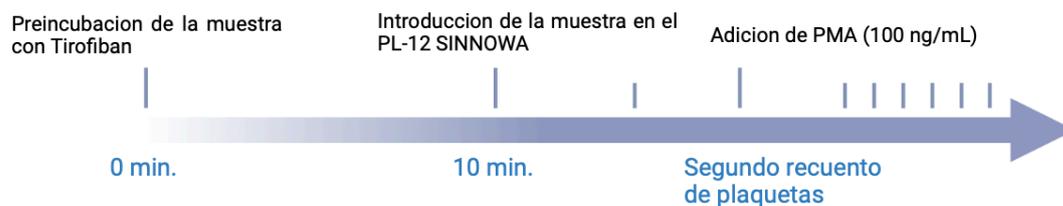
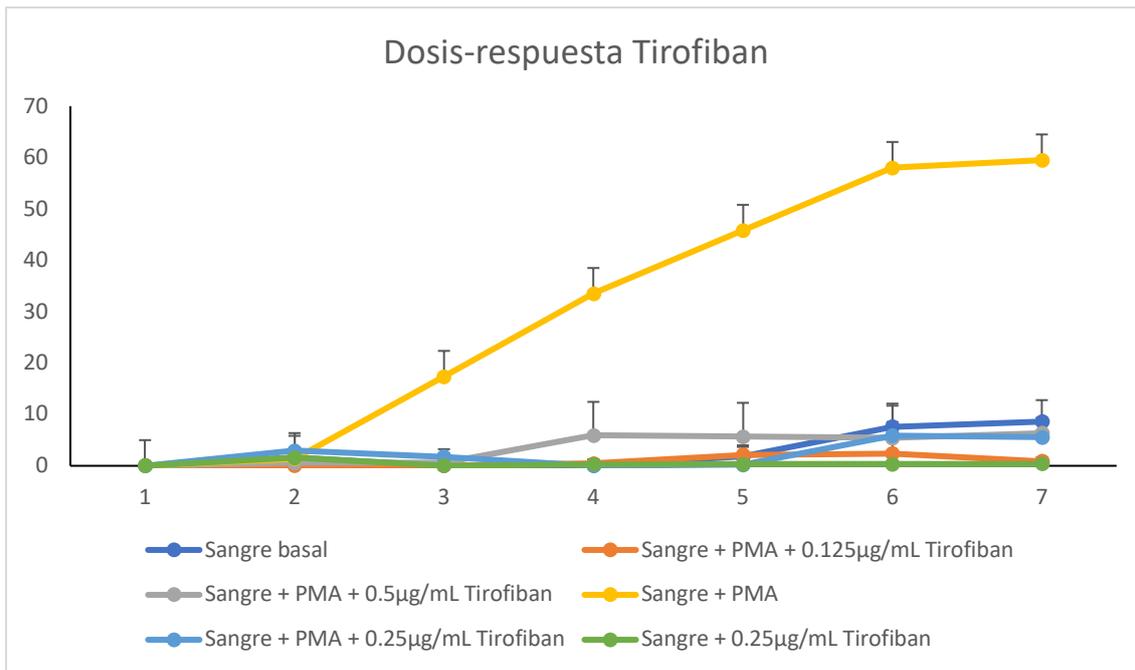


Figura 4. Esquema de trabajo con el Aggrestar PL-12 para la estandarización de la dosis respuesta a Tirofiban. Creado con biorender.com

Además de los ensayos de agregación de plaquetas basales sistemáticos, y únicamente en presencia de PMA, se han realizado ensayos en presencia de Tirofiban (concentración inicial: 0.05 mg/mL) a diferentes dosis para optimizar las condiciones experimentales es decir, escoger la mínima dosis para la que existe una respuesta antiagregante completa. De la misma manera que en el caso anterior, se han tomado 300 $\mu$ L de sangre e incubado con distintas dosis de Tirofiban

Partiendo de Tirofiban en concentración 0.05 mg/mL, se han tomado diferentes dosis (a 0.5, 0.25 y 0.125  $\mu$ g/mL), basándonos en los estudios realizados por De Cuyper et al., 2013, en condiciones *in vitro* con sangre humana y de ratones. Posteriormente, hemos realizado el ensayo de agregación plaquetaria de las muestras, para posteriormente calcular su MAR en cada uno de los ensayos, en presencia siempre de PMA, y se han representado los resultados en un gráfico (Figura 5). Podemos observar que incluso con la mínima dosis utilizada (0.125  $\mu$ g/mL) el Tirofiban es capaz de inhibir la agregación plaquetaria mediada por PMA de manera completa, similar a las dosis superiores, por lo que se ha tomado 0.125  $\mu$ L como la dosis óptima de Tirofiban para realizar los ensayos de agregación plaquetaria en experimentos posteriores.



