



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Evaluación de las interacciones  
de metabolitos polifenólicos obtenidos de  
*Solanum tuberosum* sobre la actividad  
antiagregante plaquetario del ácido  
acetil salicílico**

**Angelica Natali Moreno Tristancho**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
Agosto, 2023



# **Evaluación de las interacciones de metabolitos polifenólicos obtenidos de *Solanum tuberosum* sobre la actividad antiagregante plaquetario del ácido acetil salicílico**

**Angelica Natali Moreno Tristancho**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias - 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 D. C., Colombia

Agosto, 2023





*A mi familia, por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional en cada uno de los momentos de mi desarrollo profesional.*

*A mi pareja, por su comprensión y por creer en mí cuando más lo necesite.*

*A mis amigos por cada pequeño y gran aporte en estos momentos de mi vida.*



# Agradecimientos

Expreso mi gratitud hacia mi docente y mentor, Mario Francisco Guerrero Pabón, por orientarme en el sendero del conocimiento, compartir su sabiduría, brindarme su tiempo, por su voluntad, sencillez y comprensión en todo momento.

De manera muy especial a mis compañeras de Laboratorio Adriana Pardo y Jessyka Rodríguez, y demás compañeros que conocí a lo largo de mi trayectoria en la maestría por brindarme su ayuda en el desarrollo del posgrado y la parte experimental de este trabajo.

Quiero expresar mi agradecimiento a los voluntarios sanos que con su aporte hicieron viable realizar el análisis de las muestras de sangre que fueron fundamentales para concluir este trabajo.

A la Facultad de Ciencias y al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por darme la oportunidad de ser estudiante de esta importante Universidad.



## Resumen

La combinación de terapias es una estrategia terapéutica que puede ser altamente efectiva en el ámbito clínico, puesto que los fármacos empleados en asociación pueden mejorar la respuesta farmacológica y, al mismo tiempo, posibilitan la disminución de las dosis y el riesgo de posibles efectos secundarios (Yang et al., 2014). Teniendo en cuenta este enfoque, es apropiado investigar o explorar nuevas opciones terapéuticas que contribuyan a disminuir el impacto de las enfermedades trombóticas en la salud pública. Terapias basadas en fuentes naturales podrían ofrecer metabolitos activos que, al interactuar de manera sinérgica, proporcionen nuevas posibilidades de terapias combinadas al nivel farmacológico.

En este estudio, se analizó el efecto antiagregante de los polifenoles previamente identificados en *Solanum tuberosum*, ácido cafeico (AC) y ácido clorogénico (ACG) en ausencia y en combinación de concentraciones crecientes de ácido acetil salicílico (ASA), frente al agonista ácido araquidónico (AA), en plasma rico en plaquetas de voluntarios sanos, utilizando la técnica espectrofotométrica de Born, que se basa en la cinética de la agregación plaquetaria analizada por turbidimetría. El agregómetro, permitió observar los cambios en la transmisión de luz en el plasma sanguíneo después de la incubación con los reactivos de prueba y el agente inductor de la agregación plaquetaria ácido araquidónico (AA), de tal modo, el aumento en el porcentaje de agregación plaquetaria se hizo evidente mediante el incremento en la transmisión de luz a través de la celda, debido a que las plaquetas se agregaron y sedimentaron en el fondo del recipiente.

Considerando que el ácido cafeico y el ácido clorogénico, son metabolitos activos con actividad antiagregante plaquetaria presentes en *Solanum tuberosum*, en este trabajo se propuso estudiar las posibles interacciones que ejercen cuando se combinan con el fármaco de referencia, ácido acetilsalicílico, uno de los agentes más utilizados en clínica. El objetivo era determinar si podrían ejercer efectos coadyuvantes como antiagregantes, lo que eventualmente podría ser útil en la terapéutica o la prevención de trastornos aterotrombóticos.

Los resultados, en las condiciones experimentales fijadas en este trabajo, mostraron efectos dependientes de la concentración de ácido cafeico y ácido clorogénico, con concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) de  $1 \times 10^{-3}$ , y  $3,4 \times 10^{-4}$  M respectivamente, mientras que con ASA, en el rango de concentraciones probado, se observó un efecto antiagregante que disminuye al incrementar su concentración (desde  $5,5 \times 10^{-5}$  hasta  $1,6 \times 10^{-3}$  M), lo cual es consistente con su mecanismo de acción, antiagregante a bajas concentraciones y proagregante a mayores concentraciones.

Al examinar la interacción de ácido cafeico (en el rango de concentraciones  $1,5 - 3,0 \times 10^{-4}$  M) con ASA ( $5,5 \times 10^{-6}$  M), se observó un incremento del efecto antiagregante que disminuye en función de la concentración, mientras que la interacción de ácido clorogénico (en el rango  $2,26 \times 10^{-4} - 5,6 \times 10^{-3}$  M) con ASA ( $5,5 \times 10^{-6}$  M), no arrojó incremento del efecto antiagregante, sino más bien, una disminución en función de la concentración.

Al examinar la interacción de las combinaciones de ácido cafeico ( $1 \times 10^{-3}$ , -  $2 \times 10^{-3}$  M) con ASA ( $5,5 \times 10^{-5}$  -  $1,6 \times 10^{-3}$  M) y ácido clorogénico ( $2,26 \times 10^{-4}$  -  $5,6 \times 10^{-4}$  M), con la herramienta "Combeneft" aplicando el modelo de sinergia de Loewe, no se observó una zona consistente de concentraciones que muestren sinergia o inhibición.

En conclusión, se confirman efectos antiagregantes en función de la concentración con los compuestos polifenólicos ácido cafeico y ácido clorogénico, un efecto antiagregante de ASA que disminuye en función de la concentración y una interacción que sugiere efecto sinérgico con ácido cafeico; no obstante, se requiere ampliar el tamaño de muestra y el rango de concentraciones para identificar el rango apropiado de concentraciones de estos compuestos que ejerzan posibles efectos sinérgicos cuando se combinan con ASA.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, antiagregante plaquetario, sinergia, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido acetilsalicílico.



## Abstract

Combination therapy is a therapeutic strategy that can be highly effective in the clinical setting, since drugs used in association can improve the pharmacological response and, at the same time, make it possible to reduce doses and the risk of possible side effects (Yang et al., 2014). Considering this approach, it is appropriate to investigate or explore new therapeutic options that contribute to decrease the impact of thrombotic diseases on public health. Therapies based on natural sources could offer active metabolites that, when interacting synergistically, provide new possibilities for combination therapies at the pharmacological level.

In this study, the antiaggregation effect of the polyphenols previously identified in *Solanum tuberosum*, caffeic acid and chlorogenic acid, in the absence and in combination with increasing concentrations of acetylsalicylic acid (ASA), was analyzed against the agonist arachidonic acid (AA), in platelet-rich plasma from healthy volunteers, using the Born spectrophotometric technique, which is based on the kinetics of platelet aggregation analyzed by turbidimetry (Born, 1962). The aggregometer allowed observing the changes in light transmission in the blood plasma after incubation with the test reagents and the platelet aggregation-inducing agent arachidonic acid (AA), so that the increase in the percentage of platelet aggregation was evident by the increase in light transmission through the cell, due to the platelets aggregating and settling at the bottom of the vessel.

Considering that caffeic acid and chlorogenic acid are active metabolites with antiplatelet aggregation activity present in *Solanum tuberosum*, in this work we proposed to study the possible interactions that they exert when combined with the reference drug, acetylsalicylic acid, one of the most widely used agents in clinical practice. The objective was to determine whether they could exert coadjuvant effects as antiaggregants, which could eventually be useful in the therapy or prevention of atherothrombotic disorders.

The results, under the experimental conditions set in this work, showed concentration-dependent effects of caffeic acid and chlorogenic acid, with effective concentrations 50 (IC50) of  $1 \times 10^{-3}$  and  $3,4 \times 10^{-4}$  M, respectively, while with ASA, in the range of concentrations tested, an antiaggregant effect was observed that decreases with increasing concentration (from  $5,5 \times 10^{-5}$  to  $1,6 \times 10^{-3}$  M), which is consistent with its mechanism of action, antiaggregant at low concentrations and proaggregant at higher concentrations.

When examining the interaction of caffeic acid (in the concentration range  $1.5 - 3.0 \times 10^{-4}$  M) with ASA ( $5.5 \times 10^{-6}$  M), an increase in the antiaggregation effect was observed that decreased with concentration, while the interaction of chlorogenic acid (in the range  $2.26 \times 10^{-4} - 5.6 \times 10^{-3}$  M) with ASA ( $5.5 \times 10^{-6}$  M) did not show an increase in the antiaggregation effect, but rather a dose-dependent decrease.

