

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis

Jessyca Paola Rodríguez Castiblanco

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis

Jessyca Paola Rodríguez Castiblanco

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencia - Farmacología

Director:

Prof. Mario Francisco Guerrero Pabón

Línea de investigación:

Farmacología experimental cardiovascular

Grupo de investigación:

Grupo de Investigación en Farmacología Molecular (FARMOL)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

25 de abril de 2022

A Dios, mi familia, amigos, compañeros y a todas las personas que aportaron y contribuyeron a la finalización de este maravilloso logro; mil gracias a todos.

Agradecimientos

A Dios, quien me ha permitido empezar y concluir este sueño.

A mi familia, mis padres y hermanos, quienes siempre han estado cuando los he necesitado brindándome su apoyo incondicional.

A mi amada Universidad Nacional, por la oportunidad de formarme como profesional y ahora permitirme ser magíster.

Al profesor Mario Francisco Guerrero, quien confió en mí, por su paciencia, sus conocimientos y su apoyo.

A mis compañeras, Adriana y Angélica, por su apoyo, conocimiento en el laboratorio y contribución en la realización de los ensayos, ¡muchas gracias!

A mis colegas y compañeros de trabajo, quienes donaron su sangre para los ensayos.

Al grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) del Departamento de Química, por facilitarme los compuestos derivados de AC para hacer los ensayos.

A los docentes del Departamento de Farmacia, quienes contribuyeron con su conocimiento y paciencia a mi formación.

Resumen

Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de mortalidad en el mundo, por ello son de gran interés en salud pública. El desarrollo de nuevas terapias antiplaquetarias presentes en el reino vegetal dirigidas a receptores y vías de señalización claves en el mantenimiento de la eficacia antiplaquetaria preservando la hemostasia, es un enorme reto para la investigación. El *objetivo* de este trabajo fue evaluar la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis. *Metodología.* Para la evaluación del efecto antiagregante se empleó la técnica de agregometría de transmisión de luz (LTA), con 21 ml de sangre total de voluntarios sanos, siguiendo dos fases: La fase 1, para efectuar un tamizado de la actividad antiagregante de todos los compuestos y la fase 2, para efectuar curvas concentración – respuesta de 3 de los compuestos de mayor actividad detectados en la fase 1. *Resultados.* En la fase I todos los compuestos, ensayados a la concentración inicial de tamizado de 200 µg/ml, mostraron efectos antiagregantes marcados frente a los inductores de la agregación plaquetaria ácido araquidónico (AA, 500 µg/ml) y epinefrina (300 µM), con porcentajes de agregación inferior al 34%, mientras se observó una respuesta antiagregante baja en todos los casos frente a ADP (20 uM), con porcentajes de agregación superior a 60% y variable, frente a colágeno (10 ug/ml), con porcentajes entre el 25 y 65%, según el compuesto evaluado. En la fase 2, se probaron los compuestos de mayor actividad de la fase 1: 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, cafeato de butilo y metil cinamato frente a AA, de los cuales, 3-(3 hidroxifenil) acrilato de etilo arrojó un perfil concentración – respuesta, con una concentración efectiva 50 ($1,22 \times 10^{-7} M$) similar a la del compuesto fuente, ácido cafeico. *Conclusión:* Modificaciones estructurales de ácido cafeico llevan a la obtención de compuestos que

mantienen una actividad variable de tipo antiagregante plaquetaria, vinculada con la ruta metabólica del ácido araquidónico, resultando de particular interés el compuesto 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, cuya potencia antiagregante es comparable a la obtenida con el compuesto fuente, ácido cafeico, lo que le genera interés como compuesto semisintético con potenciales efectos antiagregantes plaquetarios.

Palabras clave: ácido araquidónico, ácido cafeico, antiagregante plaquetario, derivados de ácido cafeico.

Abstract

Evaluation of the platelet antiaggregant activity of compounds derived from caffeic acid obtained by semi synthesis

Cardiovascular diseases continue to be the main cause of mortality in the world, which is why they are of great interest in public health. The development of new antiplatelet therapies presents in the plant kingdom targeting additional receptors and signaling pathways, with a focus on maintaining antiplatelet efficacy while preserving hemostasis, is an enormous research challenge. The objective of this work was to evaluate the antiplatelet activity of compounds derived from caffeic acid obtained by semisynthesis. Methodology for the evaluation of the antiplatelet effect, two phases were followed -using the light transmission aggregometric technique (LTA), with 21 ml of whole blood from healthy volunteers- phase I, to screen the antiplatelet activity of all the compounds phase II, to make concentration-response curves of 3 of the most active compounds detected in phase 1. Next, all the compounds in the phase 1, tested at the initial screening concentration of 200 µg/ml, showed marked antiaggregation effects against the platelet aggregation inducers (PA), arachidonic acid (AA, 500 µg/ml) and epinephrine (EPI) (300 µM), with aggregation percentages below 34 %; while a low antiplatelet response was observed in all cases against ADP (20 µM), with aggregation percentage above 60 % and a variable against collagen (COL), between 25 % - 65 %, depending on the compound evaluated. An effect that was confirmed in phase II, with the most active compounds: 3-(3-hydroxyphenyl) ethyl acrylate, butyl caffeate and methyl cinnamate, of which, 3-(3-hydroxyphenyl) ethyl acrylate gave an effective concentration 50 (1,22 x 10⁻⁷M) similar to that of the source compound, caffeic acid. Finally, the structural modifications of caffeic acid lead to the obtaining of compounds that maintain a variable activity of platelet antiaggregant type, linked to the metabolic pathway of arachidonic acid, being of particular interest the compound 3-(3-hydroxyphenyl) ethyl acrylate whose potency antiaggregant is comparable to that obtained with the source

compound, caffeic acid, which generates interest as a semi-synthetic compound with potential platelet antiaggregant effects.

Keywords: arachidonic acid, caffeic acid, platelet antiaggregant, caffeic acid derivatives.

Contenido

	Pág.
Lista de tablas	XII
Lista de figuras	XIII
Lista de gráficas	XIV
Lista de símbolos y abreviaturas	XV
Introducción.....	16
Objetivos	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
1 Marco teórico.....	19
1.1 La plaqueta.....	19
1.2 Funciones de la plaqueta.....	20
1.3 Ultraestructura de la plaqueta	21
1.3.1 Zona periférica.....	22
1.3.2 Membrana plasmática.....	22
1.3.3 Sistema canicular conectado a la superficie	23
1.3.4 Sistema tubular denso	23
1.3.5 Zona sol-gel: citoesqueleto	24
1.3.6 Microtúbulos	25
1.3.7 Orgánulos	25

X Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados
de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis

1.3.8 Gránulos α	26
1.3.9 Gránulos densos.....	27
1.4 Activación plaquetaria.....	27
1.4.1 Adhesión.....	28
1.4.2 Agregación	29
1.4.3 Secreción.....	30
1.5 Agonistas AP	31
1.5.1 Activación plaquetaria por COL	32
1.5.2 Activación plaquetaria por ADP y receptores purinérgicos	33
1.5.3 Activación plaquetaria por trombina	34
1.5.4 Activación plaquetaria por TXA2.....	35
1.5.5 Activación plaquetaria por EPI	35
1.6 Patología de AP	36
1.7 Ácido cafeico (AC)	37
1.8 Efecto del AC en enfermedades cardiovasculares.....	39
1.9 Derivados del AC.....	41
1.10 Cafeato de metilo (CM).....	41
1.10.1 Técnicas de estudio de AP	42
1.10.2 <i>Ex vivo</i> : agregometría plaquetaria.....	42
1.10.3 Ventajas y limitaciones de la técnica.....	43
1.10.4 Criterios utilizados en la técnica LTA	44
2 Metodología	45
2.1 Derivados de AC obtenidos por semisíntesis	45
2.2 Materiales y reactivos	48
2.3 Preparación de las plaquetas.....	49
2.4 Equipos y materiales.....	49

2.5	Protocolo experimental	50
2.5.1	Fases del estudio.....	50
2.6	Análisis estadístico	51
2.7	Aspectos éticos.....	51
3	Resultados	53
3.1	Resultados fase I	53
3.2	Resultados fase II	56
4	Discusión	59
5	Conclusión.....	62
6	Recomendaciones	63
7	Bibliografía.....	64
8	Anexos.....	70
	Anexo A. consentimiento informado	70
	Anexo B. Analisis estadistico de DAC frente AA	70
	Anexo C. Reporte de hemograma de voluntarios sanos	73

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1–1: Glicoproteínas de la membrana plaquetaria	22
Tabla 1–2: Gránulos α : proteínas y funciones	26
Tabla 1–3: Concentración de agonistas en LTA adaptada de Michelson A D 2013 (47)	44
Tabla 2–1: Compuestos derivados de AC	45
Tabla 2–2: Datos espectroscópicos de los derivados de AC	47
Tabla 2–3: Reactivos y concentraciones finales.....	48
Tabla 3–1: Promedios de AP e intervalos de confianza de los derivados de AC, frente a AA	54
Tabla 3–2: Promedio de porcentaje de agregación máximo de los compuestos a los inductores de AP	56
Tabla 3–3: Comparación de CE50 de AC y 3-3 (hidroxifenil) acrilato de etilo.....	58

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Trombopoyesis	20
Figura 1-2: Funciones de la plaqueta.....	21
Figura 1-3: Plaquetas, diagrama de sus organelos en reposo y activada.....	24
Figura 1-4: Agregación, diagrama de ligandos y receptores	30
Figura 1-5: Descripción general de la activación plaquetaria	32
Figura 1-6: Activación plaquetaria por trombina.....	35
Figura 1-7: Estructura química AC	38

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 3-1: Porcentaje de AP inducida por AA, 500 μ M, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml). * $p < 0,05$ frente al control. ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, n: >3.....	53
Gráfica 3-2: Porcentaje de AP inducida por EPI, 300 μ M, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml), * $p < 0,05$ frente al control. ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, n: >3.....	54
Gráfica 3-3: Porcentaje de AP inducida por COL, 10 μ g/ml, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml), * $p < 0,05$ frente al control. ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, n: >3.....	55
Gráfica 3-4: Porcentaje de AP inducida por ADP, 20 μ g/ml, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml), * $p < 0,05$ frente al control ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, n: >3.....	56
Gráfica 3-5: Efecto concentración – respuesta de cafeato de butilo, metil cinamato y acrilato de etilo sobre el porcentaje de agregación plaquetaria inducido por AA (500 μ M).	56
Gráfica 3-6: Curvas concentración versus porcentaje de AP inducida por AA obtenidas con AC (control: compuesto fuente) y 3-3 hidroxifenil acrilato (compuesto semisintético)57	

Lista de símbolos y abreviaturas

AA	Ácido araquidónico.
AC	Ácido cafeico.
ACG	Ácido clorogénico.
ASA	Ácido acetilsalicílico.
AI	Angina inestable.
ATP	
	Adenosín monofosfato cíclico.
AP	Agregación plaquetaria.
COL	Colágeno.
COX-2	Ciclooxigenasa-2.
COX-1	Ciclooxigenasa-1.
EC	Enfermedad coronaria.
Fi	Fibrinógeno.
GMP c	Guanosín monofosfato cíclico.
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato.
IAM	Infarto agudo de miocardio.
MinSalud	Ministerio de Salud y Protección Social
MSI	Muerte súbita de causa isquémica.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PKC	Proteína quinasa C.
PPP	Plasma pobre en plaquetas.
PRP	Plasma rico en plaquetas.
SCA	Síndrome coronario agudo.
TXA-2	Tromboxano A-2.
VNT	Vitronectina.
CAM	Moléculas de adhesión celular.

Introducción

La aterosclerosis es un proceso de enfermedad arterial panvascular que involucra las arterias coronarias, cerebrales y periféricas, además, es la principal causa de mortalidad en el mundo. La vía fisiopatológica común de la aterosclerosis termina en el estrechamiento u obliteración de la luz arterial a través de la erosión o ruptura de placas cargadas de lípidos y altamente inflamatorias con trombosis posterior. Las manifestaciones clínicas corresponden justo al sistema orgánico afectado. El corazón y el cerebro son los órganos que tienen más secuelas en la vida de los pacientes (Majithia y Bhatt, 2019).

Las enfermedades cardiovasculares de mayor ocurrencia son la enfermedad coronaria (EC) y la enfermedad cerebrovascular. Esta condición incluye cardiopatía coronaria, enfermedad que compromete los vasos sanguíneos que irrigan el miocardio; las enfermedades cerebrovasculares, que son de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro y las arteriopatías periféricas, los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores (Sánchez-Arias et al., 2016).

La EC es una de las enfermedades más comunes en la población mundial y continúa perteneciendo a las principales causas de mortalidad en personas mayores de 35 años y su frecuencia va en aumento. Esta enfermedad causa alrededor de 1,8 millones de muertes al año, lo que corresponde al 20 % de todos los fallecidos en Europa con grandes variaciones entre países (Solla et al., 2011). En Estados Unidos, según la American Heart Association International (AHA), en el 2017 las muertes por enfermedad cardiovascular representaron más de 801 000, lo que significa que una de cada tres muertes es debido a la enfermedad cardiovascular (Solla et al., 2011).

En el caso de Colombia y Latinoamérica, el comportamiento es aún más preocupante, pues es una de las regiones del mundo con más factores de riesgo cardiovascular (sobrepeso, dislipemia y diabetes mellitus). Según cifras aportadas por

Ministerio de Salud (MinSalud), en el año 2011, reportaron que la EC ocupó la principal causa de casos fatales, lo que fue un total de 29 000 personas las que murieron.

La EC es la enfermedad del corazón secundaria que compromete las arterias que lo nutren (arterias coronarias). Puede manifestarse como una angina de pecho o en forma aguda como un infarto de miocardio. La causa más frecuente de EAC es la aterosclerosis que se produce cuando se forma una sustancia cérea dentro de las arterias coronarias, lo cual disminuye la cantidad de oxígeno que llega al corazón y puede ocasionar un infarto agudo al miocardio (Texas Heart Institute, 2020). Entre las manifestaciones de la EC, se destaca el síndrome coronario agudo (SCA), cuya causa es la complicación de una placa de ateroma existente con anterioridad en un vaso coronario que facilita los procesos de adhesión, activación y AP; así como la activación de la cascada de la coagulación y la consecuente formación de un trombo, que provocará distintos grados de obstrucción al flujo coronario. Los cuadros se manifestarán según la severidad del daño de la placa ateromatosa, la asociación de vasoespasmos, antecedentes de isquemia e integridad del miocardio y según su magnitud como AI, infarto miocárdico agudo sin elevación del segmento ST (IMASEST), infarto miocárdico agudo con elevación del segmento ST (IMACEST) o como MSI.

Por otro lado, como prevención primaria se pueden implementar hábitos saludables en la dieta y disminuir el sedentarismo, pues son una alternativa eficaz para reducir el riesgo cardiovascular. En la prevención secundaria se utilizan antiagregantes plaquetarios, tipo ASA, como una herramienta esencial para reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad aterotrombótica, lo cual logra limitar de sobremanera la morbimortalidad. No obstante, el aumento de hemorragias concomitantes con la terapéutica disponible ha disminuido la intensificación de los regímenes antiplaquetarios.

De esta forma, desarrollar nuevas terapias antiplaquetarias dirigidas a receptores adicionales y vías de señalización con un enfoque en el mantenimiento de la eficacia antiplaquetaria mientras se preserva la hemostasia, es un enorme reto para la investigación, la cual está enfocada en mejorar los resultados de los pacientes con enfermedades aterotrombóticas.

La búsqueda de metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal puede contribuir en la identificación de compuestos, los cuales sirven como base para la

obtención de agentes, que mejoren el equilibrio entre la agregación y el sangrado en las enfermedades aterotrombóticas. Estudios realizados con anterioridad, desde el departamento de Farmacia, de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional (UNAL), llevaron a la identificación de efectos antiagregantes plaquetarios en los compuestos AC y ACG, metabolitos polifenólicos identificados en la especie *Solanum tuberosum* (N.V. "papa") (Buitrago et al., 2007; Buitrago, 2012; Buitrago et al., 2019).

Así pues, una de las estrategias para proseguir con esta línea de investigación ha sido la obtención de compuestos semisintéticos a partir de estos metabolitos con miras a examinar su efecto sobre la AP. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antiagregante de compuestos derivados del AC obtenidos por semisíntesis.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de AC obtenidos por semisíntesis.