*Figura 5. Representación del promedio de MAR obtenido en cada una de las series en función de distintas dosis de Tirofiban (0.125, 0.25 y 0.5 µg/mL). Representada también la desviación estándar de cada uno de los valores.*

Una vez seleccionada la dosis mínima de Tirofiban capaz de inhibir la activación plaquetaria (0.125 µL), en primer lugar, como se ha mencionado en el apartado de Material y métodos, se han realizado ensayos de agregación plaquetaria en presencia de los distintos agonistas (colágeno, ristocetina y PMA), y de la misma forma que anteriormente, se ha calculado el MAR de cada uno de los ensayos y se han representado en una gráfica (Figura 6). Observamos que se ha replicado la respuesta inhibitoria de la agregación obtenida anteriormente en presencia de PMA y de colágeno; sin embargo, al añadir ristocetina a la muestra, se produce la agregación independientemente de haber añadido o no Tirofiban en la muestra.

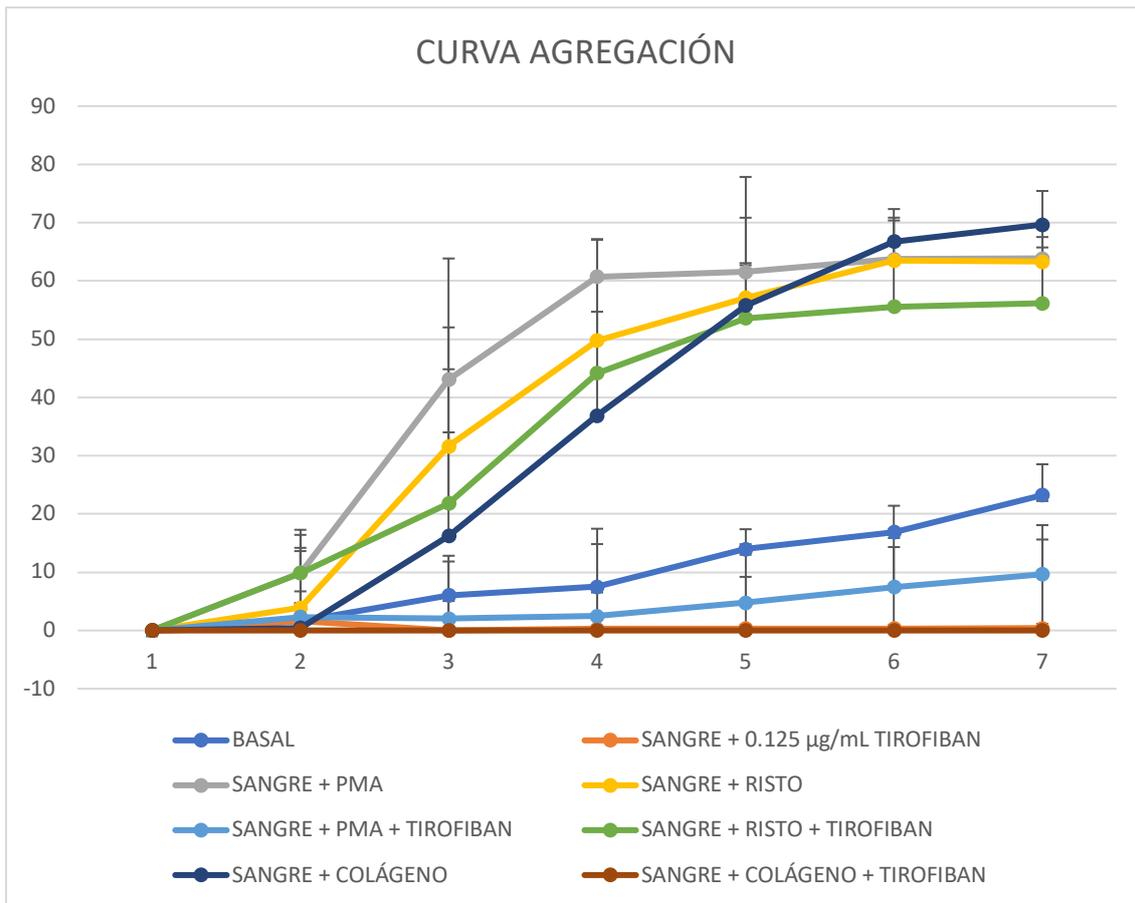


Figura 6. Representación del promedio de MAR obtenido en cada una de las series de ensayos de agregación, en función del agonista añadido en cada una de ellas. Representada también la desviación estándar en cada uno de los valores.