In conclusion, concentration-dependent antiaggregation effects are confirmed with the polyphenolic compounds caffeic acid and chlorogenic acid, a dose-dependent decreasing antiaggregation effect of ASA, and an interaction suggesting synergistic effect with caffeic acid; however, the sample size and concentration range need to be expanded to identify the appropriate range of concentrations of these compounds that exert possible synergistic effects when combined with ASA.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, antiplatelet, synergism, chlorogenic acid, caffeic acid, acetylsalicylic acid.



## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Esquema de la producción de plaquetas .....	28
Figura 2. Estructura química ácido clorogénico .....	41
Figura 3: Estructura del ácido cafeico .....	42
Figura 4: Estructura del ácido acetilsalicílico .....	44
Figura 5: Matriz generada por <i>CombeneFit</i> empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ASA y ácido cafeico .....	62
Figura 6: Matriz generada por <i>CombeneFit</i> empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ASA y ácido clorogénico .....	63

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Concentraciones <i>M</i> usadas de los polifenoles de prueba.....	52
Tabla 2: Concentraciones <i>en</i> usadas de los polifenoles de prueba.....	53
Tabla 3: Concentraciones cuyo % de agregación máximo alcanzó entre el 20 al 80%.....	53
Tabla 4: Concentración inhibitoria 50 (CI50) de AC y ACL frente a la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4} M$ ).....	58
Tabla 5: Combinaciones de ASA +ACL usadas en la fase II del estudio. ....	59
Tabla 6 : Combinaciones de ASA +AC usadas en la fase II del estudio.....	59



## Lista de gráficas

	Pág.
<b>Gráfica 1. Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido cafeico y ácido clorogénico sobre la agregación plaquetaria inducida por AA (<math>5 \times 10^{-4} \text{M}</math>).....</b>	<b>57</b>
<b>Gráfica 3. Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido cafeico en presencia y ausencia de ASA 5.5 E-6 sobre la agregación plaquetaria inducida por AA (<math>5 \times 10^{-4} \text{M}</math>).....</b>	<b>60</b>
<b>Gráfica 4. Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido clorogénico en presencia y ausencia de ASA 5.5 E-6 sobre la agregación plaquetaria inducida por AA (<math>5 \times 10^{-4} \text{M}</math>).....</b>	<b>61</b>

## Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>AA</b>	Ácido araquidónico.
<b>AC</b>	Ácido cafeico.
<b>ACL</b>	Ácido clorogénico.
<b>ASA</b>	Ácido acetilsalicílico.
<b>AP</b>	Agregación plaquetaria.
<b>CE50</b>	Concentración Efectiva cincuenta
<b>CI50</b>	Concentración Inhibitoria cincuenta
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2.
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa-1.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EC</b>	Enfermedad coronaria.
<b>GMP c</b>	Guanosín monofosfato cíclico.
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato.
<b>Min Salud</b>	Ministerio de Salud y Protección Social
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PPP</b>	Plasma pobre en plaquetas.
<b>PRP</b>	Plasma rico en plaquetas.
<b><i>S. tuberosum</i></b>	<i>Solanum tuberosum</i>
<b>TVP</b>	Trombosis venosa profunda
<b>TXA2</b>	Tromboxano A2





## Introducción

Las plaquetas son fragmentos celulares derivados de los megacariocitos que desempeñan un papel crucial como el primer componente hemostático en áreas dañadas del sistema vascular. No obstante, también están involucradas en eventos patológicos de trombosis que pueden dar lugar a complicaciones graves como infarto de miocardio, enfermedades cerebrovasculares y trombosis en vasos periféricos (Goodman & Gilman, 2012).

Las enfermedades cardiovasculares más frecuentes son la enfermedad coronaria (EC) y la enfermedad cerebrovascular, que engloba la cardiopatía coronaria afectando los vasos sanguíneos del corazón, así como las enfermedades cerebrovasculares que afectan los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro. También se incluyen las arteriopatías periféricas, que afectan los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores (Min Salud)

La enfermedad cardiovascular (EC) se ubica entre las afecciones más prevalentes a nivel mundial y sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en individuos mayores de 35 años, mostrando una tendencia ascendente en su incidencia. Con aproximadamente 1.8 millones de fallecimientos al año, la EC constituye alrededor del 20 % de todas las defunciones en Europa, con notables variaciones entre los distintos países (Solla et al., 2011). En Estados Unidos, según la American Heart Association International (AHA), en 2017, las muertes atribuibles a enfermedades cardiovasculares superaron las 801,000, representando así una de cada tres muertes (Solla et al., 2011).

Existen diversas estrategias para reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En lo que respecta a la prevención secundaria, se emplean diferentes fármacos, entre los cuales podemos mencionar el grupo de los antiplaquetarios, los cuales son utilizados en el manejo de situaciones como el infarto agudo de miocardio, enfermedades cerebrovasculares y trombosis arterial en general. Dentro de este grupo farmacológico, encontramos inhibidores de fosfodiesterasa, como el Dipyridamol; inhibidores de receptores de ADP, como ticlopidina, clopidrogel y prasugrel; el inhibidor de

la ciclooxigenasa, como el ácido acetilsalicílico; y los antagonistas de receptor GPIIb – IIIa, como el tirofiban, abciximab y aptifibatide. Estos fármacos desempeñan un papel clave en la reducción de los riesgos asociados a estas condiciones cardiovasculares.

En los últimos años, se ha observado un aumento significativo en el uso de materia vegetal o de origen natural o para la prevención, tratamiento y manejo de diversas patologías, incluidas las enfermedades cardiovasculares, en diferentes partes del mundo. Este fenómeno ha llevado a una mayor investigación de compuestos activos específicos derivados de estas especies. Esta tendencia está respaldada por la comprensión de que los compuestos sintéticos pueden provocar diversas reacciones adversas o efectos no deseados a corto y largo plazo. Aunque es importante destacar que muchos fármacos en la actualidad tienen su origen en especies vegetales, lo que resalta relevancia y la promesa de la investigación en este campo.

En las últimas décadas, ha crecido el interés en el potencial terapéutico de las plantas medicinales en general, las cuales han sido utilizadas desde los inicios de la historia humana. La investigación en este campo se ha desarrollado de la mano con los avances de la medicina moderna. Según estimaciones actuales, aproximadamente un tercio de los medicamentos utilizados en la práctica clínica proviene de fuentes naturales, incluyendo compuestos aislados de estas fuentes o compuestos sintéticos o semisintéticos derivados de modificaciones estructurales de compuestos naturales (Ulrich-Merzenich, 2014).

Dado el impacto significativo de las enfermedades cardiovasculares y sus complicaciones, es crucial continuar investigando nuevas fuentes de medicamentos o enfoques terapéuticos alternativos que reduzcan los efectos secundarios y mejoren la eficiencia del tratamiento antiplaquetario. Entre estas opciones, las plantas y sus metabolitos, como el ácido clorogénico, han sido objeto de estudio en la presente investigación (Buitrago cl., 2019). Se ha encontrado que el ácido cafeico y ácido clorogénico, presentes en especies vegetales como la papa (*Solanum tuberosum*), la berenjena, la alcachofa y las manzanas verdes, tienen actividad antiagregante y propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiasmáticas y anticancerígenas (de Alencar Silva et al., 2020).

Mediante estudios fitoquímicos, se han aislado de *Solanum tuberosum*, los polifenoles ácido cafeico y ácido clorogénico, ensayos realizados en plaquetas humanas, han demostrado que dichos compuestos presentan actividad antiplaquetaria, disminuyendo la

Agregación (Camilo & Castillo,; Marcela & Ramírez, 2011). Sin Embargo, las interacciones que estos compuestos ejercen en combinación con el antiagregante Ácido Acetil salicílico (ASA) no han sido dilucidadas hasta la fecha.

*Solanum tuberosum* podría ser considerada como una fuente natural con potencial antiagregante, no solo debido al efecto independiente de cada metabolito activo, sino también por posibles interacciones, ya sean aditivas o sinérgicas, entre los componentes de esta especie. La naturaleza de estas interacciones con el ASA y su impacto en la potencia y eficacia de la respuesta farmacológica de *S tuberosum* aún no ha sido determinada ni cuantificada hasta el momento, y este es el objetivo central de la presente investigación.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de los compuestos polifenólicos principales de *S. tuberosum* sobre la actividad antiagregante del ácido acetil salicílico

### **Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de los compuestos ácido cafeico y ácido clorogénico sobre la actividad antiagregante del ácido acetilsalicílico frente al ácido araquidónico.
- Determinar interacciones de tipo sinérgico aditivo o inhibitorio entre estos metabolitos y ácido acetilsalicílico frente a ácido araquidónico.