Objetivos específicos

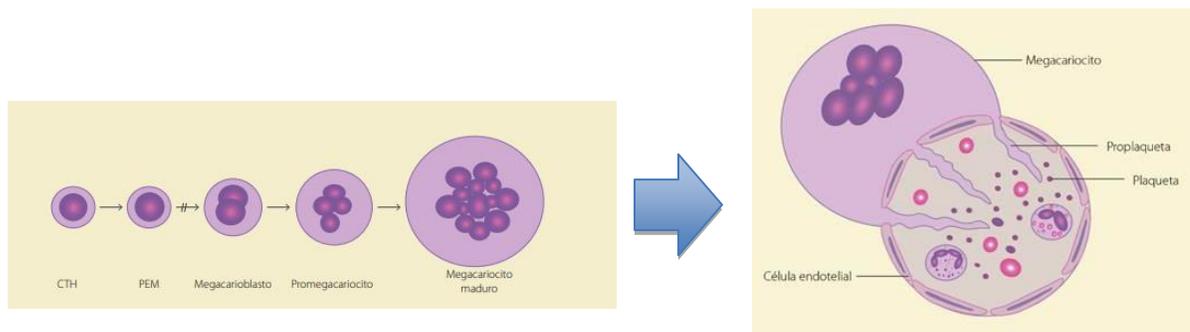
- Evaluar la actividad antiagregante plaquetaria 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo (DAC02).
- Evaluar la actividad antiagregante plaquetaria del cafeato de butilo (DAC08).
- Evaluar la actividad antiagregante plaquetaria del metil cinamato (DAC11).

1 Marco teórico

1.1 La plaqueta

Las plaquetas son fragmentos subcelulares enucleados de megacariocitos de la médula ósea. En el cuerpo humano, casi el 70 % de las plaquetas están presentes en la circulación sanguínea y el 30 % se almacenan en el bazo. Por otro lado, las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la hemostasia normal al detener la pérdida de sangre después de una lesión vascular adhiriéndose a los sitios de esta, pues reclutan otras plaquetas y células sanguíneas al coágulo en desarrollo y activan la cascada de coagulación del plasma (la hemostasia primaria). En sincronía con los productos finales de la cascada de coagulación, dominante reticulada fibrina, se forma un coágulo más estable. Sin embargo, por estos mismos mecanismos, las plaquetas también contribuyen, de primera mano, a la trombosis vascular patológica en la búsqueda constante de medios para prevenir o templar la enfermedad vascular.

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas (de 2 a 4 μm de diámetro) con múltiples funciones y una vida útil corta que circula en la sangre durante 7-10 días en humanos. Después, estas se eliminan en el hígado y bazo. Asimismo, el trombopoyesis (la producción de plaquetas) se produce, ante todo, en la médula ósea y es precedido por la diferenciación del tallo hematopoyético de células en megacariocitos poliploides (50-100 μm en de diámetro), que desprenden numerosas protuberancias citoplasmáticas de ramificación larga llamadas proplaquetas. Para la formación de plaquetas, trabaja la trombopoyetina, que es producida en el hígado, y activa el receptor de trombopoyetina en los megacariocitos para inducir la formación de proplaquetas a través de un mecanismo que se activa con recuentos bajos de plaquetas en sangre (Van der Meijden y Heemskerk, 2019).

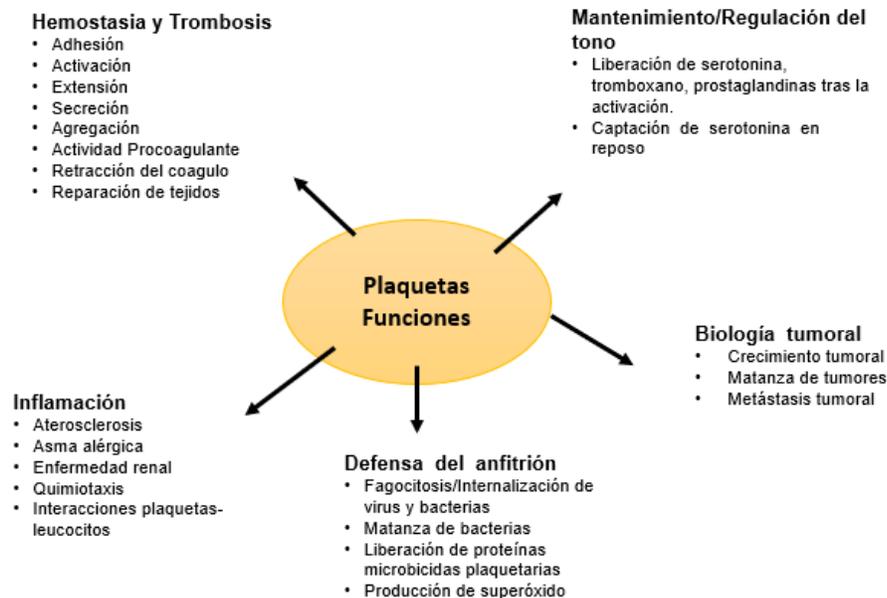
Figura 1–1: Trombopoyesis

Nota. Tomado de “El megacariocito: una célula muy original”, por A. González, P Bizarro Lemus M ,2019, Rev. Fac. Med. (Méx.) 62. (<https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.1.02.>)

1.2 Funciones de la plaqueta

Las plaquetas son multifuncionales y están involucradas en muchos procesos fisiopatológicos, incluida en la hemostasia y trombosis, retracción del coágulo, constricción de vasos y reparación, inflamación, la promoción de la aterosclerosis, defensa del huésped e incluso crecimiento tumoral/metástasis; aunque la investigación sobre estas está encaminada a la hemostasia (Harrison, 2005). Tras el daño de la pared del vaso, las plaquetas presentan respuestas reguladas que incluyen adhesión, propagación, reacciones de liberación, agregación, exposición de una superficie procoagulante, formación de micropartículas y retracción de coágulos. Todas estas respuestas están encaminadas a formar un tapón hemostático, lo más pronto posible, para prevenir la pérdida de sangre. Si alguna de estas respuestas o el número de las plaquetas es reducido, la hemostasia se ve comprometida en general. Por otro lado, si las plaquetas están aumentadas o están hiperreactivas pueden causar problemas de trombos, en el caso que sea una arteria con alto cizallamiento se formaría al interior una placa ateromatosa, lo que causa IAM o ECV, dos de las principales causas de morbilidad y mortalidad en Occidente (Harrison, 2005).

Figura 1–2: Funciones de la plaqueta



Nota. Adaptado de “Platelet function analysis”, por P. Harrison, 2005, *Blood Reviews*, 19, (2). (<https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002>)

1.3 Ultraestructura de la plaqueta

Aunque su estructura parece simple al ser una célula anucleada, es organizada, compleja y metabólicamente activa. Se puede agrupar en cuatro zonas según su estructura y función, estas son: zona periférica, zona sol-gel, zona de orgánulos y zona o sistema de membrana. Los principales orgánulos de la plaqueta son la membrana plasmática, el citoesqueleto, el sistema canicular abierto (OCS), el sistema tubular denso y los gránulos. Sin embargo, están presentes otros, como las mitocondrias y gránulos de glucógeno. A continuación, se describen los principales aspectos de las estructuras relacionadas con su función.

1.3.1 Zona periférica

La zona periférica de las plaquetas consta de una membrana y sus invaginaciones, las cuales forman el OCS. Además, está cubierta por una gruesa capa superficial de glucocálix y un sistema canicular vinculado a la superficie llamado OCS.

1.3.2 Membrana plasmática

La membrana plasmática de la plaqueta participa en las interacciones con el medio externo, por lo que ocupa un papel central en su fisiología. En reposo es una bicapa fosfolípida, en su parte interna está constituida por fatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidinosito y en su parte externa está constituida por la esfingomielina y fosfatidilcolina, que está distribuida. Durante la activación plaquetaria, estos fosfolípidos, en particular el fosfatidilinositol, apoyan la activación plaquetaria al suministrar AA, un ácido graso insaturado que se convierte en eicosanoides, incluido el potente tromboxano A₂, implicados en la transmisión de las señales recibidas en la membrana (Jeske, 2020).

En ella se encuentran glicoproteínas y proteoglicanos que soportan glicosaminoglicanos de superficie, oligosacáridos, glicolípidos y receptores glicosilados esenciales, los cuales cumple la función de ligando o agonistas, pues transmiten su estímulo a través de la membrana a los orgánulos de activación internos (Tabla 1-1). Su superficie plaquetaria, llamada glucocálix, también absorbe albúmina, F1 y otras proteínas plasmáticas y, en muchos casos, las transporta a orgánulos de almacenamiento (Monteiro et al., 2001). Sin perder la continuidad de la membrana, el colesterol la estabiliza, mantiene su fluidez y ayuda a controlar el paso transmembranoso de materiales a través de la membrana plasmática semipermeable (Jeske, 2020).

Tabla 1–1: Glicoproteínas de la membrana plaquetaria

Nomenclatura de electroforesis	Nomenclatura actual	Ligando	Comentarios
GP Ia/IIa	Integrina: $\alpha 2\beta 1$.	COL.	Regula al alza mediante la activación de adentro hacia afuera que depende de la unión del COL a GP VI.
	integrina: $\alpha v\beta 1$.	Vitronectina (VTN).	
	Integrina: $\alpha 5\beta 1$.	Laminina.	
	Integrina: $\alpha 6\beta 1$.	Fibronectina.	
GP VI	CAM de la familia de genes de inmunoglobulinas.	COL.	Receptor clave de COL desencadena la activación, liberación de agonistas

			que aumentan la afección de las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$.
GP Ib/IX/V	CAM de la familia de repetición rica en leucina.	VWF y trombina se unen a GP Iba, la trombina escinde un sitio en GP V.	GP Ib / IX / V es un complejo 2: 2: 2: 1 de GP Iba y Ibb, GP IX y GP V. Hay 25 000 copias en la superficie de la membrana plaquetaria en reposo, 5 % - 10 % en el gránulo a membrana, pero pocos en la membrana SCCS. GP Iba es el sitio específico de VWF.
GP IIb/IIIa	Integrina: $\alpha \text{IIb}\beta 3$	FI, VWF.	GP IIb y GP IIIa se distribuyen en la superficie de la membrana, SCCS y membranas de gránulos α (30 %).

Nota. Adaptado de "Platelet production, structure, and function", por W. Jeske, 2020, *Rodak's Hematology*. (<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00019-2>)

1.3.3 Sistema canicular conectado a la superficie

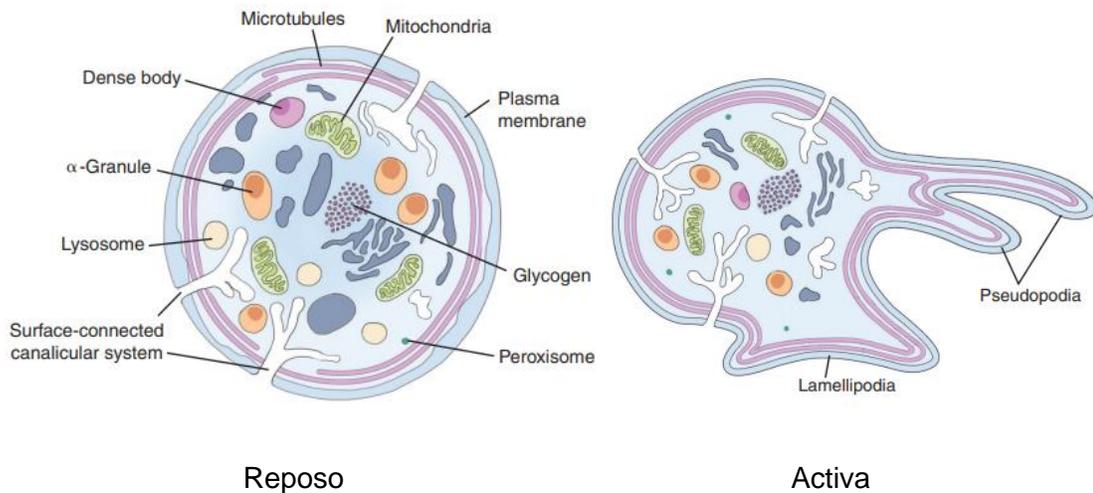
La membrana plasmática invade el interior de las plaquetas, lo que produce un sistema canicular único conectado a la superficie. Esto permite que la plaqueta almacene cantidades adicionales de las mismas proteínas hemostáticas que se encuentran en la glucocálix. También proporciona una mejor interacción de las plaquetas con su entorno, lo que aumenta el acceso al interior de estas y la salida de productos de liberación. Es responsable del intercambio molecular con el entorno extracelular, este sistema representa una vía de acceso de sustancias plasmáticas a lugares más internos de la célula y, durante la activación plaquetaria, constituye una reserva de membrana plasmática que permite el cambio de forma y la emisión de pseudópodos. Allí se produce la endocitosis de liberación significativa de moléculas durante el proceso de secreción de plaquetas después de la activación (Spencer y Becker, 1997; Geraldo et al., 2014).

1.3.4 Sistema tubular denso

El sistema tubular denso es un remanente condensado del sistema endoplásmico rugoso, constituye el principal lugar de almacenamiento del calcio intraplaquetario, y acumula Ca^{2+} debido a la presencia de un transportador Ca^{2+} ATPasa. Además, soporta

una serie de enzimas que apoyan la activación plaquetaria incluida la fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa, que apoya la producción de tromboxano A2 y fosfolipasa C, las cuales contribuyen a la producción de moléculas de señalización trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG).

Figura 1–3: Plaquetas, diagrama de sus organelos en reposo y activada



Nota. Adaptado de “Platelet production, structure, and function”, por W. Jeske, 2020, *Rodak’s Hematology*. (<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00019-2>)

1.3.5 Zona sol-gel: citoesqueleto

La zona sol-gel se encuentra debajo de la zona periférica. Está compuesta por un citoesqueleto que se forma por dos estructuras: un conjunto de microtúbulos cercano a la membrana y una malla densa de filamentos de actina. Es el responsable del cambio de forma de las plaquetas después de la activación y de los microtúbulos necesarios para mantener la forma discoide.

Cuando las plaquetas se activan, una cantidad adicional de actina polimeriza se asocia a otras proteínas, tales como la tropomiosina, la α -actinina y la ABP; lo que determina la organización de los filamentos en una red tridimensional periférica y la formación de heces. Al originar los pseudópodos, estas proteínas son las que activan las plaquetas morfológicamente. La contracción de los filamentos periféricos hace que los

gránulos dispersos en el citoplasma ocupen una posición central y, a la vez, liberen sus contenidos vía SCA.

Todo empieza con la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina reguladoras (MLC) en serina 19 de miosina IIA, que estimulan la actividad ATPasa, la cual permite la interacción de los filamentos de miosina con actina. La interacción actina-miosina conduce a la contracción del citoesqueleto de actina necesaria para el cambio de forma, extensión de pseudópodos y secreción granular.

Por su parte, los agonistas plaquetarios estimulan el proceso de señalización al coordinar la activación simultánea de dos enzimas reguladoras: MLC quinasa (MLCK) y MLC fosfatasa. Estas enzimas activan la fosforilación de MLC, luego, los microtúbulos dirigen la centralización granular para la divulgación de su contenido a través del OCS.

1.3.6 Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras compuestas por moléculas de tubulina, que son heterodímeros relacionados a dos polipéptidos globulares, la α y β . La función de los microtúbulos es el mantenimiento de la forma discoidea de las plaquetas en reposo. Durante la activación, los microtúbulos se contraen y centralizan los organelos para la secreción al sistema canicular, y, a su vez, migran a la periferia para formar los pseudópodos. La malla de actina posee el esqueleto submembranoso y los filamentos citoplasmáticos. Su función es aportar al cambio de forma de la plaqueta, formación de pseudópodos y reorganizar los complejos de GPs (Ib-IX-V) en la membrana (Bermejo, 2017).

1.3.7 Orgánulos

Los orgánulos están distribuidos ampliamente por las plaquetas, delimitados por una membrana individual lo que hace característico su contenido específico, se distinguen los gránulos α , los gránulos densos, los lisosomas. En la activación, estos se centralizan y secretan su contenido.