Atendiendo a los valores representados en la Figura 6 podemos observar que el Tirofiban es capaz de inhibir la agregación plaquetaria en presencia tanto de PMA como de colágeno, mientras que en presencia de ristocetina se produce agregación independientemente de la acción del Tirofiban.

Esto se debe a que el PMA es un agonista de la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , de tal manera que, cuando se ha añadido en las muestras procesadas, desencadena la agregación plaquetaria. Sin embargo, cuando se ha añadido en presencia de Tirofiban, este último bloquea el sitio de unión del fibrinógeno a la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ , evitando que se produzcan los puentes de fibrinógeno esenciales para la adhesión entre plaquetas. Por otro lado, el colágeno, ligando de GPVI y de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , desencadena la activación

plaquetaria por otra vía distinta que el PMA; no obstante, en última instancia va a producir el cambio de conformación de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , necesario para la adhesión entre plaquetas, por lo que, en presencia de Tirofiban, no va a ser capaz de producir este cambio de conformación, ya que el Tirofiban está bloqueando también la señalización *inside-out* (Figura 7). Por último, la ristocetina es un antibiótico capaz de provocar la polimerización del FvW, provocando la aglutinación de las plaquetas a través del receptor del FvW, la glicoproteína GPIb-V-IX; por tanto, debido a que no sigue la adhesión plaquetaria mediada por la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , el Tirofiban no es capaz de inhibir la agregación plaquetaria en presencia de ristocetina.

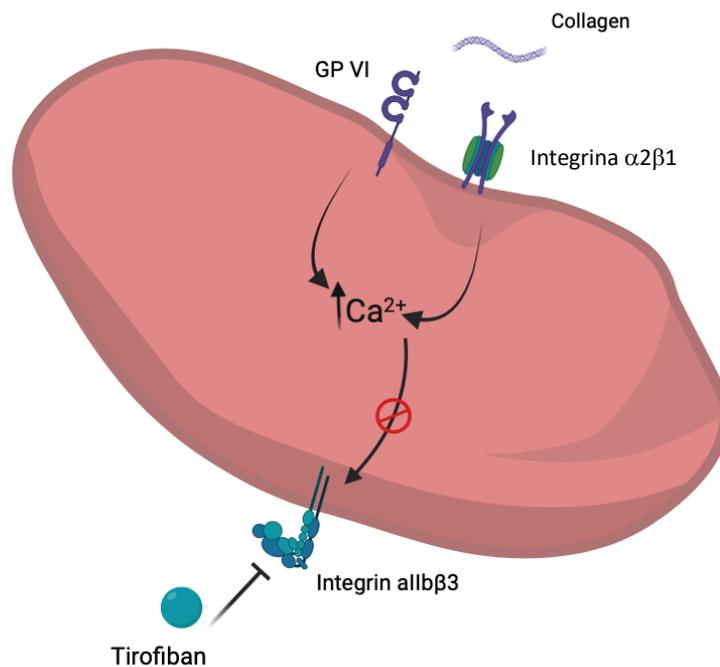
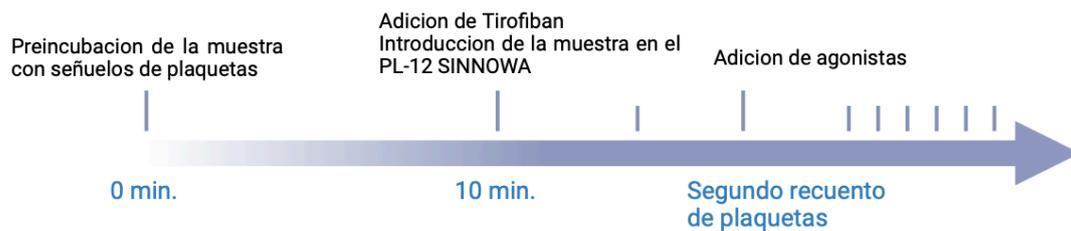


Figura 7. Acción del colágeno en presencia de Tirofiban. Creado con biorender.com