## 1.1 Marco teórico

### 1.1 Las plaquetas

Las plaquetas son fragmentos celulares derivados de los megacariocitos, cuyos precursores son las proplaquetas, las cuales carecen de núcleo, pero poseen orgánulos típicos como mitocondrias, y son ampliamente conocidas por su alta reactividad. Se producen en la médula ósea y, más recientemente, se ha demostrado que también en el pulmón. Permanecen en la circulación sanguínea entre 5 a 7 días aproximadamente, y su papel es crucial en los vasos, ya que resultan indispensables para procesos como la hemostasia, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la inflamación y la inmunidad innata. Estas funciones vitales son mediadas por una variedad de factores de señalización y moléculas de adhesión, entre las cuales se encuentran proteínas de adhesión, receptores de plaquetas y factores de crecimiento. Además, se ha evidenciado que las plaquetas cumplen otros roles en la regulación del crecimiento tumoral. Comprender estos mecanismos y procesos resulta fundamental para abordar la fisiopatología de los trastornos cardiovasculares trombóticos y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

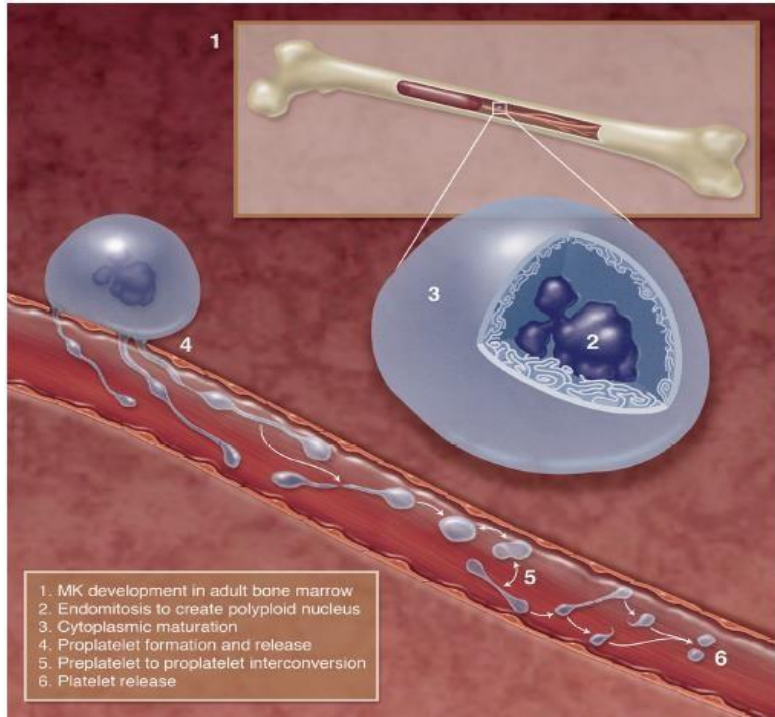
Las plaquetas, presentan las siguientes características: un diámetro medio de 2 a 5  $\mu\text{m}$  y un grosor de 0,5  $\mu\text{m}$ . En condiciones normales, el organismo de un individuo contiene un número de 150 a 350  $\times 10^9$  de estas células con un volumen celular de 6 a 10  $\text{fl}^9$ . Diariamente, se forman aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  plaquetas en el cuerpo humano gracias al proceso de megacariocitopoyesis. Este proceso, de complejidad controlada por factores de transcripción, crecimiento de quimiocinas y otras citocinas, implica interacciones de numerosas moléculas y células,



cada una con un papel importante en el control de las distintas fases (Van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Cada megacariocito maduro puede dar origen entre 1000-3000 plaquetas, aunque otros estudios informan que este número puede ser hasta 5000. Para la formación y liberación de plaquetas, los megacariocitos se vuelven poliploides por edomitosis (replicación del ADN sin división celular). Posteriormente, pasan por un proceso de maduración en el cual la mayoría de su citoplasma se empaqueta en muchos procesos largos llamados proplaquetas, y el núcleo se extruye. Además, un megacariocito puede generar de 10 a 20 proplaquetas.

A medida que las plaquetas se desarrollan, reciben su contenido de gránulos y orgánulos como corrientes de partículas individuales transportadas desde el cuerpo celular del megacariocito. La formación de las plaquetas puede dividirse en 2 fases: la primera fase de maduración y desarrollo de megacariocitos en donde ocurre una proliferación nuclear masiva y un agrandamiento del citoplasma por proteínas citoesqueléticas y gránulos específicos de las plaquetas. La segunda fase puede completarse en un par de horas, durante esta segunda parte, los megacariocitos generan plaquetas remodelando su citoplasma en proplaquetas que sufren eventos de fisión posteriores y así generar la forma de disco de la plaqueta, se dice que el tiempo para que los megacariocitos completen la poliploidización es de 5 días en humanos (Machlus & italiano, 2013).

**Figura 1:** Esquema de la producción de plaquetas

Nota. Tomado de “The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation”, por K Machlus, J Italiano, 2013, J Cell Biol (EEUU.) 786. (<https://doi.org/10.1083/jcb.201304054>).

## 1.2 Funciones de las plaquetas

Como se mencionó anteriormente, las plaquetas cumplen diversas funciones, entre las cuales destacan su participación en la hemostasia, la coagulación, la angiogénesis y su papel en la inmunidad innata. Es importante señalar que, al ser anucleadas, las plaquetas no contienen ADN, pero sí ARN, así como otros orgánulos de almacenamiento y gránulos que se regulan dinámicamente durante su función plaquetaria.

Las plaquetas desempeñan un papel crucial en la hemostasia, a través de un complejo proceso que involucra distintas fases: adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria. En condiciones normales, las plaquetas no entran en contacto con el tejido conectivo del subendotelio vascular. Sin embargo, cuando se produce daño en el vaso, se

exponen proteínas de la matriz subendotelial, lo que desencadena la interacción de las plaquetas con estas sustancias para lograr su adhesión y activación (Harrison, 2005).

Las plaquetas contribuyen significativamente a la hemostasia a través de un complejo proceso que consta de distintas fases. La primera fase, conocida como fase vascular, se subdivide en dos etapas importantes. En primer lugar, se presenta la vasoconstricción, que tiene como objetivo reducir el flujo sanguíneo en el sitio del daño para concentrar la sangre “estancada” en el área de lesión y facilitar la localización de materiales necesarios para la coagulación. Además, esta vasoconstricción ejerce presión para disminuir la cantidad de fuerza que experimenta el vaso sanguíneo.

La segunda fase de la hemostasia implica la intervención de las plaquetas, quienes desempeñan un papel fundamental. Durante esta etapa, las plaquetas facilitan la acción de factores necesarios dentro del sistema de coagulación, llevando a cabo su activación. Asimismo, se unen entre sí para formar un tapón plaquetario, es decir, una agregación, con el fin de detener el sangrado. Por último, las plaquetas se adhieren tanto al vaso sanguíneo lesionado como al espacio subendotelial, asegurando una intervención oportuna y eficaz.

Durante el proceso de activación, las plaquetas desempeñan un papel fundamental al proporcionar cofactores utilizados en el sistema de coagulación. Este proceso, a su vez, está mediado por la interacción de cuatro eventos principales: el flujo de calcio intracelular, la translocación negativa de fosfolípidos, la liberación de gránulos  $\alpha$  y el cambio de forma. Estos procesos ocurren en paralelo y se abordarán en detalle más adelante.

En relación a la fase de agregación, la cual puede definirse como la capacidad de las plaquetas para adherirse entre sí, el principal protagonista de este proceso es la integrina  $\alpha IIb\beta 3$ . Al igual que otros receptores, su afinidad aumenta en presencia de calcio, y su ligando es el fibrinógeno. Cuando se produce esta unión, se generan cambios estructurales y la adhesión se vuelve irreversible. (Harrison, 2005)

La adhesión mayormente está relacionada con el colágeno que se está en el espacio subendotelial y dentro de las capas de los vasos sanguíneos gracias al factor de von Willebrand (vWF) el cual está presente en gran concentración tanto en el plasma como en las plaquetas.

También en estudios recientes se ha comprobado que los trombocitos desempeñan un rol en algunos procesos inflamatorios, al igual que otros elementos de la cascada de coagulación, este rol es el de la activación/localización de la cascada del complemento, importante participante de las reacciones inmunitarias innatas (Harrison, 2005).

En cuanto a la coagulación dentro de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas se encuentra el 20% de del factor V de la coagulación, a pesar de ser un porcentaje no representativo, es el casi todo el factor que se usa durante la coagulación y es proporcionado por las plaquetas (Rubenstein & Yin, 2018).

### 1.3 Estructura y fisiología de la plaqueta

Para entender más fácilmente la estructura de las plaquetas, hablaremos o describiremos cuatro zonas, una zona periférica, una zona sol-gel, una de orgánulos y una de sistemas de membrana.

En la zona periférica, encontramos una glicocálix que contiene glicoproteínas de superficie indispensables para la interacción de las plaquetas con la pared del vaso durante el daño, la actividad plaquetaria y la retracción del coágulo. En esta zona, se expresan los receptores de GPIIb – IX- V y la integrina  $\alpha II\beta 3$ , cuya función fue expuesta con anterioridad. Posterior a esta glicocálix, se encuentra una bicapa lipídica, similar a la de otros tipos de células, que también posee factor tisular. Al activarse, este se une a factores de coagulación y a la fosfatidilserina superficial. Otros elementos importantes que encontramos cerca de esta bicapa lipídica son los finos filamentos de actina, también conocidos como "el citoesqueleto contráctil de la membrana", que son indispensables en el funcionamiento de la plaqueta. En conjunto, todo lo anteriormente mencionado participa en el proceso de señalización y, a su vez, en la activación plaquetaria (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014).