1.3.8 Gránulos α

Los gránulos α son los más prominentes y los que se encuentran en mayor número (entre 50 a 80 por plaqueta). Están llenos de proteínas, algunas endocitosadas, otras sintetizadas dentro del megacariocito y almacenadas en plaquetas. Varias proteínas de gránulos están unidas a la membrana, a medida que la plaqueta se activa, las membranas de gránulos α se fusionan con el SCCS. Por esta razón, su contenido fluye al microambiente cercano.

Las proteínas al interior de los gránulos tienen dos orígenes: en primer lugar, la membrana endocita se halla al interior del gránulo, como es el caso del F1 que se encuentra en la circulación; y, en segundo lugar, son sintetizadas por el aparato de *Golgi* como el VWF, factor V y la trombospondina. Hay tres proteínas que se consideran exclusivas de las plaquetas: el factor plaquetario 4 (PF4), la β -tromboglobulina (β -TG) y el factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF).

Tabla 1–2: Gránulos α : proteínas y funciones

Categorías	Contenido de α gránulo	Funciones
Proteínas adhesivas	VWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminina-8.	Interacciones de contacto celular, hemostasia primaria y constituyentes de la matriz extracelular.
Factores de la coagulación y sus inhibidores	Factor V/Va, factor XI, multimerina, proteína S, HMWK, proteasa, nexina-1 y -2, TFPI, inhibidor de proteína C, gas 6.	Generación de trombina, formación del coágulo y proliferación de la matriz extracelular.
Factores fibrinolíticos y sus inhibidores	Plasminógeno, PAI-1, u-PA, α 2-antiplasmina, TAFI, α 2-macroglobulina.	Producción de plasmina y remodelación vascular.
Proteasas y antiproteasas	MMP-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17 (TACE), TIMPs 1- 4, inhibidor plaquetario del FIX, C1 inhibidor, α 1 - antitripsina.	Angiogénesis, regulación de la coagulación y de mecanismos celulares.
Factores de crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3.	Quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis.
Quimioquinas, citoquinas y otros	TGF- β 1 y - β 2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , MCP-1, MCP-3, PF4, β -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerinas.	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular.
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas, quinocidinas.	Bactericida y fungicida.
Glicoproteínas de membrana	allbb3, avb3, GPIb, PECAM-1, constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, P-selectina, TLT-1, CD63, CD40L, TF, TRAIL,	Adhesión y AP, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacción plaqueta-

	furina, celubrevina, syntaxina-2, clatrina.	leucocito y plaqueta pared vascular.
Otras	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amiloide b proteína, factor H de complemento, semaforina 3. ^a .	

Nota. Tomado de "Plaquetas", por E. Bermejo, 2017, *Hematología*, (21). (<http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf>)

1.3.9 Gránulos densos

Hay de dos a siete gránulos densos por plaqueta, aparecen más tarde que los gránulos α en los megacariocitos. Su contenido es, sobre todo, serotonina (vasoconstrictor), cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , ADP y ATP. En su membrana poseen receptores tipo GP53 (granulofisina-CD63) GPIIb/IIIa y P-selectina. Después de la activación, el contenido de los gránulos densos es secretado directamente por fusión con la membrana plasmática y las proteínas de membrana son translocadas a la superficie. A diferencia de los gránulos α que emplean el SCCS, los gránulos densos migran a la membrana plasmática y liberar su contenido justo en el plasma en activación plaquetaria.

1.4 Activación plaquetaria

La activación plaquetaria se inicia con la unión del agonista a receptores de la membrana plasmática plaquetaria debido a sustancias generadas, ya sea a partir de la lesión del epitelio donde los agonistas que interactúan en la activación plaquetaria son macromoléculas de la matriz subendotelial (COL, VWF), hormonas circulantes (adrenalina y vasopresina) y trombina; o porque las plaquetas ya activadas (tromboxano A_2 , ADP, serotonina) y sustancias son producidas por otras células (factores de activación plaquetaria). Durante la activación plaquetaria, mientras se dan los cambios de forma, ocurre la despolimerización reversible de los microtúbulos y su desplazamiento de la periferia a una posición más central. En paralelo, se incrementa el contenido en actina filamentosa, proceso regulado por el incremento de la concentración de Ca^{2+} y por la interacción de proteínas reguladoras de la actina con lípidos de la membrana.

Existen varias vías de activación de las plaquetas. Las proteínas G controlan la activación celular de todas las células en la superficie interior de la membrana. Las proteínas G son heterotrímeros ABG (proteínas compuestas por tres péptidos diferentes)

que se unen al difosfato de guanosina (GDP) cuando están inactivos. La unión receptor-ligando (agonista) de membrana promueve el GDP de liberación y su reemplazo con guanosina trifosfato (GTP). La porción G_{α} de la molécula G de tres partes se disocia pronto, ejerce la actividad enzimática de guanosina trifosfatasa e hidroliza el GTP unido a GDP, por lo que libera un fosfato radical. Lo que causa la fosforilación para desencadenar síntesis de eicosanoides o vía IP3-DAG (Offermanns, 2006).

Para la vía de los eicosanoides se debe tener en cuenta que el interior de la membrana plaquetaria es rico en fosfatidilinositol, un fosfolípido cuyo El carbono número 2 se une al ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico, conocido como AA. La unión receptor-ligando de membrana y la consiguiente activación de la proteína G desencadena la fosfolipasa A2 que causa esta unión.

La escisión libera AA al citoplasma donde se convierte en el sustrato de la ciclooxigenasa, anclada en el DTS. La ciclooxigenasa trasforma el AA en prostaglandina G2 y prostaglandina H2. Luego, el tromboxano sintetasa actúa sobre la prostaglandina H2 para producir TXA2. Este se une a los receptores de membrana Tpa o TPb, lo que inhibe la actividad del adenilato ciclasa y reduce las concentraciones de CAMP que moviliza el calcio iónico del DTS. El aumento del nivel de calcio citoplásmico provoca la contracción de los microfilamentos de actina, lo que produce un cambio de forma de las plaquetas y una mayor activación de las plaquetas.

Al final, la última vía de activación, también dependiente de proteína G, es la vía IP3-DAG. La activación de la proteína G desencadena la enzima fosfolipasa C, que escinde la membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para formar IP3 y DAG, ambos segundos mensajeros para la activación intracelular. El IP3 promueve la liberación de calcio iónico del DTS que desencadena la contracción del microfilamento de actina (Jeske, 2020; Offermanns, 2006).

1.4.1 Adhesión

La adhesión inicial de las plaquetas a un vaso lesionado es un proceso pasivo, pues esta unión resulta en la activación celular y la favorece. La membrana plasmática contiene más de 50 receptores distintos, incluidos miembros de la familia de la integrina de la molécula de adhesión celular (CAM) (la familia de repeticiones rica en leucina, la familia de genes de inmunoglobulina y la familia de selectinas), la familia de receptores

de siete transmembranas y algunos receptores diversos. Estas interacciones resultan en la modulación de la actividad de canales iónicos, enzimas asociadas a la membrana y citoplasmáticas, que generan segundos mensajeros, transmisores de la señal de activación a sistemas efectores responsables de las manifestaciones externas de activación de la plaqueta (Alberto et al., 2018).

Por otro lado, la adhesión al subepitelio depende, de alguna forma, de las condiciones y hostilidad del medio. En condiciones de bajo coeficiente de cizallamiento, las plaquetas se adhieren al COL, fibronectina, laminina, VTN y trombospondina del subendotelio. Pero si hay alto cizallamiento (lecho arterial y microcirculación), se une al VWF. El complejo GP Ib/IX/V es el principal receptor implicado en la adhesión en estas condiciones.

La adhesión es favorecida en este momento por la expansión de la plaqueta de paso, de forma de discoide a esferoide, y la emisión de pseudópodos como resultado de la reorganización del citoesqueleto. Esto favorece no solo el proceso de adhesión de las plaquetas al subendotelio, sino también la interacción con otras plaquetas (Monteiro et al., 2001).

1.4.2 Agregación

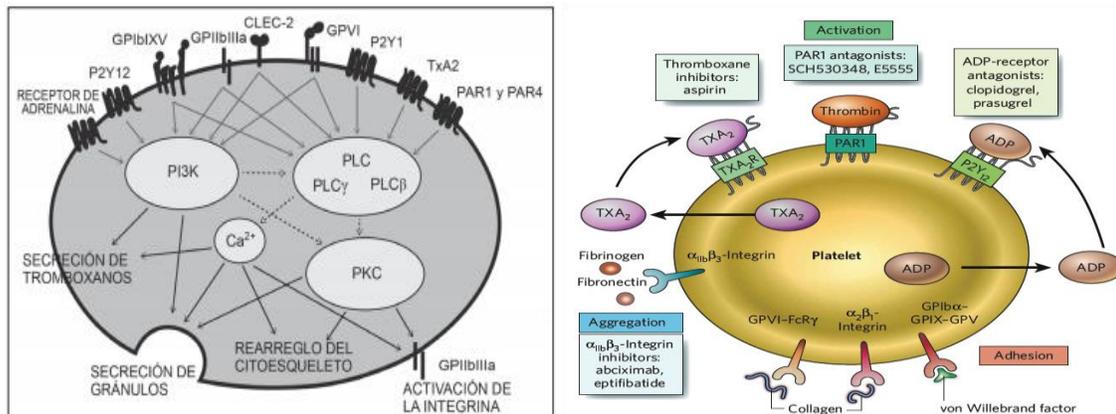
La agregación consiste en la unión de las plaquetas activadas unas a las otras. La activación ocurre después del contacto con el subendotelio. Además de la exposición al COL y la secreción de VWF, la lesión de los vasos sanguíneos expone el factor tisular expresado en las células subendoteliales del músculo liso y los fibroblastos. El factor tisular desencadena la producción de trombina, que escinde las plaquetas PAR1 y PAR4. Esta activación adicional genera el “COL y la trombina activados” o plaquetas COAT integral a la base celular.

Mientras tanto, los activadores plaquetarios TXA2 y ADP son secretado de los gránulos de plaquetas al microambiente, donde activan las plaquetas vecinas a través de sus respectivos receptores y desencadenan la activación de la integrina de adentro hacia afuera allbb3 (receptor GP lib/IIIa), lo que le permite unirse a secuencias RGD de FI y VWF, por consiguiente, apoyan la unión de plaqueta-plaquetas. Asimismo, la P-selectina de las membranas de los gránulos α se mueve hacia la superficie de la membrana para

promover la unión de las plaquetas con los leucocitos. De los agentes que causan agregación se pueden agrupar de la siguiente manera:

1. **Agentes agregantes primarios:** son los que llevan directo a la agregación a través de mecanismos no mediados por la síntesis de prostanoideos o por la liberación del contenido plaquetario de ADP; o sea, exponen justo los sitios receptores del FI de los que son ejemplo la trombina y el ADP, dan la formación del “coágulo blanco” compuesto ante todo de plaquetas y VWF y es clave en la hemostasia primaria.
2. **Agentes agregantes secundarios:** sustancias que promueven la AP al estimular la liberación de ADP y/o producción de endoperóxidos y TXA₂. Es decir, la secreción del contenido de los gránulos α y densos que inician la hemostasia secundaria (coagulación) y a la formación del coágulo rojo que este compuesto de fibrina y glóbulos rojos.

Figura 1–4: Agregación, diagrama de ligandos y receptores.



Nota. Tomado de “Platelet production, structure, and function”, por W. Jeske, 2020, *Rodak’s Hematology*. (<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00019-2>); y “Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response”, por L. Brass et al., 2013, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 27, (3). (<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.02.002>)

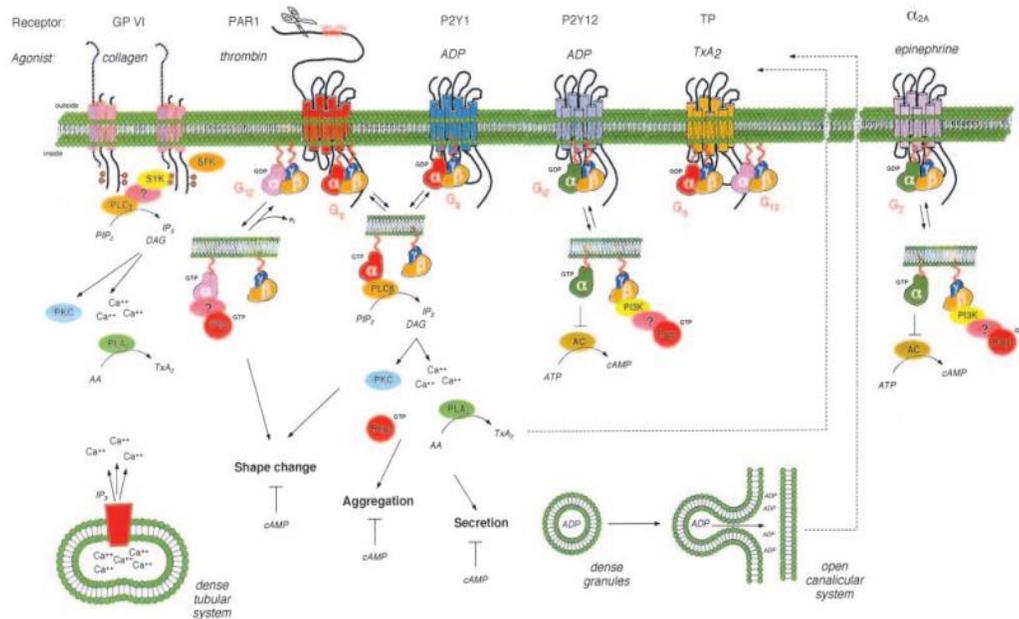
1.4.3 Secreción

Las plaquetas ya activadas liberarán su contenido granular. La activación de afuera hacia adentro de las plaquetas se da través de STR (ADP unido a P2Y12) y el

producto de GP VI desencadena la contracción del microfilamento de actina. Asimismo, los filamentos intermedios se contraen moviendo los microtúbulos hacia adentro para comprimir los gránulos. El contenido de α -gránulos y lisosomas fluye a través del SCCS, mientras que los gránulos densos migran a la membrana plasmática donde se secreta su contenido. Los contenidos de los gránulos densos son vasoconstrictores de moléculas pequeñas y agonistas plaquetarios que amplifican la hemostasia primaria. La mayoría del contenido de los gránulos α son proteínas de coagulación de moléculas grandes que participan en la hemostasia secundaria.

1.5 Agonistas agregación plaquetaria (AP)

Una vez que se ha producido la lesión vascular, las plaquetas se activan por COL expuesto, trombina generada de manera local, TXA2 derivado de plaquetas y ADP que se ha liberado de las células dañadas o se ha secretado a partir de gránulos densos en plaquetas. El patrón de flujo de los glóbulos rojos circulantes facilita la adhesión de las plaquetas al COL. Posteriormente, empuja las plaquetas más cerca de la pared del vaso, lo que permite que la GPIIb/IIIa, en la superficie de las plaquetas, sea atrapada por el dominio A1 del VWF unido al COL (Farndale, 2006).

Figura 1–5: Descripción general de la activación plaquetaria.

Nota. Tomado de “Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists”, por G. Fitzgerald, 1991, *The American Journal of Cardiology*, 68, (7). ([https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90379-y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90379-y))

1.5.1 Activación plaquetaria por COL

En el tejido sano, el COL, que apoya la pared de los vasos sanguíneos y el tejido circundante, está oculto por capas de células endoteliales y no puede entrar en contacto con las plaquetas circulantes. No obstante, si hay daño en el epitelio, el COL se expone y pueden interactuar con los componentes celulares de la sangre, así como con las proteínas del plasma sanguíneo. La superficie de la plaqueta contiene una serie de receptores de proteínas que detectan la presencia en el medio extracelular de moléculas específicas al incluir hormonas, citocinas y otras especies.

El COL se une a varios de estos receptores en la superficie de las plaquetas, en particular, a la integrina α₂β₁ y la glicoproteína VI (GpVI). También pueden ocurrir interacciones ligando receptor con el factor Von Willebrand (VWF). En condiciones *in vivo* de flujo arterial, el VWF juega un papel esencial. Este se une a la superficie plaquetaria a

través del complejo glicoproteína Ib / V / IX e interactúa justo con GpIba a través de su A1 dominio y también en sitios específicos del COL a partir de su dominio A3. Así, una serie de receptores plaquetarios contribuyen a la interacción de las plaquetas con COL. Se han identificado cuatro receptores de COL en humanos, dos se unen al COL (integrina $\alpha 2\beta 1$ y GPVI); los otros dos ($\alpha \text{IIb}\beta 3$ y GPIba) se unen a través de VWF. De estos receptores, GPVI es el de señalización más potente (Brass et al., 2013; Murugappan, 2006).