**Estrategias basadas en bioproductos derivados de plaquetas para revertir el efecto de Tirofiban.**



*Figura 8. Esquema de trabajo con el Aggrestar PL-12 para estrategias basadas en bioproductos derivados de plaquetas para revertir el efecto del Tirofiban. Creado con biorender.com*

Siguiendo la sistemática ya mencionada, se han incubado las muestras de sangre con los diferentes señuelos de plaquetas preparados acorde a lo descrito en métodos, en esta ocasión sin Tirofiban, que se ha añadido en el momento previo al recuento (consideramos que la duración de los dos primeros recuentos es suficiente tiempo para que el Tirofiban ejerza su efecto antiagregante), y posteriormente, a partir del segundo recuento, se ha añadido el agonista correspondiente.

Se ha obtenido el MAR de cada uno de los señuelos (Señuelo 1, 2 y 3) y se han representado en una gráfica, cada uno por separado (Figuras 9, 10 y 11, respectivamente). Podemos observar que, independiente del señuelo de plaquetas utilizado, ninguno es capaz de revertir la función antiagregante del Tirofiban; de hecho, obtuvimos valores similares de MAR en situación basal que en presencia de Tirofiban, PMA y los distintos señuelos.

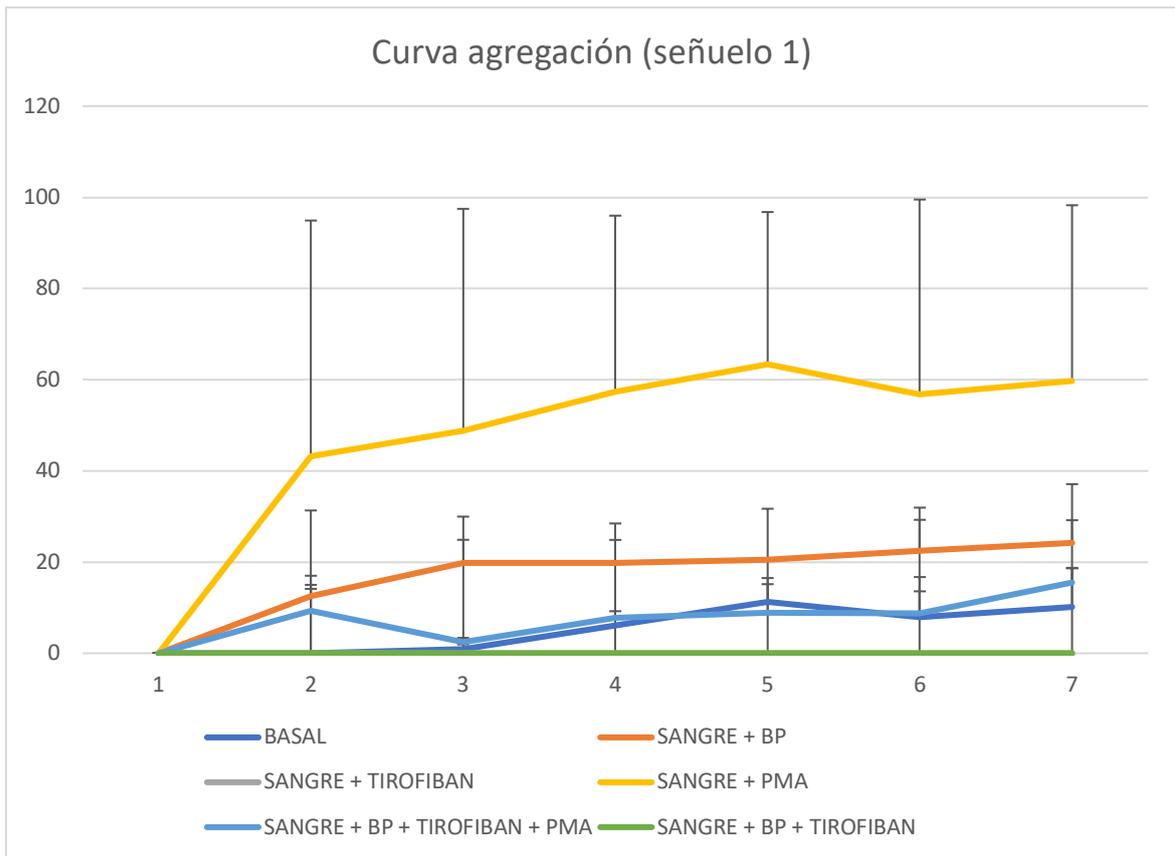


Figura 9. Representación del valor promedio de MAR en presencia del señuelo 1. Representada también la desviación estándar de cada uno de los valores obtenidos.