La zona sol gel, es descrita por autores como la matriz transparente del interior de la plaqueta, esta zona posee microtúbulos, microfilamentos, glucógeno, vesículas y orgánulos secretores, la disposición de los microtúbulos se encuentra en forma de espiral cerca a la pared celular, con esta disposición se crea un sistema que sostiene al esqueleto contráctil de la membrana, la actina en microfilamentos da forma al esqueleto citoplasmático, lugar en dónde encontraremos los orgánulos, asimismo separa los

orgánulos entre sí y de la pared celular del trombocito en reposo. La contracción de la actina ocurre tras la activación plaquetaria, para posteriormente gracias a este movimiento dar paso a la secreción del contenido de los gránulos  $\alpha$  a través del sistema canalicular abierto (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014).

Las plaquetas poseen tres tipos de orgánulos secretor primordiales: los gránulos  $\alpha$ , los gránulos densos y los lisosomas. Entre ellos, los gránulos  $\alpha$  son los más abundantes y contienen el vWf, proteínas como el factor V de coagulación y la P-selectina, junto con otras proteínas captadas por las plaquetas. El segundo orgánulo es el gránulo denso, más pequeño que los gránulos  $\alpha$ , que contiene pirofosfato, calcio, magnesio, serotonina y nucleótidos como ATP y ADP (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014).

Además de estos orgánulos, las plaquetas contienen mitocondrias, que desempeñan un papel fundamental en los procesos energéticos. También se encuentran los lisosomas, cuyo papel en la activación plaquetaria aún no está claro. Dentro de esta zona de orgánulos, se identifica un lisosoma que contiene glucógeno, con una forma similar a la de los gránulos  $\alpha$ . Por otro lado, las mitocondrias están siendo objeto de estudio para determinar si también contribuyen con la aportación de calcio a las plaquetas (Gremmel et al., 2016).

Considerando los sistemas de membrana como parte de la estructura de las plaquetas podemos decir que están comprendidos por: aparatos de Golgi, el sistema canalicular abierto conectado a la superficie, el sistema tubular denso y el retículo endoplasmático rugoso.

El sistema canalicular abierto es una extensión de la membrana superficial, que se dispone hacia adentro del trombocito y forma una estructura tubular. Tiene varias funciones destacables: la primera es transportar fibrinógeno a los  $\alpha$  gránulos, mientras que la segunda función es que pueden utilizarse como vía para la liberación del contenido de los gránulos en la activación plaquetaria. Además, estos sistemas pueden evaginarse y proporcionar segmentos de membrana útiles para la diseminación plaquetaria tras la adhesión posterior al daño del vaso. Dentro de este sistema, las plaquetas también poseen un sistema tubular denso, el cual se considera un residuo del retículo endoplasmático liso del megacariocito.

### 1.3.1 Gránulos plaquetarios

Los gránulos  $\alpha$  son las estructuras más abundantes en las plaquetas, presentando un promedio de 50 a 80 por célula. En cuanto a su tamaño, son relativamente grandes, con un diámetro que oscila entre 200 y 500 nm, adoptando formas redondas u ovaladas. Estos gránulos almacenan proteínas solubles asociadas a la membrana, tales como P-selectina, fibrinógeno soluble y factor de von Willebrand (vWF). Estas sustancias son fundamentales para procesos importantes como la adhesión, la coagulación, la inflamación y la defensa del huésped. Cabe destacar que se han identificado tres clases distintas de estos gránulos, cada una con diferentes cargas y funciones específicas. Además, los gránulos  $\alpha$  poseen pequeñas vesículas y pueden ser liberados tras la activación de las plaquetas. (Chen et al., 2018).

Relacionando el número de gránulos  $\alpha$  con el de gránulos densos en la plaqueta, podemos decir que el número de estos últimos es mucho menor, cada plaqueta puede contener tan solo de 6 a 8 unidades, con un diámetro de 150nm, los gránulos densos, son orgánulos relacionados con el lisosoma y no con la red trans Golgi como los gránulos  $\alpha$ , y si relacionamos su contenido, se vuelve más denso con el paso del tiempo además contienen serotonina, calcio, pirofosfato y un grupo de nucleótidos de adenina no metabólicos de ADP y ATP indispensables en la activación de las plaquetas, puesto que la serotonina y el ADP se comportan como agonistas y ayudan a la activación de las plaquetas para que se recluten en el lugar del daño del tejido (Bermejo E., 2017).

El tercer tipo de orgánulos que podemos encontrar en las plaquetas son los lisosomas, de los cuales al revisar bibliografía no se encuentra tanta información comparada con la información sobre los dos anteriores orgánulos citados, los lisosomas plaquetarios contienen enzimas digestivas que pueden degradar y reciclar macromoléculas y productos celulares dañados, a su vez, en las plaquetas pueden regular el proceso de activación al liberar enzimas que modulan esta función ayudando a prevenir la formación de coágulos sanguíneos innecesarios. (Gremmel et al., 2016)

## 1.4 Activación plaquetaria

La activación plaquetaria abarca los pasos que atraviesan los trombocitos para proporcionar los cofactores necesarios para el proceso de la coagulación, como enunciamos anteriormente este proceso se subdivide en cuatro fases: el flujo del calcio intracelular, la translocación negativa de los fosfolípidos, la liberación de gránulos  $\alpha$  y el cambio de forma de la plaqueta.

Mediante bombas de calcio, se mantiene baja la concentración de calcio del citosol de la plaqueta como en la mayoría de las células, y principalmente en los gránulos densos que contienen isoformas del retículo sarcoendoplasmático calcio adenosina trifosfatasa (SERCA) las cuales utilizan energía de la escisión del ATP en ADP para mover el calcio en contra del gradiente de concentración, gracias estas bombas SERCA en el gránulo denso la concentración de calcio se mantiene en un rango de 100nmol/L, pero solo un mínimo porcentaje se secreta al exterior de la plaqueta, en el momento que ocurre un estímulo activador la concentración de calcio del citosol aumenta gracias a la liberación de calcio reservado en los gránulos densos, conviene señalar que recientes investigaciones han señalado mecanismo de retroalimentación positiva como mecanismo para mantener las concentraciones de calcio al interior de la célula (Jm, 2017)

La distribución de fosfolípidos en la membrana plaquetaria es mayormente simétrica en estado de reposo, excepto por la fosfatidilserina. Esta molécula posee una red de carga negativa debido a las cargas negativas presentes en el grupo fosfato y en el aminoácido serina. Gracias a esta característica, se une al calcio y proporciona una superficie donde se asocian residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico presentes en muchas proteínas de coagulación. Esto facilita la interacción de proteínas de coagulación y la localización de plaquetas procoagulantes (Trostchansky et al., 2019).

La translocación de fosfolípidos depende de ATP y es regulada por la fosfatidilserina, que se mantiene simétricamente en la valva interior de la membrana en estado de reposo. La scramblasa, una proteína responsable de equilibrar los fosfolípidos a través de la membrana celular por carga, se activa en presencia de un aumento de calcio citosólico. Es importante mencionar que la translocación de fosfolípidos es un proceso reversible, y si el

calcio intracelular regresa a condiciones basales, la distribución de fosfolípidos se restablece (Trostchansky et al., 2019).

La tercera fase de la actividad plaquetaria implica la liberación de gránulos  $\alpha$ , que contienen diversos agonistas como el ADP, el factor V de la coagulación y otras sustancias mencionadas anteriormente. Estos gránulos también albergan dos proteínas específicas de plaquetas: el factor plaquetario 4 y la  $\beta$ -tromboglobulina. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a la heparina y neutralizar sus propiedades anticoagulantes. Además, el fibrinógeno y el vWF son proteínas con características adhesivas y desempeñan un rol importante en la agregación y adhesión plaquetaria. Se expresan de manera similar en el sitio dañado del vaso, y su liberación a través de los gránulos  $\alpha$  es esencial para las reacciones secundarias que ocurren en el proceso de agregación y adhesión (Trostchansky et al., 2019).

Como última fase, pero recordando que todas estas pueden ocurrir en paralelo, ocurre el cambio de forma en las plaquetas, el cual favorece la adhesión, activación y agregación, la forma normal de las plaquetas es remplazada por una forma irregular con varios filopodios delgados y largos creados por la polimerización veloz de actina en fibras delgadas y largas que abracan micras desde el centro de la plaqueta hacia el exterior.