1.5.2 Activación plaquetaria por ADP y receptores purinérgicos

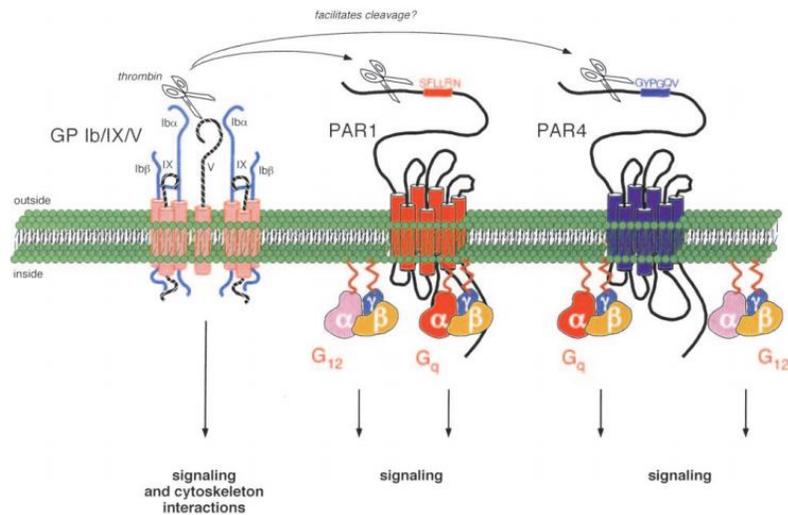
El difosfato de adenina (ADP) es un importante agonista fisiológico que juega un papel vital en la normalidad hemostasia y trombosis. Los receptores P2Y₁₂ y P2Y₁ son acoplados a la proteína G activada por ADP e inhibida por ATP. Con respecto a la agregación mediada por nucleótidos de adenina en plaquetas, el receptor P2Y₁₂ el receptor más importante, puede acoplarse a la subunidad *G α i* que conduce a la inhibición de adenil ciclasa, el cual media la conversión de ATP a AMP. En consecuencia, los niveles disminuidos de CAMP pueden conducir un aumento de la activación plaquetaria, a partir de la activación de los receptores P2Y₁₂ mediada por ADP, que conduce a la activación de PI-3 quinasa (PI-3K) a través de G $\beta\gamma$. El receptor P2Y₁₂ contribuye a la respuesta de calcio mediada por ADP (por P2Y₁) en plaquetas, por lo que activa PI-3K (Fontana, 2003; Koupenova y Ravid, 2018).

Es indispensable nombrar la función del ATP en la AP; el ATP se une al receptor P2X₁, que es un receptor tipo canal iónico, controlado por ligando, el cual es activado por ATP e inhibido por ADP. La unión de ATP al receptor P2X₁ conduce a la entrada de calcio a las plaquetas; quizá la plaqueta posee receptores de ATP y ADP con el fin de establecer una regulación equilibrada de la hemostasia o formación de trombos, que depende de la intensidad de la lesión de los vasos. La unión de ATP al receptor P2X₁ resulta en un cambio transitorio de forma plaquetaria, desgranulación plaquetaria, formación de pseudópodos y activación plaquetaria (Brass, 2003). Durante el alto cizallamiento por estrés, el P2X₁ activado por ATP también contribuye a las plaquetas inducidas agregación por reordenamientos citoesqueléticos, mediados por MLC. El ATP también puede contribuir a la secreción plaquetaria de TxA₂ y mejorar la agregación mediada por TxA₂.

1.5.3 Activación plaquetaria por trombina

La trombina activa las plaquetas humanas al escindir y activar PAR-1 y PAR-4. A su vez, estos receptores activan Gq, G12, lo que lleva a la activación de PLC, PI 3-quinasa y las proteínas G monoméricas (Rho, Rac y Rap1). Además, causa un aumento en la concentración citosólica de Ca²⁺ e inhibe la formación de AMPc. Este proceso es compatible por ADP y TxA₂ lanzados, que se unen, a su vez, a sus propios GPCR en la superficie de las plaquetas (figs. 3, 4). Por otro lado, la escisión de PAR-4 humano requiere de una mayor concentración de trombina que la escisión de PAR-1 y es probable que PAR-1 sea el receptor de señalización predominante a bajas concentraciones de trombina, pero la activación de PAR-4 puede ser sostenida (Fitzgerald, 1991).

Figura 1–6: Activación plaquetaria por trombina



Nota. Tomado de “Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists”, por G. Fitzgerald, 1991, *The American Journal of Cardiology*, 68, (7). ([https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90379-y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90379-y))

1.5.4 Activación plaquetaria por TXA2

El tromboxano (TX) A2 es el predominante de la familia de lípidos conocidos como eicosanoides, que son metabolitos del AA generados por la acción secuencial de tres enzimas: fosfolipasa A2, COX-1 / COX-2 y TxA2 sintasa (TXAS) (Gresele et al., 2012). Es liberado por una variedad de células, plaquetas macrófagas, neutrófilos y células endoteliales. Tiene propiedades protrombóticas que estimulan la activación de las plaquetas y la AP. Además, TXA2 es un vasoconstrictor y se activa durante los momentos de lesión e inflamación de los tejidos, a partir de sus acciones biológicas a través del receptor TXA2 denominado TP, el cual está acoplado a la proteína G.

1.5.5 Activación plaquetaria por EPI

La EPI se considera un agonista débil, pues no tiene efecto directo detectable sobre la fosfolipasa C y no causa cambio de forma. Las respuestas a la EPI en las plaquetas están mediadas por receptores adrenérgicos α_2 . Por otro lado, la potenciación, por lo general, se atribuye a la capacidad de la EPI para inhibir la formación de AMPc,

aunque puede desencadenar la hidrólisis de fosfoinosítidos de forma indirecta al estimular la formación de TXA₂ (Gresele et al., 2012).

1.6 Patología de Agregación plaquetaria (AP)

En línea con lo anterior, al suceder un daño en un vaso sanguíneo, ocurre la estimulación neural que provoca vasoconstricción transitoria del vaso afectado. Además, las células dañadas liberan endotelina, lo que promueve aún más la vasoconstricción para mitigar la pérdida de sangre. El COL subendotelial queda expuesto en el sitio de la lesión, a glucoproteína plasmática del factor VWF liberada de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, esta se une al COL expuesto y sirve como sitio de adhesión de las plaquetas a la superficie del vaso con pérdida del endotelio. Las plaquetas se unen al VWF mediante su receptor GPIb, lo que da como resultado un cambio conformacional y la activación de las plaquetas y provoca la liberación de mediadores hemostáticos de los gránulos de las plaquetas incluido el VWF adicional, que se encuentra en los gránulos alfa para potenciar la acumulación de plaquetas.

Cuando empieza la desgranulación su activación continúa a lo largo de un circuito de retroalimentación positiva. El difosfato de adenosina (ADP) liberado de los gránulos densos se une a los receptores P₂Y₁ y P₂Y₁₂, ubicados en la membrana plaquetaria, lo que introduce la expresión del receptor GPIIb/IIIa. Este receptor plaquetario recién insertado, junto con el TXA₂ producido por la enzima ciclooxygenasa plaquetaria, permite la AP. El FI de los gránulos alfa actúa como enlace entre los receptores GPIIb/IIIa en diferentes plaquetas (Varga-Szabo et al., 2008; Ghoshal y Bhattacharyya, 2014).

La mayoría de las plaquetas nunca experimentan una adhesión firme en la circulación, solo cuando la capa de células endoteliales de los vasos sanguíneos está dañada por lesiones o alteraciones patológicas, como las que se encuentran en la aterosclerosis, (hiperagregación), diabetes mellitus. El potencial adhesivo de las plaquetas se vuelve aún mayor; en estas condiciones, los componentes de la matriz extracelular subendotelial (MEC) están expuestos y desencadenan activación y adhesión plaquetarias repentinas. Las plaquetas producen y liberan diversos estímulos solubles que refuerzan la adhesión plaquetaria, los cuales son fundamentales para la hemostasia primaria.

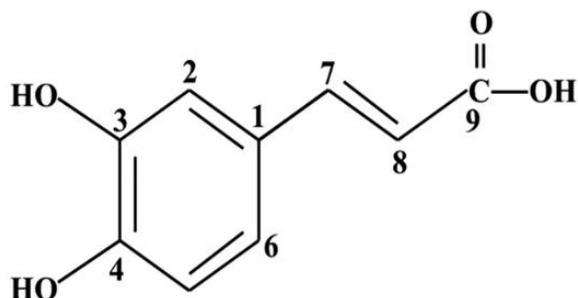
Sin embargo, la formación incontrolada de trombos en los vasos enfermos puede provocar oclusión vascular, isquemia e infarto de órganos vitales. Uno de los principales problemas clínicos en el mundo desarrollado es la trombosis arterial causada por la rotura o erosión de una placa aterosclerótica, que conduce a la adhesión plaquetaria, a la formación subsiguiente de trombos en las arterias coronarias y cerebrales que provocan infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Monteiro et al., 2019).

Por otro lado, es pertinente nombrar la diabetes mellitus y sus problemas asociados al daño vascular. Uno de los cambios más comunes en el comportamiento de las plaquetas en condiciones de enfermedad, como la diabetes, es la hiperagregación plaquetaria, esta es producida por la generación de más 11-deshidro-tromboxano B₂, que es el producto final importante de la vía del tromboxano, lo que aumenta en estos pacientes la ocurrencia de ECV. El cambio en la fluidez de la membrana se atribuye al deterioro de las funciones plaquetarias, la DM II causa esta pérdida de fluidez de la membrana, también aumentan los receptores de adhesión. La alteración de la vía del tromboxano puede ser un vínculo entre la disfunción plaquetaria y la diabetes, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares (Monteiro et al., 2019).

1.7 Ácido cafeico (AC)

El AC es un polifenol presente en gran variedad de plantas. Es un compuesto fenólico sintetizado por todas las especies vegetales, provee mecanismos de defensa a la planta contra plagas, virus y bacterias y está presente en alimentos como café, vino, té y propóleo (Silva et al., 2014). Los compuestos fenólicos brindan protección contra enfermedades no transmisibles no solo por su actividad antioxidante, sino también por regular una variedad de procesos celulares a diferentes niveles, incluida la inhibición enzimática, la modificación de la expresión génica y la fosforilación de proteínas

EL AC es un ácido hidroxicinámico (HCA) natural producido por muchas especies de plantas, tiene una estructura fenilpropanoide (C₆-C₃), con un anillo aromático 3,4-dihidroxilado, unida a un ácido carboxílico a través de un alambre de trans-etileno. El AC es uno de los HCA más abundantes y representa entre el 75 % y el 100 % del contenido total de HCA en las frutas, en especial, en las bayas. Otras fuentes dietéticas incluyen varias verduras (por ejemplo, patatas, zanahorias y alcachofas) y café (Silva et al., 2014).

Figura 1–7: Estructura química AC

Por consiguiente, el AC [ácido (E) -3- (3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoico] es un polvo amorfo blanco con una masa molecular de 180,16 g / mol. Su coeficiente de partición (log P) difiere entre publicaciones, que oscila entre 1,0 y 1,3. Una vez consumido el AC es absorbido por el tracto gastrointestinal a través de transportadores de ácido monocarboxílico y, en menor grado, del flujo transepitelial. Una vez absorbido, el AC sufre extensas transformaciones metabólicas en el TGI, el hígado y los riñones (Tyszka-Czochara et al., 2018).

El AC es ampliamente estudiado por sus grandes beneficios en la salud y propiedades biológicas, debido a su versatilidad química el AC se considera hoy en día una estructura importante como base para la creación de nuevos fármacos. Posee gran actividad antioxidante, por medio de varios mecanismos de acción directa primaria con la captación de reactivos deletéreos por donación de hidrógeno y/o transferencia de electrones; también, posee una acción secundaria por quelación de metales de transición prooxidantes Cu y Fe. Además, mejora la respuesta citoprotectora mediante la activación de la transcripción sensible a factores redox, como la proteína activadora 1 y el factor eritroide nuclear (Wang et al., 2020). A su vez, el AC previene la producción de ROS al reducir el estrés por oxidación.

Se cree que tiene efecto anticancerígeno, pues disminuye la vascularización de tumores por medio de la reducción de la fosforilación de JNK-1 (*kinases* c-Jun N-terminal, un miembro de la familia MAPKs), a través de la disminución de la activación de HIF-1 α (Hipoxia factor Inducible). Esto conduce a la reducción de la vascularización provocado por VEGF (factor de endotelial de crecimiento), por esto, disminuye el crecimiento del tumor. Se ha estudiado en varios tipos de cáncer como melanoma, colorrectal (Tyszka-

Czochara et al., 2018), gastrointestinal, carcinoma de cuello uterino (Liu, 2012) y de cavidad oral.

Asimismo, se ha estudiado por sus propiedades antiinflamatorias y antiasmáticas, concluyendo que ésteres de AC poseen actividad neuroprotectora. Según el estudio de Veeren et al. (2012), mejoran la viabilidad de las células neuronales de pacientes afectados por trastornos como apoplejía, enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral hipóxico-isquémica o espinal. También es un nefro protector y actúa en procesos de inflamación crónica que conllevan a enfermedades renales crónicas como el proceso fibrótico renal; esto se debe a que AC es un potente inhibidor de 5-LOX y COX que están presentes en el riñón y su efecto antioxidante ampliamente conocido (Kinra et al., 2019; Monteiro et al., 2019). De igual forma, es activo en demencia tipo Alzheimer y como agente antimicrobiano. Las concentraciones que ha usado son de 30 µg/ml y 50 mcg/ml, en estudio *in vitro*; mientras que en estudios *in vivo* la dosis utilizada es de 100 mg/kg (Adem et al., 2021).

Además, los compuestos derivados del ácido cafeico se han utilizado, por ejemplo, en enfermedades inmunológicas como antiinflamatorio y en distintos tipos de cánceres. Un estudio publicado recién también investigó el efecto antiviral de compuestos ácido cafeico frente al COVID-19 (Silva y Lopes, 2020), pues ha tenido efectos en otros virus como el virus herpes zoster, sincitial y VIH.

1.8 Efecto del ácido cafeico (AC) en enfermedades cardiovasculares

El AC y derivados, tipo CAPA, CAPE, tienen actividad vaso relajante al actuar ante todo sobre las células endoteliales y del músculo liso vascular (VSM) a través de diferentes dianas moleculares. Por ejemplo, en vasos con epitelio integro, el AC muestra una actividad vasorrelajante moderada; en las arterias coronarias porcinas precontraídas con PGF_{2α}, el AC induce la liberación de óxido nítrico (NO) y la relajación de los vasos.

Por el contrario, en las aortas torácicas de rata precontraídas con NE, no hay diferencia en la relajación inducida por AC entre los vasos intactos y desnudos, lo que indica que este efecto es independiente del endotelio en este vaso (Bhullar et al., 2014). El AC han ganado atención como antihipertensivo, tanto *in vitro* como *in vivo*, y un

inhibidor fuerte de la ECA, su derivado CAPE. Según el estudio de Muhammad et al. (2021), tiene un efecto potente al inhibir la renina, a diferencia del AC donde el efecto es mucho menor.

Se ha encontrado que el AC aumenta la sensibilidad a la insulina mediante la reducción de las citocinas proinflamatorias y el aumento de las adiponectinas en el estado hiperglucémico, en un estudio con ratas, el AC mostró reducción significativa en suero de leptina, adiponectina, insulina y TNF- α , IL-6 e IL-8 (Silva y Lopes, 2020).

Otro aspecto en el cual ha demostrado ser útil es la dislipidemia, mejora el perfil de lípidos séricos, las enzimas biomarcadores del hígado en suero y la arquitectura del tejido hepático hasta la normalidad. En modelos de rata hiperlipidémica, inducida por HFD, el AC mostró actividad antihiperlipidémica y hepatoprotectora. El AC tiene la capacidad de revertir la dislipidemia mediante la reducción de TG y TC, los estudios han demostrado que fue capaz de revertir la esteatosis hepática a largo plazo (Lu et al., 2015). Por otra parte, el AC es un inhibidor de la oxidación de LDL, que previene la aterosclerosis y un estudio en ratas demostró que disminuye, además, la progresión de esta (Lu et al., 2015).