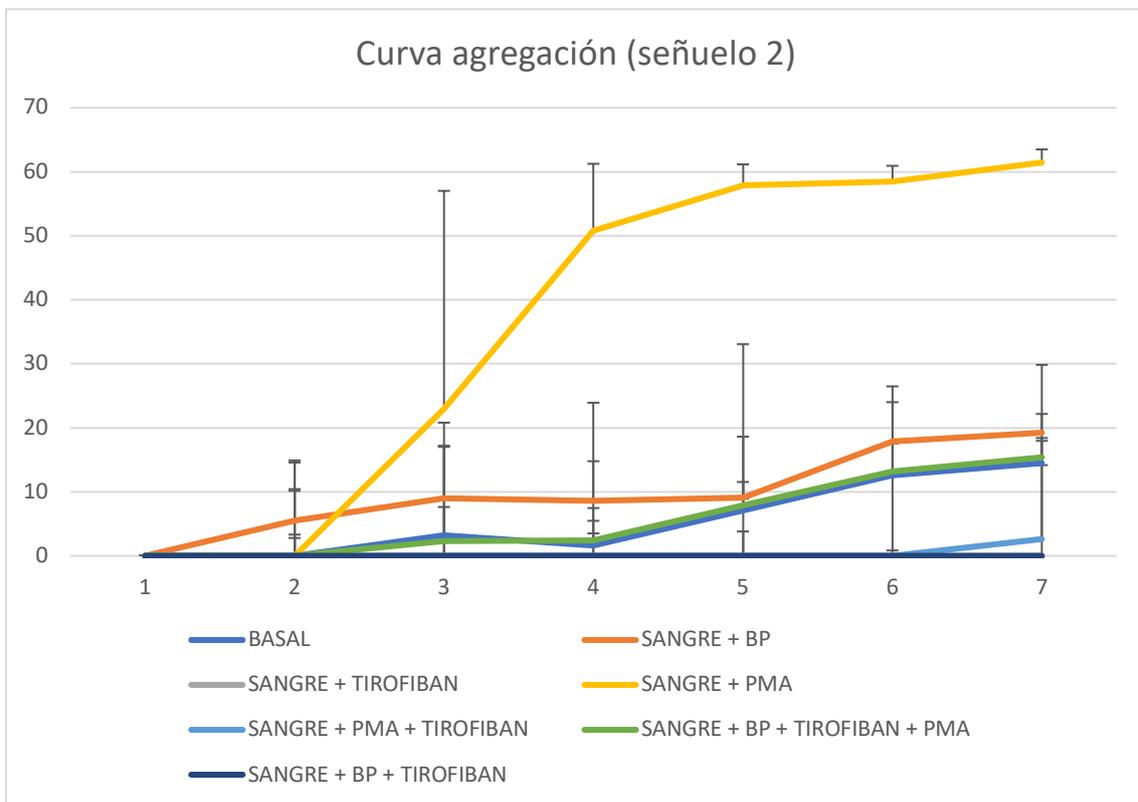


Figura 10. Representación del valor promedio de MAR en presencia del señuelo 2. Representada también la desviación estándar de cada uno de los valores obtenidos.