Gracias a esta polimerización, se producen cambios en la estructura de la membrana plaquetaria. Estos cambios afectan la necesidad de crear nuevos fosfolípidos para compensar la expansión de la membrana. En este momento, el sistema canalicular abierto cumple un papel fundamental al suministrar los fosfolípidos necesarios que se exteriorizan en la membrana. Asimismo, el sistema tubular denso también contribuye, aunque en menor medida, al proporcionar un sitio para la nueva membrana durante el cambio de forma de las plaquetas (Trostchansky et al., 2019).

Estos ajustes en la estructura de la membrana tienen un efecto positivo en el proceso. Por un lado, la exteriorización del sistema canalicular abierto aumenta rápidamente el número



de proteínas de adhesión, lo que facilita el contacto entre plaquetas y, a su vez, favorece la agregación plaquetaria. Por otro lado, el cambio de forma de las plaquetas resulta en un aumento en el área de superficie, lo que es esencial para inducir reacciones de coagulación y, finalmente, convertir el fibrinógeno en fibrina insoluble.

## 1.5 El ácido araquidónico como agonista plaquetario

El ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado ampliamente presente en las células, desempeña un papel crucial como precursor de sustancias biológicamente activas, incluyendo las prostaglandinas, los leucotrienos y el tromboxano. Estos autacoides desempeñan funciones vitales en procesos como la hemostasia primaria y la aterotrombosis, siendo el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) de especial relevancia. En el contexto de este estudio, se investigará interacciones de dos metabolitos secundarios presentes en *Solanum tuberosum* y el inhibidor selectivo de TXA<sub>2</sub>, el ácido acetil salicílico.

Cuando los fosfolípidos son estimulados, el ácido araquidónico es producido por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Posteriormente, sufre diversos procesos, incluida la oxidación a través de la enzima ciclooxigenasa (COX), lo que lo convierte en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Gracias a la presencia de la TXA<sub>2</sub> sintasa, PGH<sub>2</sub> se transforma en el poderoso mediador proagregante conocido como TXA<sub>2</sub>. Esta molécula tiene la capacidad de ser liberada y, a su vez, inducir la agregación plaquetaria, un aspecto fundamental en la regulación de la coagulación y la respuesta a daños vasculares (Trostchansky et al., 2019).

## 1.6 Patología de la agregación plaquetaria

La principal causa de muerte en el mundo son las enfermedades crónicas no transmisibles cómo lo son las enfermedades cardiovasculares, dentro de estas enfermedades tenemos:

eventos cerebrovasculares, el infarto agudo de miocardio y la enfermedad cardiovascular. Dentro de las causantes de dichas patologías tiene participación la formación de trombos en placas ateroscleróticas lo cual a su vez está relacionado con la trombogenicidad de las placas ateroscleróticas, la hemorragia local y los factores proinflamatorios (Goodman & Gilman, 2012)

La ruptura de la placa aterosclerótica provoca el contacto sanguíneo con un núcleo necrosado, desencadenando la formación de trombos. Estos trombos se desarrollan a partir de plaquetas agregadas en condiciones de flujo alto y de fibrina de otras células sanguíneas. La activación plaquetaria ocurre en el sitio de las placas alteradas y es el paso principal hacia la formación del trombo. Durante esta activación, se liberan agonistas como ADP, serotonina y TXA<sub>2</sub>, lo que lleva a una auto amplificación y propagación del trombo. Además, en combinación con la acción de otros factores como los complejos del factor Tisular (FT/FVII), la activación de los receptores activados por proteinasas (PAR) afecta diversos agentes biológicos no hemostáticos. Estos procesos también interactúan en el desarrollo del daño vascular y en la fisiología de la enfermedad aterosclerótica, entre otras implicaciones.

Cuando inicia la desgranulación, su activación continúa en un ciclo de retroalimentación positiva. El difosfato de adenosina (ADP) liberado de los gránulos densos se une a los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> en la membrana plaquetaria, lo que desencadena la expresión del receptor GPIIb/IIIa. Esta incorporación reciente del receptor plaquetario, junto con el TXA<sub>2</sub> producido por la enzima ciclooxigenasa plaquetaria, permite la agregación plaquetaria (AP). El factor de interacción de los gránulos alfa actúa como enlace entre los receptores GPIIb/IIIa en diferentes plaquetas (Varga-Szabo et al., 2008)

También existen pruebas de que las plaquetas activadas, contribuyen a otras enfermedades fisiopatológicas, como la trombosis arterial, la venosa, la trombocitopenia inducida por heparina, el cáncer y la drepanocitosis, a través del desprendimiento de micropartículas plaquetarias, según estudios, (Yeung et al., 2018) estas micropartículas pueden suprimir o aumentar la capacidad metastásica de las células tumorales.

La trombosis arterial se inicia tras el daño en el endotelio vascular por la ruptura de la placa aterosclerótica, en condiciones de alta velocidad de cizallamiento, y así activarse y agregarse gracias a la interacción entre el vWF, el colágeno y los receptores GPVI, estas

uniones inducen una cascada de señalización conduce a la activación de la integrina IIIb3, al mismo tiempo se observa un aumento de la afinidad por las proteínas de adhesión vWF, fibrinógeno, fibrina y fibronectina, estos procesos conllevan a que las plaquetas conformen agregados con otras plaquetas activas y así se promueve la creación del trombo. Resultado de esto también es una retroalimentación positiva tras la liberación de agonistas como ADP,  $TxA_2$ , para continuar con la agregación a través de sus GPCR, quienes por otra parte inician señalización intracelular, incluida la aparición de segundos mensajeros como DAG (diacilglicerol), e IP3 (inositol trifosfato), culminando en diseminación y activación plaquetaria y el por consiguiente el crecimiento del trombo. (Yeung et al., 2018)

La trombosis venosa, que incluye la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar, se ha asociado tradicionalmente con la triada de OW (hipercoagulabilidad, alteraciones del flujo sanguíneo y disfunción endotelial). Sin embargo, se ha pasado por alto el papel de las plaquetas como factor determinante en este tipo de trombosis. Con el tiempo, estudios experimentales han demostrado el papel relevante de las plaquetas en la trombosis venosa profunda. Se ha observado un aumento de las micropartículas (MP) en pacientes con TVP, especialmente en pacientes oncológicos.

Asimismo, los estudios sobre el uso de fármacos antiplaquetarios, como el clopidogrel y el ácido acetilsalicílico, en modelos animales han mostrado la reducción de los trombos venosos. Además, investigaciones como ASPIRE y WARFASA han proporcionado evidencia sobre la eficacia de los antiagregantes al final de la anticoagulación inicial, lo que ha llevado a una disminución en la tasa de TVP (Yeung et al., 2018).

Las plaquetas desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria, y esta participación puede tener consecuencias complejas que van desde la protrombosis hasta una respuesta plaquetaria disminuida que conlleva a la hemorragia.

En este contexto, las plaquetas expresan receptores como los Toll-like Receptors (TLR), que reconocen y se unen a patógenos, activando así la respuesta inmune. También poseen receptores Fc gamma que utilizan células inmunitarias para inducir respuestas plaquetarias y actúan como un puente de comunicación con otras células mieloides. Un ejemplo de esto es la endotoxina de bacterias Gram negativas, la cual juega un papel importante en la sepsis al activar el TLR tipo 4 en neutrófilos y plaquetas, lo que puede

inducir la formación de agregados plaquetarios-neutrófilos y trampas extracelulares de neutrófilos conocidas como "Netosis". Sin embargo, este proceso puede tener resultados perjudiciales, ya que la activación de neutrófilos provocada por las plaquetas puede causar lesiones en el hospedador (Yeung et al., 2018).

Además, estudios in vivo en ratones han demostrado que la activación de TLR4 induce trombosis vascular y provoca trombocitopenia, entre otras complicaciones. Además, se ha observado que las plaquetas también tienen un papel en el síndrome urémico hemolítico.

## 1.7 *Solanum tuberosum*

Se ha documentado que *Solanum tuberosum*, también conocida como papa, fue encontrada en América del Sur, específicamente en Bolivia, hace aproximadamente entre 10,000 y 7,000 años. Aunque su primer hallazgo ocurrió al sur de Lima, existen diferentes opiniones sobre su procedencia, y se sugiere que sus orígenes se remontan al altiplano de Perú-Bolivia (Lim & Lim, 2016)

En todo el mundo, alrededor de 95 países están involucrados en la producción de papas, alcanzando un valor total de aproximadamente \$13 mil millones de dólares. El género *Solanum* comprende más de mil especies, y dentro de él, la subsección papa engloba todas las papas con tubérculos. Esta subsección se divide en varias series, y entre ellas, la serie tuberosa es relevante para el presente documento, donde se encuentran aproximadamente 54 especies, tanto silvestres como cultivadas, entre las que destaca *S. tuberosum*.

*S. tuberosum* se subdivide en dos subespecies: *tuberosum* e *andigena*. La subespecie *tuberosum* es ampliamente cultivada en regiones como América del Norte y Europa. Mientras tanto, la subespecie *andigena* también es cultivada, aunque se limita principalmente a América Central y del Sur (OFDE, 2021).