La isquemia causa gran disfuncionalidad de tejidos, el AC ha mostrado un potencial para prevenir y atenuar el daño tisular causado por la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) en muchos órganos *in vivo* e *in vitro*, incluido el miocardio. Se cree que es debido a la capacidad de eliminar ROS antioxidante y antiinflamatoria. Con respecto a la lesión por I/R cardíaca, estos compuestos normalizan varios cambios bioquímicos asociados con la lesión, pues aumentan las actividades de CAT, GSH-Px y SOD; y, al mismo tiempo, reducen los niveles de MDA.

Un estudio realizado en ratas probó el efecto antitrombótico de AC inducido por ADP. Este demostró que AC (1,25-5 mg / kg) inhibió de manera significativa la formación de trombos *in vivo*. En cambio, vía *in vitro* (25-100 μ M) inhibió la AP inducida por ADP, la expresión de P-selectina, la liberación de ATP, la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por ADP, lo que sugiere que el efecto inhibidor de AC sobre la activación plaquetaria puede estar mediado por la regulación del nivel de calcio en el citoplasma y la activación de la integrina α IIb β 3. Además, AC atenuó la activación de p38, ERK y JNK y mejoró los niveles de CAMP. El AC también interviene en el cambio conformacional de la

plaqueta interviene en $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ que se requieren para revelar el sitio de unión del FI (Lee et al., 2014).

Un estudio demostró el efecto inhibitorio de dosis dependientes por COL y la inhibición de la producción de TXA₂ asociado con la fuerte inhibición de COX-1 en microsomas plaquetarios que exhiben actividad, como el citocromo C reductasa. Asimismo, inhibió de forma dependiente de la dosis la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]$ i elevada de COL, que fue aumentada por un inhibidor de la proteína quinasa dependiente de CAMP (A-quinasa), Rp-8-Br-AMPS (Hung et al., 2005).

1.9 Derivados del ácido cafeico (AC)

El AC tiene gran actividad biológica, su estructura química es simple y modificable, lo cual ha permitido utilizarla como estructura base para el desarrollo de nuevas estructuras químicas que permitirán mejorar sus efectos en la salud, encaminado a impulsar la actividad para enfermedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antivirales. Muchos derivados se han estudiado ampliamente que muestran mejores resultados que el AC, por ejemplo, el derivado fenetil éster del ácido cafeico (CAPE). Con respecto a la AP, un estudio sintetizó una serie de amidas de AC, por lo que evalúa sus actividades antiplaquetarias y antioxidantes y muestra que los derivados poseen actividad inhibitoria contra la AP inducida por el AA comparable con el AC. Este estudio también mostró que las anilidas cafeicas mostraban una mayor actividad antioxidante (Jantas et al., 2020).

1.10 Cafeato de metilo (CM)

Fue aislado por primera vez en el género magnolia y se ha estudiado bastante en la medicina tradicional china. El CM es un éster natural del AC que se puede encontrar en numerosos taxones de plantas incluidos los miembros de la familia *Asteraceae* con distribución mundial, como *Lactuca spp.* Varios informes sobre las actividades biológicas del CM se han centrado en sus propiedades anticancerígenas. Además, también se ha demostrado propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, antidiabéticas, hepatoprotectoras o antisenescentes (Lim et al., 2017).

Por otra parte, se ha estudiado en patologías como asma y fenómenos de inflamación. En un estudio, el CM demostró un efecto inhibitor fuerte y específico sobre la formación de SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia) (Balachandrán et al., 2012). De igual manera, también podría inhibir la concentración de IL-6 en fibroblastos. La actividad antimicrobiana se ha estudiado contra *p. aeruginosa*, pues se cree en su capacidad de formar complejos con la pared celular (Rajiv et al., 2011). También se ha investigado por su efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas el CM mostró regulación positiva de GLUT4 y regeneración de células β en el páncreas (Kyung et al., 2002).

Su efecto inhibitor agregante plaquetario es el inducido por la EPI, además de que posee efecto débil sobre la AP humana inducida por ADP, sobre COL o plaquetas inducidas por U46619 (análogo al Tromboxano 2). El efecto antiagregante, según este estudio, era equivalente a los de aspirina. En plaquetas de ratas el CM mostró de tres a cuatro veces más actividad sobre el efecto antiagregante de la EPI y el AA que la aspirina. Se cree que el AC y el CM inhiben 5-lipoxigenasa, enzima encargada de catalizar dos pasos en la formación de los leucotrienos y que no inhibe la síntesis de prostaglandinas al menos hasta una concentración de 500 μ M (Michelson, 2013).

1.10.1 Técnicas de estudio de Agregación plaquetaria (AP)

Los estudios de AP evalúan la respuesta de aglutinación de las plaquetas a varios activadores plaquetarios (p. ej., ADP, COL, AA, trombina, EPI, ristocetina) según se registra mediante un agregómetro de transmisión de luz. Con algunos agregómetros miden la secreción de gránulos plaquetarios, otro indicador de la función plaquetaria; también, puede evaluarse, al simultáneo, midiendo la liberación de ATP por las plaquetas agregadas. Los defectos de la secreción plaquetaria pueden proporcionar una mayor sensibilidad diagnóstica que la prueba de AP por sí sola.

1.10.2 *Ex vivo*: agregometría plaquetaria

La exposición de plaquetas en suspensión a una variedad de estímulos *ex vivo*, es una técnica conocida como agregometría de transmisión de luz (LTA) y también agregometría turbidométrica u óptica. Se inventó en la década de 1960, pronto revolucionó la identificación y diagnóstico de defectos hemostáticos primarios.

El principio de la técnica se basa en los métodos que fueron publicados, en un principio, por Born y O'Brien (Majithia y Bhatt, 2019; Sánchez-Arias et al., 2016). La prueba monitorea cambios en la turbidez (o densidad óptica) de una suspensión de plaquetas mientras se agita la muestra en un receptáculo a 37 °C. La prueba se realiza, casi siempre, al usar plaquetas suspendidas en plasma (PRP), aunque también es posible realizar la prueba utilizando suspensiones de plaquetas lavadas o filtradas en gel.

La LTA es considerada todavía como prueba oro para el estudio de la función plaquetaria, por lo que es uno de los más utilizados para la identificación y diagnóstico de muchos defectos plaquetarios e investigación (Linden et al., 2004). La AP se mide mediante el análisis de la transmisión de luz a través de una muestra de PRP obtenida por centrifugar sangre entera anticoagulada a baja revoluciones. El PRP es una suspensión turbia de células que reducen de forma significativa la transmisión de luz. Tras la adición de un agonista plaquetario, la formación de agregados reduce la turbidez de la suspensión, lo que resulta en una mayor transmisión de luz (el 100 % de luz de la transmisión se establece con PPP). La dinámica de la AP es, por lo tanto, medida en tiempo real como agregación de plaquetas y esta se expresa en porcentaje.

Las proteínas que están involucradas en la estabilidad de la turbidimetría a bajo fuerza de cizallamiento, cuando se agrega un agonista, está mediado por interacciones entre residuos en la cadena γ del FI e integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (glicoproteína [GP] IIb-IIIa, Además, según estudios en ratones, el VTN plasmática y otros ligandos $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ también pueden influir en la extensión y estabilidad de turbidimetría agregación, por lo que se activan respuestas agonistas.

1.10.3 Ventajas y limitaciones de la técnica

La activación plaquetaria y la agregación resultante, medida por agregometría óptica, pueden ser inducidas por numerosos agonistas y concentraciones de agonistas, lo que la hace de gran utilidad en el estudio de las vías de AP, pues se correlaciona con hemorragias e isquemia.

Aunque todavía se considera la prueba de diagnóstico más útil y una herramienta de investigación, la LTA es relativamente no fisiológica porque las plaquetas separadas, por lo general, se agitan a baja temperatura, bajas condiciones de cizallamiento durante

la prueba y forman agregados solo después de la adición de agonistas, condiciones que no imitan con precisión la adhesión, activación y agregación sobre el daño de la pared del vaso, por lo tanto, no simulan estas condiciones *in vivo*. Al igual que la función plaquetaria *in vivo* influye el número de plaquetas del individuo, lo que hace al ensayo inadecuado en pacientes que tengan bajo recuento de plaquetas (Linden et al., 2004).

1.10.4 Criterios utilizados en la técnica LTA

Para la LTA, los límites respectivos de no agregación (0 %) y el 100 % de agregación se establece en el agregómetro antes de empezar el ensayo, y se utiliza la suspensión de PRP y el PPP (o tapón sin análisis de plaquetas lavadas o filtradas en gel). Se examinan los cambios de turbidez de la muestra después de agregar un agonista, utiliza un sistema óptico y el instrumento está configurado para medir la agregación a 37 °C, mientras la muestra se mezcla con el uso de un imán o barra de agitación a 1000 rpm casi siempre, aunque esto cambia según el fabricante.

A continuación, se encuentra una gráfica de la estandarización de la dosis de agonistas plaquetarios para emplear en los ensayos de la LTA.

Tabla 1–3: Concentración de agonistas en LTA adaptada de Michelson A D 2013

Agonista	Método de agregación: transmisión de luz
Recomendación sobre un solo uso,	Concentraciones únicas/múltiples.
ADP	
Prueba concentraciones más altas de lo normal en las concentraciones más bajas.	0,5 μ M -10 μ M - 5 μ M para comenzar, 2,0 μ M - 10 μ M.
EPI	
Prueba a con una sola concentración, dado que probar concentraciones mucho más altas, por lo general, no es útil.	0,5 - 10 μ M - 5 μ M para comenzar, 5 - 10 μ M.
COL (tipo 1 fibrilar)	
Probar concentraciones más altas de lo normal en las concentraciones más bajas.	1,5 μ g/ml - 2 μ g/ml para comenzar.
AA	
Probar una sola concentración.	0,5 - 1,6 mM. 0,5 - 1,64 mM.
Análogo de tromboxano U46619	
Probar una sola concentración.	1 - 2 μ M. 1 μ M.

Nota. Adaptado de *Platelets*, por A. Michelson, 2013, Academic Press.

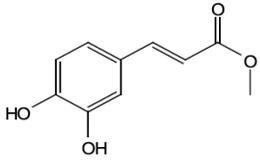
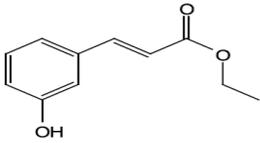
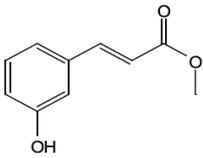
2 Metodología

En primer lugar, la parte experimental se realizó en el laboratorio de investigaciones en farmacología (código Hermes 193) del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la UNAL de Colombia.

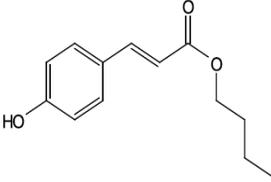
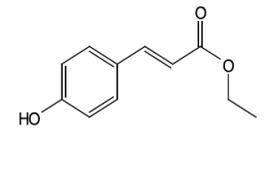
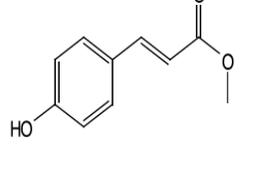
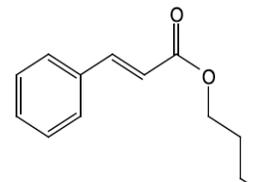
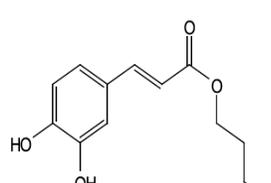
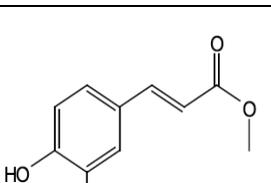
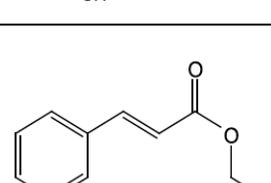
2.1 Derivados de AC obtenidos por semisíntesis

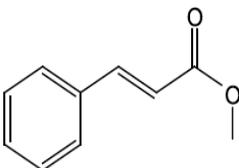
El Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB), del Departamento de Química, suministró los siguientes compuestos obtenidos por semisíntesis a partir de AC para realizar los ensayos de AP. (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Compuestos derivados de AC

Rótulo	Nombre	Molécula	Peso molecular (g)
DAC 01	3-(3-hidroxifenil) acrilato de butilo.		221.
DAC02	3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo.		197.
DAC03	3-(3-hidroxifenil) acrilato de metilo.		185.

46 Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis

DAC04	3-(4-hidroxifenil) acrilato de butilo.		221.
DAC05	3-(4-hidroxifenil) acrilato de etilo.		197.
DAC06	3-(4-hidroxifenil) acrilato de metilo.		185.
DAC07	Butil cinamato.		220.
DAC08	Cafetato de butilo.		222.
DAC09	Cafeato de metilo (CM).		186.
DAC10	Etil cinamato.		196.

DAC11	Metil cinamato.		184.
-------	-----------------	--	------

Los datos espectroscópicos de los compuestos (suministrados por el grupo de Investigación en QuiProNaB) fueron los siguientes (Tabla 2-2):

Tabla 2-2: Datos espectroscópicos de los derivados de AC

Rótulo	Nombre	Espectro
DAC 01	3-(3-hidroxifenil) acrilato de butilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.37 – 7.26 (m, 2H), 7.29 – 7.16 (m, 2H), 7.05 (t, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.42 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 1H), 4.09 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 1.71 – 1.57 (m, 2H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 0.93 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 3H).
DAC02	3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.37 – 7.26 (m, 2H), 7.29 – 7.16 (m, 2H), 7.05 (t, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.42 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 1H), 4.17 (q, <i>J</i> = 4.5 Hz, 2H), 1.26 (t, <i>J</i> = 4.5 Hz, 3H).
DAC03	3-(3-hidroxifenil) acrilato de metilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.36 – 7.26 (m, 2H), 7.29 – 7.16 (m, 2H), 7.05 (t, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.43 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H).
DAC04	3-(4-hidroxifenil) acrilato de butilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.54 – 7.46 (m, 2H), 7.44 (dt, <i>J</i> = 16.0, 0.6 Hz, 1H), 6.83 – 6.75 (m, 2H), 6.36 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 4.09 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 1.71 – 1.57 (m, 2H), 1.51 – 1.37 (m, 2H), 0.93 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 3H).
DAC05	3-(4-hidroxifenil) acrilato de etilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.54 – 7.46 (m, 2H), 7.44 (dt, <i>J</i> = 16.1, 0.7 Hz, 1H), 6.83 – 6.75 (m, 2H), 6.36 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 4.17 (q, <i>J</i> = 4.5 Hz, 2H), 1.26 (t, <i>J</i> = 4.5 Hz, 3H).
DAC06	3-(4-hidroxifenil) acrilato de metilo.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) δ 7.54 – 7.47 (m, 3H), 7.51 – 7.42 (m, 5H), 6.83 – 6.75 (m, 5H), 6.42 (d, <i>J</i> = 16.1 Hz, 2H), 3.66 (s, 7H).
DAC07	Butil cinamato.	¹ H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) data of butyl cinnamate was: δ (ppm) 7.69 (1H, <i>J</i> =15.8 Hz, d), 7.55–49 (2H, m), 7.40–7.32 (3H, m), 6.44 (1H <i>J</i> =15.8 Hz, d)
DAC08	Cafeato de butilo.	¹ H RMN (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>): δ H 2,29 (3H; s), 5,13 (2H; s), 6,30 (1H; d; <i>J</i> = 16,0 Hz), 6,75 (1H; d; <i>J</i> = 8,0 Hz), 7,00 (1H; dd; <i>J</i> = 8,2 Hz, 2,0 Hz), 7,06

		(1H; d; $J = 2,0$ Hz), 7,18 (2H; d; $J = 8,0$ Hz), 7,29 (2H; d; $J = 8,0$ Hz), 7,50 (1H; d; $J = 16,0$ Hz).
DAC09	Cafeato de metilo (CM).	^1H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>): 6.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.93 (1H, dd, $J = 8.0$ and $J = 2.0$ Hz, H-6), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.25 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 7.54 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7).
DAC10	Etil cinamato.	^1H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>) data of ethyl cinnamate was: δ (ppm) 7.69 (1H, $J = 15.8$ Hz, d), 7.54–7.50 (2H, m), 7.40–7.32 (3H, m), 6.44 (1H, $J = 15.8$ Hz, d), 4.26 (2H, q), 1.33 (3H, t).
DAC11	Metil cinamato.	^1H NMR (400 MHz, <i>Chloroform-d</i>): δ 3.78 (3H, s, OCH ₃), 3.90 (6H, s, OCH ₃), 6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, –CO–CH=), 6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Ar–H), 7.04 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, Ar–H), 7.10 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, Ar–H), 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz).