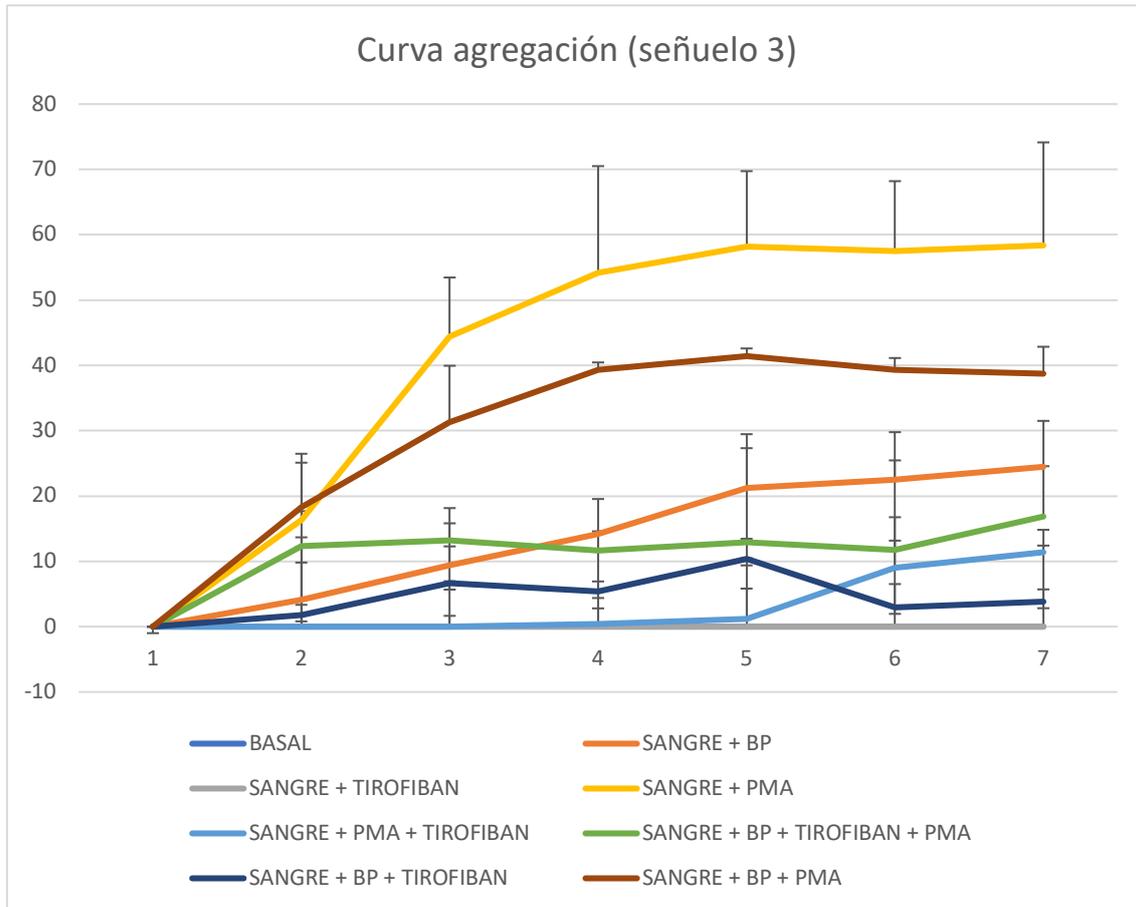


Figura 11. Representación del valor promedio de MAR en presencia del señuelo 3. Representada también la desviación estándar de cada uno de los valores obtenidos.

En primer lugar, atendiendo a los datos representados en la Figura 9, podemos concluir que este señuelo de plaquetas no es capaz de prevenir de forma efectiva la acción antiagregante del Tirofiban; no obstante, se ha observado que las muestras preincubadas con el bioproducto, al añadirles PMA únicamente, no se produce la agregación con la misma fuerza que lo haría en condiciones basales. Es decir, que observamos en contra de lo que habíamos especulado, un efecto “antiagregante” del bioproducto. Este efecto podría deberse a que los productos derivados de plaquetas bloqueen los sitios de unión del PMA de manera parcial a nivel plaquetario, y, aunque

se produzca de igual forma la activación plaquetaria, esta respuesta no va a tener la misma magnitud que en condiciones basales, ya que no todas las plaquetas son susceptibles de ser activadas. Otra posibilidad podría ser que los señuelos de plaquetas, debido a que son principalmente la parte extracelular de los receptores plaquetarios, sean capaces de secuestrar la molécula de PMA, y que esta no pueda ejercer su efecto agonista.

De la misma manera, al utilizar el señuelo 2, tampoco se ha conseguido prevenir la acción del Tirofiban, y al igual que en el caso anterior, tampoco se obtuvo respuesta agregante al añadir PMA, de hecho, en este caso la agregación en presencia de PMA obtuvo valores similares a los obtenidos en la muestra control, es decir, en las muestras de sangre sin agonistas, señuelos de plaquetas ni Tirofiban (Figura 10).

Por último, las muestras que se preincubaron con el señuelo 3, de igual manera que en las condiciones anteriores, tampoco han logrado prevenir el efecto antiagregante del Tirofiban, obteniendo a su vez la misma respuesta al estímulo por PMA (Figura 11).

En resumen, observamos que los señuelos ejercían una función inhibitoria de la agregación plaquetaria por sí mismos. En particular, el señuelo 2 presenta una acción inhibitoria más marcada que el señuelo 1 y 3. Estos resultados que no anticipábamos, son interesantes, porque podrían estudiarse desde otro punto de vista: el de nuevos antiagregantes, que ejerzan una inhibición más leve o modulada.