La papa (*Solanum tuberosum*) es una planta herbácea anual que puede crecer hasta un metro de altura y produce un tubérculo, conocido como la papa, que es extremadamente rico en almidón. De hecho, este tubérculo ocupa el cuarto lugar en importancia mundial como alimento, solo superado por el maíz, el trigo y el arroz. Perteneciente a la familia de las solanáceas, la papa forma parte del género *Solanum*, que incluye al menos mil especies, entre las que se encuentran el tomate y la berenjena (FAO, 2008.)

## 1.8 Polifenoles presentes en *Solanum tuberosum*

Dentro de los metabolitos de *S. tuberosum* encontramos los compuestos fenólicos, que se han estudiado por su variedad de efectos beneficiosos en la salud humana y poca toxicidad dentro del interés de este estudio abordaremos los compuestos fenólicos ácido cafeico y ácido clorogénico.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de la papa que actúan para ayudar a la planta a defenderse de los patógenos invasores como, bacterias, hongos y virus. Sin embargo, también participan en reacciones de pardeamiento catalizadas por enzimas que pueden afectar negativamente el color, el sabor y la calidad nutricional de las papas (Borda.,2020).

Estos ácidos son fenilpropanoides que se biosintetizan por la ruta del ácido shikímico. Probablemente el más conocido de los ácidos hidroxicinámicos es el ácido clorogénico, su nombre proviene de su familia de ésteres de ácidos hidroxicinámicos, interviene en biosíntesis de la lignina, en cuanto a sus propiedades químicas podemos decir que es un éster formado entre el ácido cafeico y ácido L-quinico, teniendo en cuenta esto encontramos diversos isómeros como el criptoclorogénico y el ácido neoclorogénico. El ácido clorogénico más común es el ácido 5-o- cafeoilquínico, que todavía se llama a menudo ácido clorogénico, con ingestas que alcanzan a los 1000 mg/día o más. Se encuentra principalmente en el café, pero también en frutas como peras manzanas ciruelas, cerezas, melocotón, kiwis y verduras como la papa zanahoria y tomate dulce (Tom et al., 2016).

### 1.8.1 Ácido clorogénico

El ácido clorogénico es un compuesto con una amplia gama de efectos farmacológicos de gran relevancia. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que este compuesto presenta actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, hipoglucémicas, hipolipemiantes, anti cardiovasculares, antimutagénicas, anticancerígenas e inmunomoduladoras, entre otras.

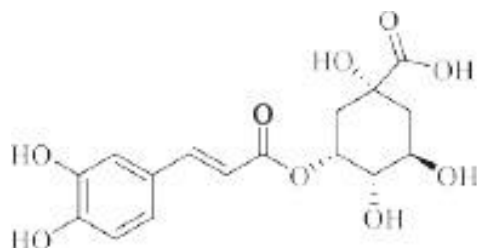
Es importante destacar que el ácido clorogénico se hidroliza en ácido cafeico y ácido quínico en el intestino, gracias a la acción de una enterasa, y posteriormente es absorbido por el organismo. Una vez absorbido, es metabolizado en glucósidos de ácido glucurónico y metabolitos de sulfato, y se encuentra en forma de metabolitos en el plasma. Finalmente, la excreción de estos compuestos se produce a través de la vía renal (Miao & Xiang, 2020)

Estos hallazgos subrayan la amplia gama de propiedades beneficiosas del ácido clorogénico y su potencial como compuesto terapéutico en el tratamiento de diversas afecciones. Su capacidad para intervenir en procesos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos lo convierte en un componente prometedor en la búsqueda de alternativas terapéuticas efectivas y seguras. Los estudios continúan desvelando nuevas facetas de este compuesto y su aplicación potencial en el campo de la medicina y la salud.

El ACG, con sus cinco grupos hidroxilos activos y un grupo carboxilo, posee una estructura que le permite reaccionar fácilmente con los radicales libres, lo que le confiere propiedades antioxidantes. Además, formas radicales de hidrógeno que eliminan la actividad de los radicales hidroxilos y aniones superóxido. Estudios recientes han demostrado que el ACG puede ser beneficioso para la salud al aliviar la lesión hepática alcohólica, acelerar la reparación de heridas en ratas y mejorar lesiones intestinales.

Probablemente, los mecanismos detrás de los beneficios del ACG incluyen la promoción del metabolismo de aminoácidos y glutatión, así como la mejora en el metabolismo de lípidos mediante la activación transcripcional de la proteína Nrf2 bajo condiciones de estrés. Esto conduce a la protección y promoción de la expresión de genes protectores, como proteínas antioxidantes y enzimas desintoxicantes, reforzando así la capacidad antioxidante del organismo (Miao & Xiang, 2020).

**Figura 2.** Estructura química ácido clorogénico



Del mismo modo como efecto beneficioso para la salud, se ha encontrado efecto anticardiovascular, relacionado con las consecuencias de la presencia de radicales libres en relación con las lesiones endoteliales causado por estos, las cuales como se ha descrito con anterioridad en el presente trabajo son las base de condiciones patológicas como la agregación plaquetaria anormal, la coagulación, la apoptosis entre otras, el ACG ha sido reconocido por aumentar la concentración de iones potasio en sangre reducir los niveles de triaglicerol y colesterol en la sangre, también posee actividad protectora en las células endoteliales vasculares por consiguiente tiene un efecto protector eficaz sobre el sistema cardiovascular y se ha demostrado también que el ácido isoclorogénico B tiene un efecto inhibitor sobre la biosíntesis de trombina (Miao & Xiang, 2020).

### 1.8.2 Ácido cafeico

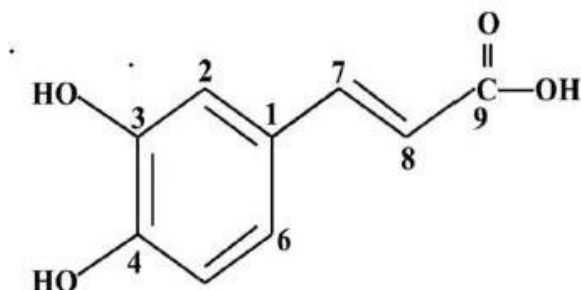
El ácido cafeico (AC), es un compuesto con diversos efectos sobre la salud, está presente en café, el vino tinto, las manzanas, las ciruelas, los arándanos rojos y negros, hierbas de la familia de la menta, el tomillo, el orégano la mejorana, la papá y también sus ésteres naturales como el ácido clorogénico, el ácido rosmarínico y el éster fenílico del ácido cafeico.

El ácido cafeico tiene una estructura que incluye un núcleo aromático, doble enlace conjugado y grupos hidroxilo, lo que le confiere propiedades antioxidantes. Además, estudios han demostrado que tiene efectos beneficiosos en una variedad de

enfermedades, como cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y Parkinson.

En el contexto de las enfermedades cardiovasculares, que están estrechamente relacionadas con el síndrome metabólico, el ácido cafeico ha mostrado una diversidad de efectos positivos. Por ejemplo, en ratones diabéticos inducidos por estreptozocina, el ácido cafeico ha demostrado reducir los niveles de glucosa en sangre, normalizar los niveles de insulina, aumentar los niveles de glucoquinasa hepática, normalizar el peso corporal y reducir los niveles de LDL en sangre. Además, en células endoteliales de la vena umbilical humana, el ácido cafeico ha reducido la producción de especies reactivas de oxígeno, que son una de las principales causas de daño en el endotelio vascular y, por lo tanto, generadoras de hiperactividad plaquetaria. En resumen, el ácido cafeico muestra un gran potencial para mejorar la salud cardiovascular y prevenir o tratar diversas enfermedades asociadas al síndrome metabólico (Pavlíková, 2023).

**Figura 3:** Estructura del ácido cafeico



Se encontró que el AC también puede influir en el tejido adiposo, transformando adipocitos blancos en marrones (estos segundos son más propensos a sufrir lipólisis), y lo hace mediante la disminución de genes de diferenciación adipogénica blanca, incluyendo, adiponectina CAAT/proteína de unión potenciadora alfa y proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) además aumentó la expresión de marcadores de adipocitos marrones: activador de muerte celular (CIDEA) y proteína desacomplante 1 (UCP1), como hallazgo



incidental se consiguió un efecto más potente en el “oscurecimiento” de los adipocitos blancos combinando el ácido cafeico con el ácido clorogénico.

La obesidad está estrechamente relacionada con la aterosclerosis, y ambas condiciones están asociadas con la inflamación vascular. En este contexto, el ácido cafeico (AC) mostró un efecto significativamente antiateroesclerótico en células del cordón umbilical humano. Se observó que a una concentración de 20 $\mu$ M, el ácido cafeico redujo la producción de interleucina-8 (IL-8) y la expresión del receptor tipo 4 de *toll-like* (TLR4). Además, inhibió la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), que es crucial para la adhesión de los leucocitos al endotelio. El descubrimiento de este efecto del ácido cafeico puede ser un paso importante en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis y sus consecuencias asociadas (Pavlíková, 2023).