2.2 Materiales y reactivos

Los materiales utilizados fueron: (1) agregómetro de *Helena laboratories*, (2) Inductores de AP (AA, *Helena*® *Chrono-Log*®), EPI (*Helena*®), ADP (*AK scientific inc*®) y COL (*Helena*®), que se prepararon en agua destilada según lo dispuesto por los fabricantes. Los compuestos se diluyeron en DMSO, el cual no superó la concentración final de 0,1 % en PRP. El ASA se preparó a partir de una solución madre de 40 mg/ml (0,22 M). Los compuestos derivados de AC se diluyeron en DMSO a partir de una concentración madre de 40 mg/ml.

A continuación, se muestran las concentraciones finales en las celdas del agregómetro-agonistas (inductores de AP), vehículo (DMSO) y patrón (ASA) utilizados (Tabla 2-3).

Tabla 2–3: Reactivos y concentraciones finales

Reactivo	Concentración final
AA	500 μM
ADP	20 μM
EPI	300 μM
COL	10 $\mu\text{g/ml}$
ASA	200 $\mu\text{g/ml}$ (1,1mM)
DMSO	0,1 %

2.3 Preparación de las plaquetas

La sangre se obtuvo de voluntarios sanos entre 18 y 45 años con previo conocimiento informado (ver Anexo A), quienes no habían recibido ningún tipo de medicamento dentro de los 15 días antes de la recolección de la muestra y no tuvieran antecedentes de consumo de tabaco.

Se siguieron las recomendaciones para preservar la funcionalidad de las plaquetas durante la extracción de la sangre, por lo que se usó un torniquete apropiado, aguja de calibre >21 y se desecharon los primeros 2 ml extraídos, para minimizar el efecto de la tromboplastina tisular y evita la hemólisis. Las muestras de sangre se procesaron dentro de los siguientes 15 minutos de la venopunción. La manipulación de las cubetas y la mezcla con los reactivos se efectuó suavemente en todo momento (Linden et al., 2004).

La sangre total (20 ml) se recolectó en tubos al vacío que contenían citrato sódico al 3,2 % como anticoagulante, en una proporción de 9/1, se dejó reposar y luego se centrifugó durante diez minutos a 1500 rpm para obtener el PRP. Después, se efectuó una segunda centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, para obtener el PPP. Este se utilizó como blanco de absorción, por lo que se calibra el equipo a 100 % de transmitancia y 0 % de absorbancia.

2.4 Equipos y materiales

- Agregometro AggRAMTM1486 *Helena Laboratories*.
- Stir Bars AggRAMTMde *Helena Laboratories*.
- Tubos de silicona cubiertos de vidrio *Helena Laboratories*.
- Centrifuga *Hettich EBA 20*.
- Balanza.
- Congelador Biomédico *Panasonic MDF-U334-PA*.
- Imanes.
- Micropipeta 100 - 1000 μ L CALIBRA R 822 *Autoclavable de SOCOREX*.

- Micropipeta 20 - 100 μL *Transferpette R de BRAND*.
- Micropipeta 0,5 - 10 μL *ACURA R 825 Autoclavable de SOCOREX*.
- Puntas micropipetas 1000 μL , 100 μL , 10 μL .
- Tubos de laboratorio.

2.5 Protocolo experimental

Para la realización del ensayo del efecto de los compuestos sobre la AP se empleó la técnica LTA, conocida también como agregometría turbidimetría, basada en el método propuesto por Born y O'Brien (1960) (Michelson, 2013).

2.5.1 Fases del estudio

El estudio se planteó en dos fases: la primera, para efectuar el tamizado inicial de la actividad antiagregante de los compuestos planteados en los objetivos específicos de este estudio: CM (SM-01), cafeato de butilo (SM-02) y 3-(4-hidroxifenil) acrilato de butilo (SM-03), a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con los demás compuestos obtenidos por semisíntesis y suministrados por el grupo de investigación en QuiProNaB, del departamento de Química (ver Tabla 2-1), frente a los inductores de la AP: AA, ADP, EPI y COL; y, la segunda, para efectuar una curva concentración-respuesta de los compuestos de mayor interés observados en la fase 1.

- Primera fase

Se incubaron durante 15 minutos en cada cubeta del agregómetro 225 μL de PRP más 1,25 μL del compuesto, transcurrido ese tiempo se efectuó un minuto de la lectura y luego se agregaron 25 μL del inductor respectivo (AA 500 μM , ADP 20 μM , EPI 300 μM o COL 10 $\mu\text{g/ml}$), lo que efectuó el registro por 10 minutos adicionales. Como control positivo, se utilizó ASA (200 $\mu\text{g/ml}$); y como control negativo, DMSO (0,1 %).

- Segunda fase

Se efectuaron ensayos con los siguientes compuestos seleccionados a partir de los resultados de la fase 1 (ver Tabla 5-1): (1) 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, (2) cafeato de butilo y (3) metil cinamato a concentraciones de 0,1; 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, frente a AA

(el inductor de la agregación a partir del cual se observaron los mayores efectos) en las mismas condiciones experimentales señaladas en la primera fase.

2.6 Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio \pm error estándar (SEM) del porcentaje de AP de al menos tres réplicas por cada grupo. En la fase 1, se efectuó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) por cada inductor de la AP, seguido de la prueba de diferencias múltiples de Tukey, previa verificación de la homogeneidad de varianzas (prueba F) y de la distribución normal de los datos (prueba de Bartlett). Cuando estos supuestos paramétricos no se cumplieron, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, seguida de la prueba de diferencias de Dunn. Se asumió una $p < 0,05$ como significativa.

En la fase 2, y previo ANOVA uní factorial, se escogieron los tratamientos en los que se observó una relación concentración-respuesta para proceder a un análisis de regresión sigmoidea, esto con el fin de obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) con su respectivo intervalo de confianza y determinar la potencia de los compuestos de mayor interés. Para el análisis estadístico se utilizó el *software Prism 8.0* (GraphPad Inc., San Diego CA, EE. UU.).

2.7 Aspectos éticos

El desarrollo de estudio se consideró de riesgo mínimo, puesto que, según los términos de la Resolución 8430 de 1993:

Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes de extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml, en dos meses excepto durante el embarazo. (Artículo 11)

Para los fines de este estudio, se realizaron tres extracciones de sangre venosa periférica en pliegue con un volumen no mayor a 25 cc en total, previo consentimiento informado por escrito de cada donante. El trabajo siguió las disposiciones relativas de las

normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud contempladas en dicha resolución.

El proyecto estuvo sujeto también a las disposiciones del Sistema de Gestión Ambiental de la UNAL y a la Resolución 482 de 2009 de procedimientos para la Gestión Integral de los Residuos Hospitalarios y Similares. Los ensayos realizados no generaron ningún riesgo para el ambiente.

3 Resultados

3.1 Resultados fase I

En los experimentos con AA y EPI, como inductores de la AP, todos los compuestos arrojaron magnitudes de AP notablemente inferiores a la proporcionada por el control (vehículo) sin que difirieran de forma significativa entre sí y frente al patrón utilizado (ASA) (ver gráficas 3-1 y 3-2). En los experimentos en los que se utilizó ADP y COL como inductores, las diferencias fueron menores (ver gráficas 3-3 y 3-4).

Gráfica 3-1: Porcentaje de AP inducida por AA, 500 μ M, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml). * $p < 0,05$ frente al control. ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, $n > 3$

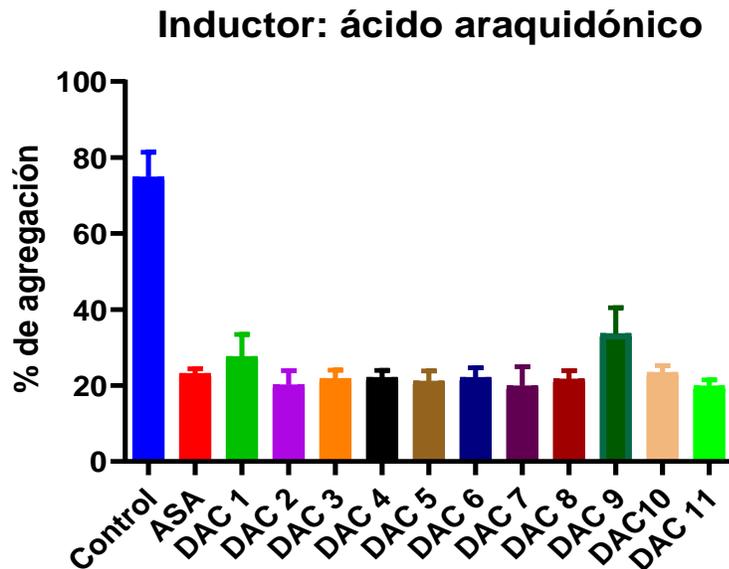
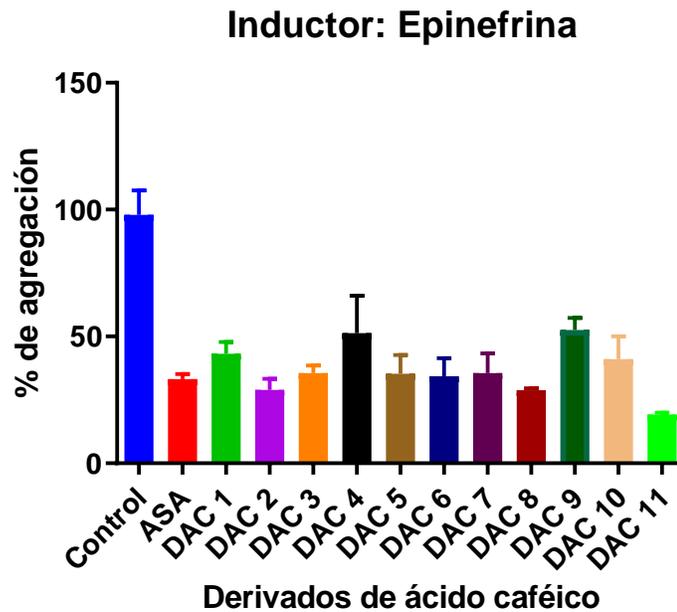


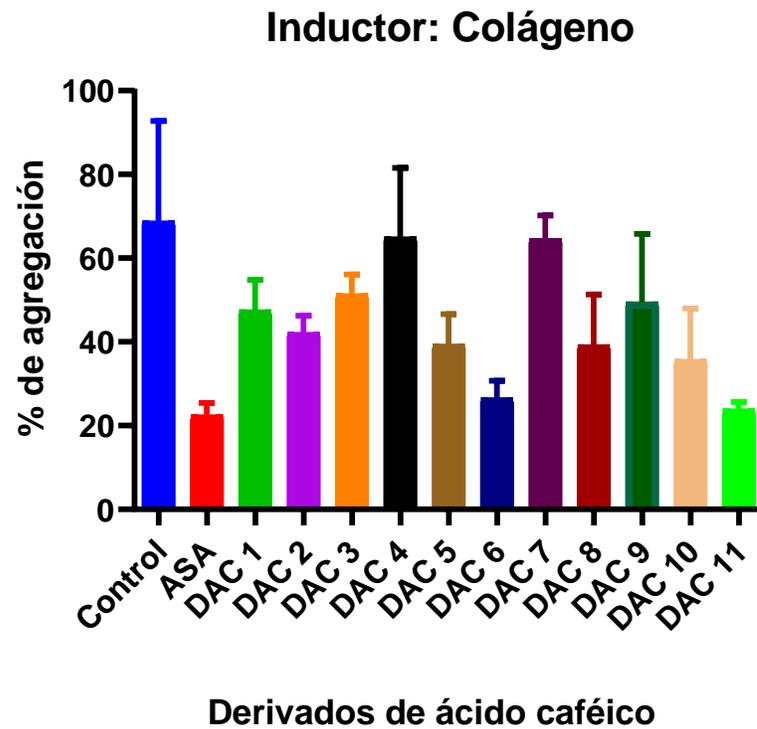
Tabla 3-1: Promedios de AP e intervalos de confianza de los derivados de AC, frente a AA

Compuesto	Promedio (%)	IC
Control	47	(47,00 - 58,17)
ASA	23,1	(20,72 - 25,61)
DAC01	27,6	(9,129 - 46,07)
DAC02	20,1	(3,969 - 36,30)
DAC02	21,8	(12,20 - 31,40)
DAC03	21,8	(12,20 - 31,40)
DAC04	22,1	(16,28 - 27,97)
DAC05	21,1	(12,29 - 29,91)
DAC06	22,1	(13,98 - 30,22)
DAC07	19,8	(-1,907 - 41,64)
DAC08	21,6	(14,59 - 28,76)
DAC09	33,6	(4,110 - 63,16)
DAC10	23,4	(15,50 - 31,30)
DAC11	19,8	(12,83 - 26,83)

Gráfica 3-2: Porcentaje de AP inducida por EPI, 300 μ M, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 μ g/ml), * $p < 0,05$ frente al control. ASA (agente de referencia) 200 μ g/ml, n: >3.



Gráfica 3-3: Porcentaje de AP inducida por COL, 10 µg/ml, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 µg/ml), *p<0,05 frente al control. ASA (agente de referencia) 200 µg/ml, n: >3



Gráfica 3-4: Porcentaje de AP inducida por ADP, 20 µg/ml, en presencia de los compuestos derivados de AC (DAC1 – DAC11, 200 µg/ml; ASA: agente de referencia), *p<0,05 frente al control 200 µg/ml, n: >3

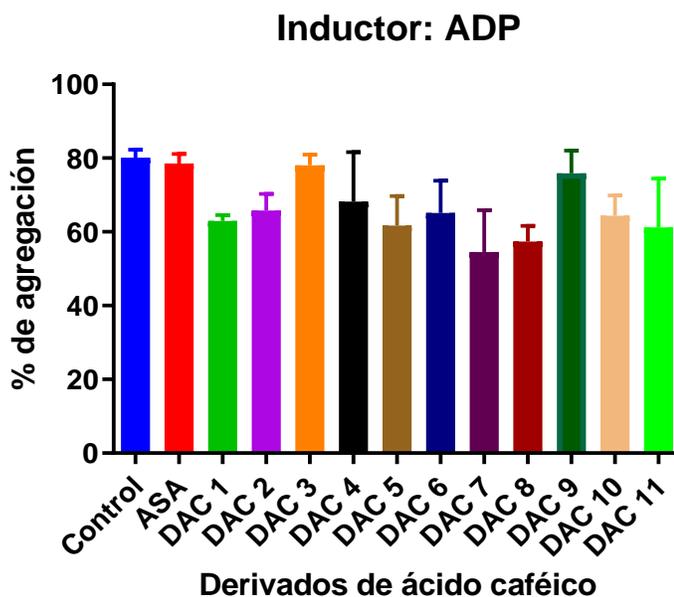


Tabla 3-2: Promedio de porcentaje de agregación máximo de los compuestos a los inductores de AP

Compuesto	Promedio AA	Promedio COL	Promedio ADP	Promedio EPI
DAC01	29,84	48,98	62,98	42,58
DAC02	19,58	41,88	64,98	28,8
DAC03	21,64	51,08	77,52	35,08
DAC04	22,31	63,24	69,52	56,94
DAC05	20,90	40,09	61,65	36,40
DAC06	22,52	26,39	62,46	33,54
DAC07	20,64	65,30	52,82	36,76
DAC08	22,18	40,37	57,50	28,93
DAC09	34,28	50,50	76,94	52,08
DAC10	23,3	37,74	63,82	39,90
DAC11	20,02	23,90	59,34	19,22

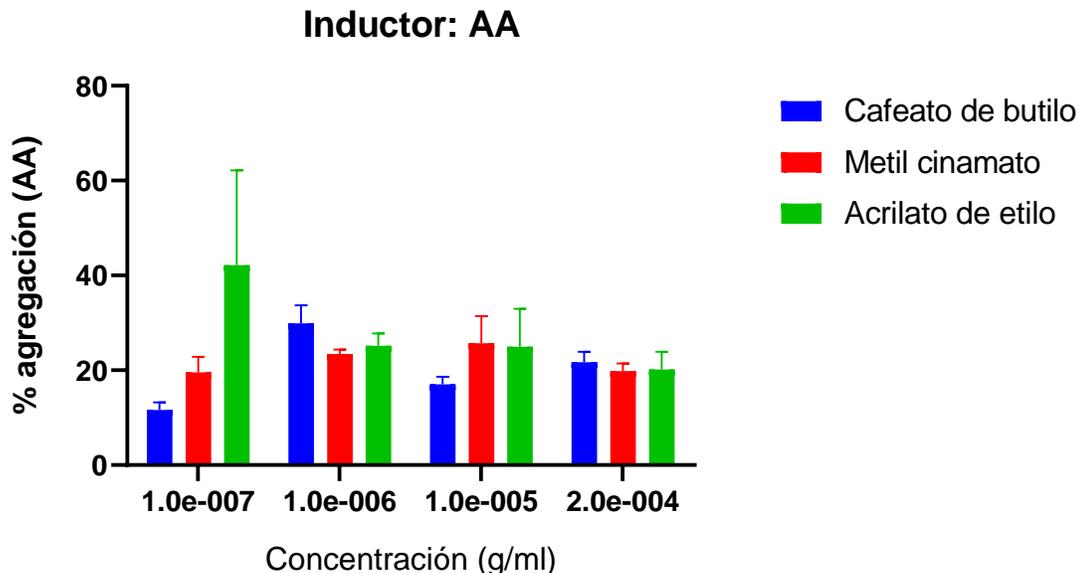
3.2 Resultados fase II

En esta fase se realizaron ensayos de tres compuestos seleccionados, al considerar los menores valores absolutos de los promedios alcanzados en la fase 1. Estos fueron: 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo (DAC02), cafeato de butilo (DAC08) y metil

cinamato (DAC11), que se sometieron a nuevos ensayos frente a AA (el agente inductor frente al cual se observaron los mayores efectos antiagregantes), a concentraciones de 0,1, 1 y 10 µg/ml.