Finalmente, se ha decidido comprobar la vida media del Tirofiban mediante preincubación de las muestras de sangre a las que se le añadió el fármaco (0.125 µg/mL) durante 3 horas previas al comienzo del recuento plaquetario en las distintas condiciones: añadiendo el señuelo de plaquetas (en este caso utilizamos el señuelo 2) y

PMA como agonista, para observar si los efectos antiagregantes del Tirofiban podían perdurar en el tiempo, obteniendo los resultados representados en la Figura 12:

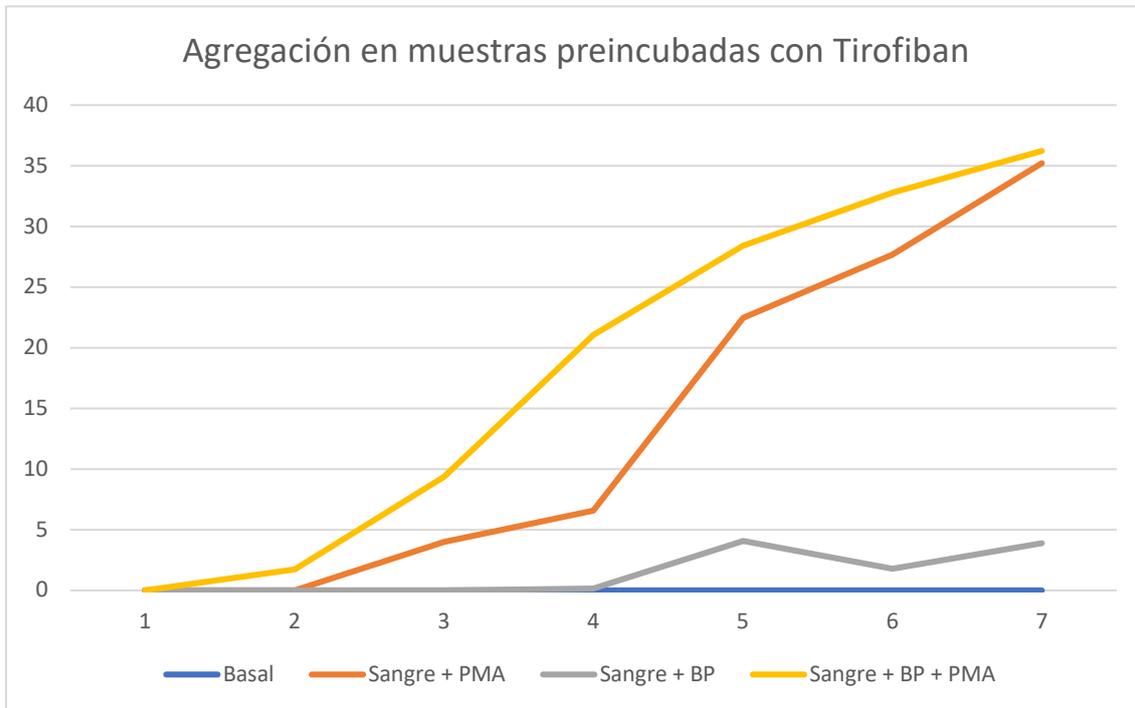


Figura 12. Representación del valor promedio de MAR en muestras preincubadas con Tirofiban más de 3 horas.

Como podemos observar, en situación basal (sangre con Tirofiban) la agregación es prácticamente nula; no obstante, cuando se añade el señuelo 2 esta agregación es mínima, aunque mayor que en condiciones basales. Resulta interesante lo que ocurre cuando añadimos PMA como agonista de la agregación: la agregación se dispara hasta alcanzar valores del 30%, cuando con la adición inmediata de Tirofiban previa a la inducción de agregación, la inhibición de la misma era completa. Esto podría deberse a dos motivos: el Tirofiban, pasadas las 4 horas de preincubación, podría haber perdido su efecto inhibitorio sobre la agregación, ya que, su vida media teórica ronda las 2 horas (Yang, et al. 2019); o bien que éste no sea capaz de competir con el PMA por su receptor sobre la integrina de la misma forma que lo hacía en los experimentos anteriores. En

este caso, la muestra preincubada más de 3 horas con Tirofiban y a la que se le añadió el señuelo después, presenta mayor agregación, en este caso se ve cierto rescate. De cualquier forma, es un experimento único y debería repetirse para confirmarse.