Se cree que tiene efecto anticancerígeno, ya que puede reducir la vascularización de tumores mediante la inhibición de la fosforilación de JNK-1, una quinasa c-Jun N-terminal que forma parte de la familia MAPKs. Además, se ha observado que esta sustancia disminuye la activación de HIF-1 $\alpha$  (Factor Inducible por Hipoxia), lo que a su vez conduce a una reducción en la vascularización inducida por el VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). Como resultado, se produce una disminución en el crecimiento del tumor. Estudios han analizado su efecto en varios tipos de cáncer, incluyendo el melanoma y el colorrectal (Tyszka-Czochara et al., 2018).

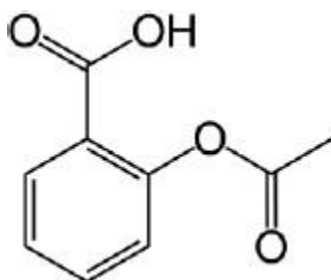
## 1.9 Ácido acetilsalicílico.

El ácido acetilsalicílico fue utilizado inicialmente como antipirético, pero en 1940 se descubrió que causaba hemorragia y 40 años después se demostró que tenía efectos antiplaquetarios mediados por prostaglandinas (Fernando & Frade, 2008).

El tromboxano A2 es uno de los agonistas más potentes de la activación plaquetaria, este se forma cuando la ciclooxigenasa 1 activa el ácido araquidónico. El ASA inhibe la Cox-1, con esto evita la generación de tromboxano A2 y demás prostaglandinas (Fernando & Frade, 2008).

El ASA ejerce su acción inhibiendo la COX al unirse al residuo de arginina-120, un punto de unión compartido con otros AINE. Al acetilar una serina clave para la acción catalítica de la enzima (serina 529 para la COX-1 plaquetaria y serina 516 para la COX-2 endotelial), disminuye la síntesis plaquetaria de TXA2. También reduce la secreción de gránulos densos en las plaquetas, lo que limita la liberación de sustancias proagregantes y vasoactivas durante su activación.

**Figura 4:** Molécula ácido acetilsalicílico



Además de sus efectos en las plaquetas, el ASA tiene otras acciones no plaquetarias, como la inhibición de las prostaglandinas y la síntesis de interleucina (IL) 6 en los leucocitos. También reduce la actividad de los inhibidores del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Estos diversos efectos contribuyen a explicar por qué los beneficios del ASA son mayores de lo esperado, considerando su simple inhibición plaquetaria dependiente del TXA2, que es un agonista relativamente débil (Badimon & Vilahur, 2013b).

En relación al papel del ASA en prevención primaria y secundaria, un estudio reciente concluyó que la administración de ASA a dosis de 100-150 mg/día es efectiva en prevenir enfermedades isquémicas en pacientes de alto riesgo (prevención secundaria). Sin

---

embargo, en el caso de prevención primaria, no se observó el mismo nivel de beneficio. Por el contrario, se encontró que existe un mayor riesgo de eventos adversos, como hemorragias, lo que lleva a cuestionar la utilidad de este fármaco en esta situación.

En prevención primaria, aunque el riesgo de sufrir un primer infarto se reduce en un 18%, el riesgo de hemorragias extracraneales aumenta en un 54%. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de ASA no es una opción recomendable en prevención primaria debido a que los posibles riesgos superan a los beneficios esperados (Badimon & Vilahur, 2013).

Por otro lado, encontramos que en prevención secundaria el ASA es el antiplaquetario de referencia en eventos agudos cardiovasculares como IAM, EVC, cuya indicación es la administración indefinida, excepto en condiciones especiales como problemas gastrointestinales, reacciones alérgicas y/o hemorragias.

En contraste se ha comprobado que el ASA sólo reduce los eventos clínicos aproximadamente en un 30%. Incluso se ve con más frecuencia un efecto de "resistencia al ASA" o el también llamado "fracaso en el tratamiento con ASA" lo cual nos incita a estudiar más a fondo su actividad biológica, y desarrollar nuevas alternativas farmacológicas (Badimon & Vilahur, 2013).

Además, se ha evidenciado que, en particular en ancianos y mujeres, el tratamiento puede presentar un "fracaso" que se manifiesta en la prolongación del tiempo de sangrado, la inhibición de la agregación plaquetaria ex vivo y la supresión de la producción plaquetaria de TXA<sub>2</sub>.

Los mecanismos implicados en este fenómeno de resistencia probablemente sean de múltiples orígenes y podrían deberse a reducción de la síntesis de TXA<sub>2</sub> y factores derivados de fallo en el tratamiento. La insuficiente supresión del TXA<sub>2</sub> puede originarse de un aumento en la renovación de plaquetas, de una mayor síntesis de TXA<sub>2</sub> de fuentes no plaquetarias, de interacciones farmacológicas con otros fármacos del mismo grupo (AINEs), y de polimorfismos genéticos (COX, TXA<sub>2</sub> sintasa). Igualmente, existen otros mecanismos que pueden esclarecer el posible fallo en tratamiento como la activación

plaquetaria por vías alternativas a COX-1, la disminución en la absorción, el incremento del metabolismo y la poca adherencia al tratamiento (Badimon & Vilahur, 2013) .

Está sustentado por estudios que la resistencia al ASA es un factor directamente relacionado con riesgo cardiovascular, aunque hasta ahora se comienzan a comprender los efectos que trae este evento consigo, es necesario ahondar en procedimientos para reconocer pacientes con esta característica, además de los diversos mecanismos por lo cuáles se da esta condición. Así mismos estudios demuestran que al aumentar la dosis de ASA en estos pacientes conlleva más al riesgo de hemorragia en lugar de obtenerse algún efecto terapéutico (Badimon & Vilahur, 2013).

## 1.10 Interacción farmacológica.

En los últimos años, ha aumentado el interés en la combinación de fármacos con actividades similares para el manejo de enfermedades como la hipertensión y el manejo del dolor, entre otros. También se ha generado conciencia sobre el uso de combinaciones sinérgicas de medicamentos, lo que permite utilizar dosis más bajas de cada uno y así reducir los efectos adversos o no deseados (Di Veroli et al., 2016)

Cuando se administran dos fármacos en combinación, pueden surgir efectos de aditividad, sinergismo y antagonismo. Aunque existen diversas definiciones que no siempre son concluyentes, la aditividad se refiere al resultado de la combinación de fármacos que es coherente con las potencias de los fármacos individuales. Este término proporciona la base para evaluar sinergismo y antagonismo y deriva del concepto más básico de equivalencia de dosis y del modelado cuantitativo asociado a él. El efecto puede ser sinérgico, lo que significa que demuestra una acción superior a la esperada de sus potencias y eficacias individuales.

La definición precisa de sinergia farmacológica aún es objeto de debate, pero en términos generales se refiere a una interacción positiva que produce un efecto farmacológico. A diferencia de la eficacia, que mide la respuesta de una combinación de fármacos, la sinergia se relaciona con la capacidad de potenciar el efecto esperado. Es importante destacar que una combinación altamente sinérgica puede no ser suficiente para lograr el

efecto farmacológico deseado, mientras que una combinación que genere un efecto muy elevado no necesariamente implica que exista una interacción sinérgica (Tang et al., 2015)

Al usar fármacos en combinación se busca lograr un efecto terapéutico sinérgico, reducir la dosis y con esto a su vez la toxicidad y/o prevenir o disminuir la posibilidad de farmacoresistencia, haciendo una búsqueda sobre una definición universal sobre sinergismo, encontramos que no existe un consenso alguno, pero si encuentra diferencias con otro tipo de interacciones como por ejemplo sinergismo frente a potenciación, en dónde el sinergismo es “mutuo” mientras que la mejora, potenciación o aumento en “unilateral”, el sinergismo deben determinarse con valores de CI (Índice de combinación) , mientras que en el caso de la potenciación o el aumento basta con indicar x% o una mejora de y. Cuando un fármaco por sí solo no tiene efecto, no habrá valores del Dm (potencia) y m (forma de la curva dosis- efecto) (Chou, 2010).

A lo largo de varios años, el entusiasmo por reconocer y medir el sinergismo ha experimentado un crecimiento significativo, motivado por los provechos que este tipo de interacción brinda, tal como se ha mencionado previamente. Se han empleado enfoques experimentales, en conjunción con modelos matemáticos, que abarcan los modelos de Loewe, Bliss y HSA (Highest Individual Agent), además del paradigma Chou-Talalay, considerado un referente clásico.

## **1.11 Técnica de Estudio de agregación plaquetaria.**

Para analizar el impacto antiagregante y el mecanismo de acción, se emplea la metodología descrita por Born (1962), la cual hace uso de un fotómetro alterado (agregómetro) para registrar las modificaciones observadas (Michelson, A. 2013).