Los resultados de la fase II permitieron confirmar el efecto antiagregante frente a AA de los compuestos mencionados, no obstante, solo se observó una relación concentración-respuesta en el caso de 3-3 (hidroxifenil) acrilato de etilo (ver gráfica 3.5). Por consiguiente, este único compuesto se sometió a un análisis comparativo de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) con el compuesto base a partir del que se efectuó la síntesis, ácido cafeico (AC), arrojando valores, expresados en unidades molares, de 0,6 µM que no difiere de manera significativa del proporcionado por AC, de 1,3 µM (ver gráfica 3.6 y Tabla 3-3).

Gráfica 3-5: Efecto concentración – respuesta de cafeato de butilo, metil cinamato y acrilato de etilo sobre el porcentaje de agregación plaquetaria inducido por AA (500 µM).



Gráfica 3-6: Curva concentración – respuesta de acrilato de etilo y ácido cafeico sobre el porcentaje de agregación plaquetaria inducido por AA (500 µM).

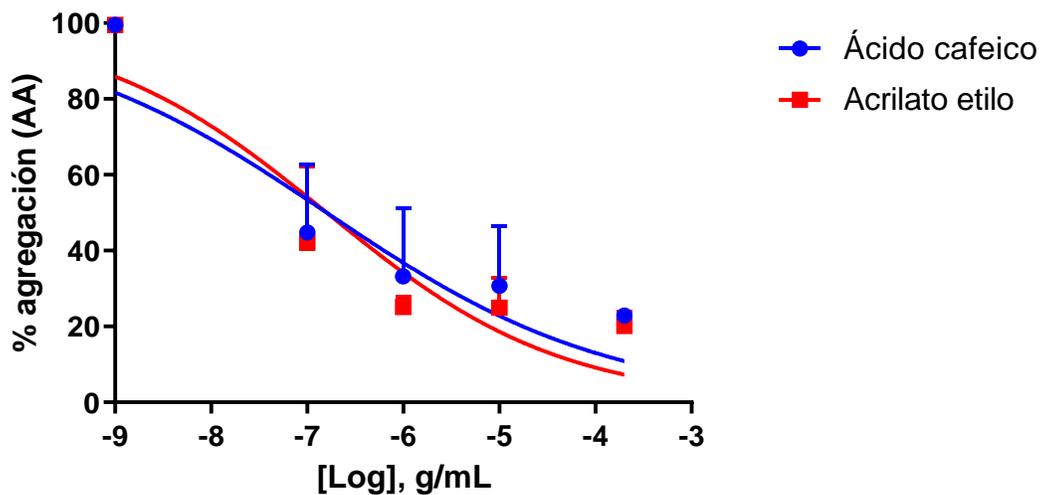


Tabla 3-3: Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de AC y 3-3 (hidroxifenil) acrilato de etilo frente a la agregación plaquetaria inducida por AA (500 μ M)

Compuesto	AC	3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo
LogEC50	-6,62 (-7,62 a -5,61)	-6,91 (-7,63 a -6,19)
CI_{50} (g/ml)	2,41E-07	1,22E-07
CI_{50} (M)	1,3E-06	6,2E-07

4 Discusión

Este estudio muestra que la obtención por semisíntesis, de derivados de AC, puede llevar a la consecución de compuestos que mantienen un perfil de tipo antiagregante plaquetario. Este interés surgió, en un principio, por la detección de efectos antiagregantes en el extracto total de *Solanum tuberosum* y luego del aislamiento de los compuestos polifenólicos AC y ACG como metabolitos activos (Buitrago et al., 2007; Buitrago, 2012; Buitrago et al., 2019). Si bien tales compuestos ejercen una actividad antiagregante significativa, la extensa biotransformación a la que se ven sometidos disminuye la cantidad de compuesto activo que llega a su sitio de acción. Por consiguiente, los derivados de AC obtenidos por semisíntesis, eventualmente podrían ser más resistentes a los mecanismos biotransformadores que se dan en el organismo, lo que tendría que examinarse en estudios posteriores.

La actividad antiagregante de los compuestos estudiados de este ensayo no se ha reportado en la literatura hasta ahora, por lo que se abre un campo de interés potencialmente terapéutico que amerita mayor investigación. Si bien solo se seleccionaron para los fines de esta investigación tres compuestos, cabe ampliar el estudio de otros derivados que arrojaron una notable actividad en el tamizado inicial.

El hecho de haber detectado al menos un compuesto: 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, que despliega un efecto antiagregante sobre la ruta del AA similar al ejercido por AC, permite plantear que este agente podría tener interés potencial en la búsqueda de compuestos derivados de metabolitos naturales activos en el campo de la terapia antiagregante plaquetaria, la cual tiene amplia cabida en el manejo de los trastornos aterotrombóticos.

Llama la atención que en algunos de los compuestos seleccionados para la fase 2 de este estudio (posterior al tamizado inicial) no se observó una relación concentración-respuesta. Esto podría explicarse, en parte, por una posible pérdida de selectividad sobre

la diana farmacológica responsable de la actividad antiagregante, tal y como acontece con el referente, ácido acetilsalicílico, que a bajas concentraciones inhibe selectivamente la ciclooxigenasa plaquetaria (COX-1), mientras que a mayores concentraciones actúa igualmente sobre la ciclooxigenasa endotelial (COX-2), cuando le resta eficacia antiagregante.

El notable efecto de los compuestos sobre el inductor de la agregación plaquetaria, ácido araquidónico (AA) sugiere un mecanismo de acción selectivo relacionado con la ruta metabólica ligado a la síntesis de prostaglandinas en la plaqueta, similar a como acontecería con ácido cafeico (AC), a diferencia de la ruta ligada a colágeno (glicoproteína VI) y la ligada a ADP (receptor P2Y₁₂), (Pyo et al., 2002) donde los efectos fueron menores.

No obstante, la revisión de la literatura sobre el AC señala que inhibe la síntesis de la 5- lipoxigenasa (5-LO), lo que puede explicar el efecto antiagregante, recordando que 5-LO cataliza dos pasos en la biosíntesis de leucotrienos (LT), un grupo de mediadores lipídicos de la inflamación derivados del AA. 5-LO es una enzima clave en la formación de leucotrienos proinflamatorios (LT), que desempeñan un papel importante en varias enfermedades inflamatorias (Hsiao et al., 2007).

La revisión de la literatura de ácido cafeico y derivados con respecto a al inductor de la agregación, colágeno (COL), muestra resultados variables, pero cabe destacar que un derivado de AC ha sido estudiado como antagonista selectivo sobre COL, el éster fenólico del AC (CAPE). Los autores atribuyen la actividad antiplaquetaria de CAPE a una interferencia directa con la unión de COL a sus receptores, integrina $\alpha_2\beta_1$ y GP VI en la membrana plaquetaria (Lu et al., 2015). Este podría ser el caso de algunos de los compuestos que presentaron actividad frente a COL en este estudio, planteamiento que requiere investigación adicional.

De los compuestos evaluados en este estudio, hasta donde se efectuó la revisión bibliográfica, el único que se menciona en la literatura con actividad antiagregante es el cafeato de metilo (CM), que inhibiría 5- lipoxigenasa (Pyo et al., 2002; Michelson, 2013). Tal efecto antiagregante se confirmó en este estudio por su actividad frente a AA, aunque no fue uno de los tres seleccionados en la fase 1 por presentar un promedio de agregación mayor (efecto antiagregante menor) que otros compuestos.

Por otro lado, conviene destacar los notables resultados obtenidos por los compuestos frente al inductor de la agregación plaquetaria, epinefrina (EPI). Considerando que EPI es un mediador clave en los eventos asociados a accidentes súbitos en individuos con enfermedad coronaria (EC), aparte de sus efectos proagregantes, agentes eficaces para inhibir la AP podrían constituirse en una fuente potencial en la búsqueda de alternativas para el manejo de los trastornos aterotrombóticos. Se requieren estudios adicionales para examinar el perfil que estos derivados podrían tener sobre esa diana farmacológica.

Conviene señalar las limitaciones de este estudio. Entre otros, su carácter preliminar en la búsqueda de nuevas fuentes basadas en derivados de moléculas de origen natural con posibles efectos antiagregantes, el bajo tamaño de muestra en los ensayos, lo que limitó la potencia para discriminar eventuales efectos significativos y la inevitable variabilidad interindividual entre los sujetos, dada su mayor o menor actividad de base sobre la agregación plaquetaria. Futuras investigaciones habrán de considerar el control más estricto de estas variables para ganar precisión y exactitud en los ensayos a realizar.

5 Conclusión

Modificaciones estructurales de AC han llevado a la obtención de compuestos que mantienen una actividad variable de tipo antiagregante plaquetaria vinculada con las rutas metabólicas ligadas a ácido araquidónico (AA) y epinefrina (EPI). Se destaca el compuesto 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, cuya potencia antiagregante es comparable a la obtenida con el compuesto fuente, ácido cafeico (AC), lo que genera interés como compuesto semisintético con potenciales efectos antiagregantes plaquetarios. Se requieren estudios adicionales para avanzar en el conocimiento del perfil antiagregante de este y otros derivados de AC obtenidos por semisíntesis.

6 Recomendaciones

- Efectuar estudios *in vivo* de la actividad antiagregante del compuesto semisintético 3-(3-hidroxifenil) acrilato de etilo, dado su perfil antiagregante comparable al obtenido con AC.
- Continuar los estudios de los compuestos contemplados en la fase 1 de esta investigación dada la notable respuesta frente a los inductores de AP, AA y EPI.
- Incluir en futuros análisis, otras variables como T_{\max} (tiempo máximo de acción) y AUC (área bajo la curva), para profundizar en el perfil antiagregante de los derivados de mayor interés.

7 Bibliografía

- Adem, Ş., Eyupoglu, V., Sarfraz, I., Rasul, A., Zahoor, A., Ali, M., & Elfiky, A. (2021). Caffeic acid derivatives (CAFDs) as inhibitors of SARS-CoV-2: CAFDs-based functional foods as a potential alternative approach to combat COVID-19. *Phytomedicine*, *85*, 153310. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153310>
- Alberto, M., Asensio, M., & Sánchez, A. (2018). Fisiología de la función plaquetaria. *Hematología*(22), 231-237. http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol22/sup/38_Fisiologia_de_la_funcion_plaquetaria.pdf
- Balachandrán, C., Duraipandiyan, V., Al-Dhabi, N., Balakrishna, K., Kalia, N., Rajput, V., . . . Ignacimuthu, S. (2012). Antimicrobial and Antimycobacterial Activities of Methyl Caffeate Isolated from *Solanum torvum* Swartz. Fruit. *Indian Journal of Microbiology*, *54*(4), 676-681. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0313-8>
- Bermejo, E. (2017). Plaquetas. *Hematología*, 10-18. <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf>
- Bhullar, K., Lassalle-Claux, G., Touaibia, M., & Rupasinghe, H. (2014). Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin–angiotensin–aldosterone system inhibition. *European Journal of Pharmacology*, *730*, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.038>
- Brass, L. (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest Journal*, *124*(3), 18S-25S. https://doi.org/10.1378/chest.124.3_suppl.18s
- Brass, L., Tomaiuolo, M., & Stalker, T. (2013). Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *27*(3), 381-409. <https://doi.org/10.1016/J.Hoc.2013.02.002>

- Buitrago, D. (2012). *Estudio de los mecanismos antihipertensivos y antiagregantes plaquetarios de los metabolitos secundarios obtenidos de Solanum tuberosum. [Tesis doctoral]*. Bogotá, D. C.: Universidad Nacional de Colombia.
- Buitrago, D., Puebla, P., & Guerrero, M. (2019). Antiplatelet activity of metabolites isolated from Solanum tuberosum. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38(8), 1575-1581.
- Buitrago, D., Ramos, G., Rincón, J., & Guerrero, M. (2007). Actividad antiagregante del extracto etanólico de Solanum tuberosum en plaquetas humanas. *Vitae*, 14(1), 49-54. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042007000100007
- Farndale, R. (2006). Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36(2), 162-165. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.016>
- Fitzgerald, G. (1991). Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American Journal of Cardiology*, 68(7), B11–B15. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90379-y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90379-y)
- Fontana, P. (2003). Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, 108(8), 989-995. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000085073.69>
- Geraldo, R., Sathler, P., Lourenço, A., Saito, M., Cabral, L. R., & Castro, H. (2014). Platelets: still a therapeutic target for haemostatic disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17901-17919. <https://doi.org/10.3390/ijms151017901>
- González, A, Bizarro P, Rojas M. (2019). El megacariocito: una célula muy original. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*; 62(1): 6-18. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.1.02>.
- Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic. *Role in Disease Pathogenesis*, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/781857>

- Gresele, P., Born, G., Patrono, C., & Page, C. (2012). *Antiplatelet agents*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5>
- Harrison, P. (2005). Platelet function analysis. *Blood Reviews*, 19(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002>.
- Hsiao, G., Lee, J., Lin, K., Shen, C., Fong, T., Chou, D., & Sheu, J. (2007). Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: In vitro and in vivo studies. *Cardiovascular Research*, 75(4), 782-792. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.005>
- Hung, C., Tsai, W., Kuo, L., & Kuo, Y. (2005). Evaluation of caffeic acid amide analogues as anti-platelet aggregation and anti-oxidative agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(5), 131791-131797. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.11.055>
- Jantas, D., Chwastek, J., Malarz, J., Stojakowska, A., & Lasoń, W. (2020). Neuroprotective effects of methyl caffeate against hydrogen peroxide-induced cell damage: involvement of caspase 3 and cathepsin D inhibition. *Biomolecules*, 10(11), 1530. <https://doi.org/10.3390/biom10111530>
- Jeske, W. (2020). Platelet production, structure, and function. *Rodak's Hematology*, 136-153. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00019-2>
- Kinra, M., Arora, D., Mudgal, J., Pai, K., Mallikarjuna, C., & Nampoothiri, M. (2019). Effect of caffeic acid on ischemia-reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Pharmacology*, 103(5-6), 315-319. <https://doi.org/10.1159/000497474>
- Koupenova, M., & Ravid, K. (2018). Biology of platelet purinergic receptors and implications for platelet heterogeneity. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00037>
- Kyung, M., Lee, Y., & Yun-Choi, H. (2002). Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata*. *Archives of Pharmacal Research*, 25(3), 325-328. <https://doi.org/10.1007/BF02976634>
- Lee, D., Kim, H., Cho, H., Bae, J., Yu, Y., & Park, H. (2014). Antiplatelet effects of caffeic acid due to Ca²⁺ mobilization inhibition via cAMP-dependent Inositol-1, 4, 5-Trisphosphate receptor phosphorylation. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 21(1), 23-37. <https://doi.org/10.5551/jat.18994>