## 5. CONCLUSIONES

A lo largo del estudio se ha podido comprobar la acción antiagregante del Tirofiban sobre la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : cómo es capaz de inhibir su señalización *inside-out*, impidiendo que se formen puentes de fibrinógeno entre las plaquetas, y así bloquear su adhesión, todo ello demostrado en los experimentos con colágeno (representados en la figura 6); así como su señalización *outside-in*, mediante su unión a sitios cruciales para la unión de agonistas plaquetarios, como el PMA (que recordemos que actúa directamente sobre esta integrina). Por otro lado, se ha podido también comprobar que el Tirofiban no influye en los fenómenos de aglutinación, como es el efecto de la ristocetina, agonista del receptor del FvW. Podemos así concluir que el Tirofiban ejerce una acción inhibitoria específica sobre la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , de modo que a la hora de buscar un bioproducto derivado de plaquetas sería interesante que esta integrina fuese su única diana. Además, el efecto antiagregante del Tirofiban es relativamente fuerte, puesto que se han utilizado dosis menores a las recomendadas en los distintos ensayos clínicos.

No obstante, todos estos resultados obtenidos están sujetos a varias limitaciones que han existido a lo largo del todo proceso experimental: en muchas ocasiones las muestras de sangre solicitadas contenían volumen insuficiente como para completar las distintas series de experimentos, un ejemplo de ello sería a la hora de testar los diferentes señuelos: únicamente fuimos capaces de completar la serie con el último de ellos, por ello los otros estarían “incompletos” de algún modo. Además, ciertas muestras de sangre alcanzaban un MAR cercano al 50% en condiciones basales, por lo que muchas

de éstas se acabaron desestimando, e incluso fue necesario aumentar el límite por el que considerábamos como válidos.

Por otro lado, respecto a los resultados con los distintos señuelos de plaquetas, podríamos concluir que, pese a que no se ha obtenido ningún resultado claro, ya sea por interferencias con otros receptores o por un recuento de plaquetas artefactado por los fragmentos de las mismas, sería interesante, en un futuro, realizar más ensayos que estudien su efecto; ya que, aunque el Tirofiban tenga una vida media relativamente corta, convendría encontrar un producto, derivado o no de plaquetas, que sea capaz de revertir su acción antiagregante de manera rápida, para así evitar la complicación que acompaña a la medicación antiagregante con mayor frecuencia: riesgo de hemorragias, especialmente en situaciones de combinación con un fármaco anticoagulante (la situación de la gran mayoría de pacientes a tratamiento con este tipo de fármacos).

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Bledzka K, Qin J, Plow EF. Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . En: Michelson AD, editor. Platelets. Elsevier; 2019. p. 227–41.

Brass LF, Tomaiuolo M, Stalker TJ. Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response. Hematol Oncol Clin North Am [Internet]. 2013 [citado el 19 de junio de 2023];27(3):381–409. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2013.02.002>

Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet Receptors. En: Michelson AD, editor. Platelets. Elsevier; 2019. p. 169–92.

Dannenberg L, Wolff G, Naguib D, Pöhl M, Zako S, Helten C, et al. Safety and efficacy of tirofiban in STEMI-patients. Int J Cardiol [Internet]. 2019 [citado el 30 de junio de 2023];274:35–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.09.052>

Gremmel T, Frelinger AL III, Michelson AD. Platelet Physiology. Semin Thromb Hemost. 2016 Apr;42(3):191-204

Haining EJ, Nicolson PLR, Onselaer M-B, et al. GPVI and CLEC-2. En: Michelson AD, editor. Platelets. Elsevier; 2019. p. 213-226

Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, et al. Platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. J Hematol Oncol [Internet]. 2019 [citado el 20 de junio de 2023];12(26). Disponible en:

<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-019-0709-6>

Li R. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. En: Michelson AD, editor. Platelets. Elsevier; 2019. p. 193–211.

Van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. Nature [Internet]. 2019 [citado el 15 de junio de 2023];16:168–79. Disponible en: [www.nature.com/articles/s41569-018-0110-0](http://www.nature.com/articles/s41569-018-0110-0)

Yang M, Huo X, Miao Z, Wang Y. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor tirofiban in acute ischemic stroke. Drugs [Internet]. 2019 [citado el 21 de junio de 2023];79(5):515–29. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-019-01078-0>

Yeung J, Li W, Holinstat M. Platelet signaling and disease: Targeted therapy for thrombosis and other related diseases. Pharmacol Rev [Internet]. 2018 [citado el 21 de junio de 2023];70(3):526–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1124/pr.117.014530>