- Lim, H., Kyu, P., Shin, Y. S., Yong, K., & Hyun, K. (2017). Methyl caffeate and some plant constituents inhibit age-related inflammation: effects on senescence-associated secretory phenotype (SASP) formation. *Archives of Pharmacal Pharmacal Research*, 40(4), 524-535. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0909-y>
- Linden, M., Frelinger, A., Barnard, M., Przyklenk, K., Furman, M., & Michelson, A. (2004). Application of flow cytometry to platelet disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30(5), 501-511. <https://doi.org/10.1055/s-2004-835671>
- Liu, Y. (2012). *Patente nº EP2640376A2*.
- Lu, Y., Li, Q., Liu, Y., Sun, K., Fan, J., Wang, C., & Han, J. (2015). Inhibitory effect of caffeic acid on ADP-induced thrombus formation and platelet activation involves mitogen-activated protein kinases. *Scientific Reports*, 5, 13824. <https://doi.org/10.1038/srep13824>
- Majithia, A., & Bhatt, D. (2019). Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39, 546–557. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310955>
- Michelson, A. (2013). *Platelets*. Academic Press.
- Ministerio de Salud. (1993). Resolución 8430 del 4 de octubre de 1993. [Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud]. Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
- Monteiro, K., Guimarães, R., Mosquera, L., Rocha, A., Machado, A., Bispo, A., . . . Chagas, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 541. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Monteiro, M., O'Connor, J., & Martínez, M. (2001). La citometría de flujo en el análisis de las plaquetas: (I) aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(3), 111-136. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000300002&lng=es

- Muhammad, N., Ahmad, F., Teoh, S., & Yahaya, M. (2021). Caffeic acid on metabolic syndrome: a review. *Molecules*, 26(18), 5490. <https://doi.org/10.3390/molecules26185490>
- Murugappan, S. (2006). The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 1977-1986. <https://doi.org/10.2741/1939>
- Offermanns, S. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, 99(12), 1293-1304. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000251742.713>
- Pyo, M., Lee, Y., & Yun-Choi, H. (2002). Anti-platelet effect of the constituents isolated from the barks and fruits of *Magnolia obovata*. *Archives of Pharmacal Research*, 25(3), 325-328. <https://doi.org/10.1007/bf0297663>
- Rajiv, G., Ignacimuthu, S., Paulraj, M., & Sasikumar, P. (2011). Antihyperglycemic activity and antidiabetic effect of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. fruit in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 670(2), 623-631. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.159>
- Sánchez-Arias, A., Bobadilla-Serrano, M., Dimas-Altamirano, B., Gómez-Ortega, M., & González-González, G. (2016). Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad. *Revista Mexicana de Cardiología*, 27(s3), s98-s102. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=66578>
- Silva, H., & Lopes, N. (2020). Cardiovascular effects of caffeic acid and its derivatives: a comprehensive review. *Frontiers in Physiology*, 11, 595516. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595516>
- Silva, T., Oliveira, C., & Borges, F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(11), 1257-1270. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.959492>
- Solla, I., Bembibre, L., & Freire, J. (2011). Manejo del Síndrome coronario agudo en Urgencias de Atención Primaria. *Cadernos de Atención Primaria*, 18(1), 49-55. https://www.agamfec.com/wp/wp-content/uploads/2014/07/18_1_actua_1.pdf
- Spencer, F., & Becker, R. (1997). Platelets: structure, function, and their fundamental contribution to hemostasis and pathologic thrombosis. In: Becker R.C. (eds). En R. Becker, *Textbook of coronary thrombosis and thrombolysis. Developments in cardiovascular medicine*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-585-33754-8_3

- Texas Heart Institute. (2020). *Enfermedad arterial coronaria*. Texas Heart Institute: <https://www.texasheart.org/heart-health/heartinformation-center/topics/enfermedad-arterial-coronaria/>
- Tyszka-Czochara, M., Bukowska-Strakova, K., Kocemba-Pilarczyk, K., & Majka, M. (2018). Caffeic acid targets AMPK signaling and regulates tricarboxylic acid cycle anaplerosis while metformin downregulates HIF-1 α -Induced glycolytic enzymes in human cervical squamous cell carcinoma lines. *Nutrients*, *10*(7), 841. <https://doi.org/10.3390/nu10070841>
- Van der Meijden, P., & Heemskerk, J. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, *16*, 166-179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., & Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *28*(3), 403-412. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.150474>
- Veeran, B., Bringart, M., Turpin, C., Rondeau, P., Planesse, C., Ait-Arsa, I., & Bascands, J. (2021). Caffeic acid, one of the major phenolic acids of the medicinal plant *antirhea borbonica*, reduces renal tubulointerstitial fibrosis. *Biomedicines*, *9*(4), 358. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040358>
- Wang, A., Leible, M., Lin, J., Weiss, J., & Zhong, Q. (2020). Caffeic acid phenethyl ester loaded in skim milk microcapsules: physicochemical properties and enhanced in vitro bioaccessibility and bioactivity against colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(50), 14978-14987. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05143>

8 Anexos

Anexo A. consentimiento informado

Consentimiento informado

Bogotá D.C. ____ de ____ del 2021

Yo _____ Identificado con cedula de ciudadanía número _____ de _____ Autorizo la extracción de 21 ml de sangre por punción venosa de la vena cefálica. Con el propósito de realizar lo ensayos de agregación plaquetaria de la tesis **Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria de compuestos derivados de ácido cafeico obtenidos por semisíntesis,** a cargo de la estudiante Jessyca Paola Rodríguez Castiblanco, quien realizará la extracción de sangre.

Declaro que he sido informado de los posibles riesgos que trae la extracción de la muestra de sangre sobre mi salud y bienestar

He sido informado a cerca de la confiabilidad de mis datos personales. Estos serán protegidos de acuerdo a lo que dispone la ley ~~LEY~~ ESTATUTARIA 1581 DE 2012. y el derecho a conocer los datos de la investigación.

A partir de lo anterior OTORGO mi Consentimiento para la extracción de sangre y mis datos sean utilizados para fines de la culminación de la parte experimental de la tesis.

Nombre:

Cedula:

Anexo B. Análisis estadístico de derivados de AC frente a AA

ANALISIS ESTADISTICO FRENTE AA	Contro l	ASA	DAC1	DAC2	DAC3	DAC4	DAC5	DAC6	DAC7	DAC8	DAC 9	DAC 10	DAC 11
<i>Number of values</i>	28	37	4	3	3	4	4	4	3	4	3	3	3
<i>Minimum</i>	21,3	13,4	21,4	12,7	17,6	18,2	14,9	17,4	13,7	17,9	23,7	20	17,6
<i>25 % percentile</i>	23,45	19,5	21,45	12,7	17,6	18,9	15,68	17,83	13,7	18,28	23,7	20	17,6
<i>Median</i>	32,35	21,3	22	22,9	22,6	21,65	21,6	21,05	16	20,4	30,4	23,9	18,9
<i>75 % percentile</i>	79,68	25,6	39,35	24,8	25,2	25,83	26,03	27,43	29,9	26,35	46,8	26,3	23
<i>Maximum</i>	102,8	48	45	24,8	25,2	27	26,3	28,9	29,9	28	46,8	26,3	23
<i>Mean</i>	47	23,16	27,6	20,13	21,8	22,13	21,1	22,1	19,87	21,68	33,63	23,4	19,83
<i>Std. Deviation</i>	28,8	7,334	11,61	6,507	3,863	3,673	5,535	5,104	8,765	4,454	11,88	3,18	2,818
<i>Std. Error of mean</i>	5,442	1,206	5,804	3,757	2,23	1,836	2,767	2,552	5,06	2,227	6,862	1,836	1,627
<i>Lower 95 % CI of mean</i>	35,84	20,72	9,129	3,969	12,2	16,28	12,29	13,98	-1,907	14,59	4,11	15,5	12,83
<i>Upper 95 % CI of mean</i>	58,17	25,61	46,07	36,3	31,4	27,97	29,91	30,22	41,64	28,76	63,16	31,3	26,83
<i>Sum</i>	131,6	857,1	110,4	60,4	65,4	88,5	84,4	88,4	59,6	86,7	100,9	70,2	59,5
<i>D'Agostino and Pearson normality test</i>													
<i>K2</i>	7,101	26,23	<i>N too small</i>										
<i>P value</i>	0,0287	<0,0001											
<i>Passed normality test (alpha=0,05)?</i>	<i>Not</i>	<i>Not</i>											
<i>P value summary</i>	*	****											
<i>Shapiro-Wilk normality test</i>													
<i>W</i>	0,7919	0,805	0,662	0,864	0,9678	0,9697	0,8878	0,936	0,854	0,889	0,945	0,9815	0,9178
<i>P value</i>	<0,000	<0,000	0,004	0,28	0,6556	0,8394	0,3728	0,63	0,2513	0,379	0,546	0,7391	0,4445

Anexo C. Reporte de hemograma de voluntarios sanos

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia	
HEMATOLOGIA				
Hemograma (hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios, leucograma, recuento de plaquetas, índices plaquetarios)				
GLOBULOS BLANCOS				
RECUESTO DE LEUCOCITOS CH	* 16.58	10 ³ /uL	4.6	10.2
NEUTROFILOS %	* 91.90	%	34	88
NEUTROFILOS	* 15.23	10 ³ /uL	1.6	8.9
LINFOCITOS %	* 3.10	%	10	50
LINFOCITOS	0.51	10 ³ /uL	0.5	5.1
MONOCITOS %	* 4.30	%	0.4	4
MONOCITOS	* 0.72	10 ³ /uL	0	0
EOSINOFILOS %	0.60	%	0	4.0
EOSINOFILO	0.10	10 ³ /uL		
BASOFILOS %	0.10	%	0.1	1
BASOFILO	0.02	10 ³ /uL	0.0	0.20
DIFERENCIAL MANUAL				
NEUTROFILOS	86	%		
LINFOCITOS	9	%		
MONOCITOS	5	%		
GLOBULOS ROJOS				
RECUESTO GLOBULOS ROJOS	4.80	10 ⁶ u/L	4.20	5.40
HEMOGLOBINA	* 14.80	g/dL	12	14
HEMATOCRITO	* 45.60	%	36	42
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VMC)	93.10	fL	80	99
HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM)	10.20		27	31
CONCEN. CORPUSCU. MEDIA DE Hb (CMH)	* 32.40	g/dL	33	37
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS	12.70	%	11.0	16.0
COEFICIENTE DE VARIACION	42.50	fL	35.0	56.0
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS				
DESVIACION ESTANDAR				
PLAQUETAS: Recuento Automatizado	382	10 ³ /uL	140	450
VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO	10.20	fL	7.2	11.1
PLAQUETOCRITO	0.39			
PORCION DE MACROTROMBOCITOS	26.70	%	11.0	45.0
RECUESTO DE MACROTROMBOCITOS	* 102.00	10 ⁹ /L	30	90
ANCHO DE DISTRIBUCION PLAQUETARIO PDW	* 15.70	%	11.5	14.3

SUBRED INTEGRADA DE SERVICIOS DE SALUD NORTE E.S.E. LABORATORIO CLINICO

10270079

Fecha de Ingreso: 27-oct-2021 2:31 am
 Fecha de Impresión: 27/10/2021 02:53:00a.m.
 Edad: 28 Años 0 Meses 8 Dias Sexo: F
 Telefono:
 Medico:
 Cama:

Q: [REDACTED] **YESSYCA PAOLA**
 P: [REDACTED]
 Documento: [REDACTED]
 E.P.S: SANITAS EPS S.A.-ENTIDAD PROMOTORA DE SALUD - R
 Sede: UMNES Simón Bolívar
 Servicio: URGENCIAS

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia	
HEMATOLOGÍA				
Hemograma (hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios, teosograma, recuento de plaquetas, índices plaquetarios)				
GLOBULOS BLANCOS				
RECuento DE LEUCOCITOS CH	* 15.17	10 ³ /uL	4.6	10.3
NEUTROFILOS %	73.30	%	34	88
NEUTROFILOS	* 10.80	10 ³ /uL	1.6	8.9
NEUTROFILOS %	21.30	%	10	50
LINFOCITOS %	3.23	10 ³ /uL	0.5	5.1
LINFOCITOS	* 6.00	%	0.4	4
MONOCITOS %	* 0.92	10 ³ /uL	0	0
MONOCITOS	1.00	%	0	4.0
EOSINOFILO %	0.15	10 ³ /uL		
EOSINOFILO	0.40	%	0.1	1
BASOFILO %	0.07	10 ³ /uL	0.0	0.20
BASOFILO				
DIFERENCIAL MANUAL				
NEUTROFILOS	76	%		
LINFOCITOS	18	%		
MONOCITOS	6	%		
GLOBULOS ROJOS				
RECuento GLOBULOS ROJOS	4.98	10 ⁶ u/L	4.20	5.40
HEMOGLOBINA	* 14.10	g/dL	12	14
HEMATOCRITO	* 42.90	%	36	42
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VMC)	86.20	fL	80	99
HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM)	28.40		27	31
CONCEN. CORPUSCU. MEDIA DE Hb (CCMH)	33.00	g/dL	33	37
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS:	13.00	%	11.0	16.0
COEFICIENTE DE VARIACION	36.90	fL	35.0	56.0
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS:				
DESVIACION ESTANDAR	329	10 ³ /uL	140	450
PLAQUETAS: Recuento Automatizado	8.80	fl	7.2	13.1
VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO	0.29			
PLAQUETOCITO	17.60	%	11.0	45.0
PORCION DE MACROTRONBOCITOS	58.00	10 ⁹ /L	30	90
RECuento DE MACROTRONBOCITOS	* 15.70	%	11.5	14.5
ANCHO DE DISTRIBUCION PLAQUETARIO PDW				

Examen	Resultado	Unidades	Valores de Referencia	
HEMATOLOGIA				
Hemograma (hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, índices eritrocitarios, leucograma, recuento de plaquetas, índices plaquetarios)				
GLOBULOS BLANCOS				
RECuento DE LEUCOCITOS CH	9.11	10 ³ /uL	4.6	10.2
NEUTROFILOS %	60.80	%	42	85
NEUTROFILOS	5.53	10 ³ /uL	1.7	8.7
LINFOCITOS %	28.10	%	10	50
LINFOCITOS	2.56	10 ³ /uL	0.4	5.1
MONOCITOS %	* 4.40	%	0.4	4
MONOCITOS	* 0.40	10 ³ /uL	0	0
EOSINOFILOS %	* 6.10	%	0	4.0
EOSINOFILO	0.56	10 ³ /uL		
BASOFILOS %	0.60	%	0.1	1
BASOFILOS	0.06	10 ³ /uL	0.0	0.20
DIFERENCIAL MANUAL				
GLOBULOS ROJOS				
RECuento GLOBULOS ROJOS	4.59	10 ⁶ u/L	4.50	6.10
HEMOGLOBINA	14.00	g/dL	14	16
HEMATOCRITO	43.20	%	42	48
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VHC)	94.10	fL	80	99
HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM)	30.60		27	31
CONCEN. CORPUSCU. MEDIA DE Hb (CCMH)	* 32.50	g/dL	33	37
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS:	13.40	%	11.0	16.0
COEFICIENTE DE VARIACION				
ANCHO DE LA DISTRIBUCION DE ERITROCITOS:	43.10	fL	35.0	56.0
DESVIACION ESTANDAR				
PLAQUETAS: Recuento Automatizado	378	10 ³ /uL	140	450
VOLUMEN PLAQUETARIO MEDIO	7.80	fL	7.2	11.1
PLAQUETOCRITO	0.30			
PORCION DE MACROTROMBOCITOS	11.20	%	11.0	45.0
RECuento DE MACROTROMBOCITOS	42.00	10 ⁹ /L	30	90
ANCHO DE DISTRIBUCION PLAQUETARIO PDW	* 15.30	%	11.5	14.5