Las investigaciones de agregación plaquetaria (AP) analizan la reacción de aglutinación de las plaquetas ante diferentes estimulantes plaquetarios, tal como se registra mediante un agregómetro que utiliza transmisión de luz. Algunos agregómetros miden la excreción de gránulos plaquetarios, otro indicador de la función plaquetaria; asimismo, es posible evaluar simultáneamente la liberación de ATP por las plaquetas agregadas.

La técnica de agregometría de transmisión de luz (LTA), consiste en la exposición de las plaquetas a numerosos estímulos *ex vivo*, se dice que se creó hacia los 60's mejorando así la identificación y diagnóstico de defectos relacionados con la hemostasia primaria.

La LTA es ampliamente reconocida como el estándar de referencia para estudiar la función plaquetaria, por lo que es una de las técnicas más utilizadas para identificar y diagnosticar diversos trastornos plaquetarios y para investigar esta área mediante el análisis de la transmisión de luz a través de muestras de PRP obtenidas al centrifugar sangre anticoagulada a bajas revoluciones. El PRP es una suspensión opaca de células que reduce significativamente la transmisión de luz. Después de agregar un agonista plaquetario, la agregación disminuye la turbidez de la suspensión, lo que aumenta la transmisión de luz (estableciendo el 100 % de transmisión de luz con PPP). La dinámica de la agregación plaquetaria se mide en tiempo real y se expresa en porcentaje (Linden et al., 2004.).

En relación con las limitaciones de la técnica, es importante destacar que la obtención del plasma rico en plaquetas debe realizarse en el menor tiempo posible. Se ha observado una mayor agregación plaquetaria en muestras que fueron procesadas inmediatamente después de la recolección, en comparación con aquellas que se dejaron en reposo por más tiempo. Por ende, es crucial resaltar que el tiempo óptimo para procesar la muestra después de la recolección no debe exceder los 30 minutos, con el fin de asegurar resultados óptimos en cuanto a la agregación plaquetaria.

## 2. Metodología

### 2.1 Materiales y Métodos

La parte experimental del trabajo fue realizada en el laboratorio de investigaciones en Farmacología (código Hermes 193) Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

#### 2.1.1 Material Biológico

Los diferentes ensayos fueron realizados con plasma rico en plaquetas (PRP) de tres voluntarios sanos, previo consentimiento informado (Anexo A con edades de entre 18 a 35 años, que no estuvieran en ningún manejo farmacológico por un lapso no menor a 15 días y que no tuvieran antecedentes de consumo de tabaco.

#### 2.1.2 Materiales y reactivos

Para el desarrollo de este estudio se utilizó: 1) agregómetro de *Helena Laboratories*, 2) el Inductor de agregación plaquetaria (AA, *Helena*®), el cual se preparó en agua destilada según instrucciones del fabricante. Los polifenoles (ácido cafeico y ácido clorogénico de Sigma- Aldrich®) y ASA (Cayman Chemical Company®), se disolvieron en DMSO sin que éste superara una concentración final de 0,1%.

#### 2.1.3 Preparación de las plaquetas

Para la obtención de la muestra se usaron materiales y procedimientos adecuados, como torniquete, aguja de calibre <21 G, y se desecharon los primeros 2 ml extraídos, para minimizar el efecto de la tromboplastina tisular y evitar hemólisis. Las muestras sanguíneas se procesaron dentro de los siguientes 20 minutos de la venopunción. La manipulación de las cubetas con los reactivos de prueba se realizó con mucha precaución a lo largo del ensayo tal como lo sugiere el manual del agregómetro (*Helena Laboratories*).

Se obtuvieron 18 ml de sangre total en tubos “tapa azul” o con citrato sódico al 3,2 % como anticoagulante, (quedando una proporción de 9/1), se dejó reposar y luego se centrifugó

durante diez minutos a 1200 rpm para obtener PRP. Posterior a esto se dejó reposar y se hizo una centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos de una alícuota y así obtener plasma pobre en plaquetas (PPP), como blanco de absorción para realizar la calibración del agregómetro al 100% de transmitancia y 0% de absorbancia.

## 2.2 Equipos y materiales

- Agregómetro AggRAMTM1486 *Helena Laboratories*.
- Stir Bars AggRAMTM de *Helena Laboratories*.
- Tubos de silicona cubiertos de vidrio *Helena Laboratories*.
- Centrifuga *Hettich* EBA 20.
- Balanza.
- Congelador Biomédico *Panasonic* MDF-U334-PA.
- Micropipeta 100 - 1000  $\mu$ L CALIBRA R 822 *Autoclavable de SOCOREX*.
- Micropipeta 20 - 100  $\mu$ L *Transferpette R de BRAND*.
- Micropipeta 0,5 - 10  $\mu$ L ACURA R 825 *Autoclavable de SOCOREX*.
- Micropipeta 2- 25  $\mu$ L ACURA R 825 *Autoclavable de SOCOREX*.
- Tubos de laboratorio.
- Guantes de látex.



- Torundas de alcohol.
- Aguja para recolección de sangre BD Vacutainer.
- Guardian para disposición de material cortopunzante

## 2.3 Protocolo experimental

Los ensayos de los compuestos sobre agregación plaquetaria se realizaron con la técnica LTA, o agregometría, turbidimetría, según el método de Born y O'Brien. (Alan D Michelson, 2013).

### 2.3.1 Fases del Estudio

El estudio puede dividirse en tres partes: en la primera parte se realizaron ensayos para buscar la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos planteados y examinar el efecto concentración – respuesta de ASA, frente al inductor ácido araquidónico, con el cual está ligada la acción farmacológica de este antiagregante. En la segunda parte se realizaron ensayos, con combinaciones de cuatro concentraciones de cada uno de los compuestos expuestos anteriormente cuyos % de agregación alcanzara valores entre 20-80%, y en la tercera y última parte o fase, se analizaron los datos obtenidos con las combinaciones de la segunda fase del estudio aplicando el modelo de Loewe con la plataforma *Combenefit*, para determinar si las interacciones resultantes fueron o no de tipo sinérgico.

- Primera fase

Se incubó durante 10 minutos en cada cubeta del agregómetro 225  $\mu$ L de PRP más los  $\mu$ L necesarios según concentraciones crecientes de cada uno de los (3), teniendo en cuenta concentraciones usadas en estudios anteriores (Buitrago cl., 2019). Con el fin de encontrar CI<sub>50</sub>, las concentraciones de ácido cafeico y ácido clorogénico se obtuvieron a partir de una solución madre de 1mg/1ml como solvente se usó DMSO 0,1%, transcurrido ese tiempo se efectuó un minuto de la lectura y luego se agregaron 25  $\mu$ L del

agonista AA los cuales corresponden AA  $5 \times 10^{-4}$  M, (según especificaciones del fabricante), se registró por 10 minutos adicionales. Como control negativo se utilizó DMSO (0,1%).

- Segunda fase

Posterior a hallar las concentraciones de los polifenoles y ASA cuyo porcentaje de agregación máximo registrado por el agregómetro alcanzó valores entre 20 y 80%, se realizaron ensayos combinando cuatro concentraciones crecientes de ASA con cuatro concentraciones de cada uno de los polifenoles, (ver tabla1 y 2) con la misma técnica descrita en la primera fase Se incubo durante 10 minutos en cada cubeta del agregómetro 225  $\mu$ L de PRP más los  $\mu$ L necesarios según concentración de cada uno de los (3) compuestos, transcurrido ese tiempo se efectuó un minuto de la lectura y luego se agregaron 25  $\mu$ L del agonista AA los cuales corresponden AA  $5 \times 10^{-4}$  M, (según especificaciones del fabricante), se registró por 10 minutos adicionales. Como control negativo se utilizó DMSO (0,1%).

**Tabla 1:** Concentraciones *M* usadas de los polifenoles de prueba fase I del ensayo.

COMPUESTO DE PRUEBA	CONCENTRACIÓN USADA g/mL	CONCENTRACIÓN <i>M</i>	PROMEDIO DE % ANTIAGREGACIÓN
Ácido Cafeico	$6 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-4}$	10
	$1 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-4}$	8,1
	$1.5 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-3}$	29,3
	$2 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	39,3
	$2.5 \times 10^{-4}$	$1.38 \times 10^{-3}$	78,2
	$3 \times 10^{-4}$	$1.66 \times 10^{-3}$	80,4
Ácido clorogénico	$1 \times 10^{-5}$	$2.8 \times 10^{-5}$	<0
	$1 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-6}$	<0
	$3 \times 10^{-5}$	$8.5 \times 10^{-5}$	3
	$6 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-4}$	5,5
	$8 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-4}$	79
	$1.5 \times 10^{-4}$	$4.2 \times 10^{-4}$	84
	$2 \times 10^{-4}$	$5.6 \times 10^{-4}$	74

**Tabla 2:** Concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  usados de ASA fase del ensayo

COMPUESTO DE PRUEBA	CONCENTRACIÓN USADA $\mu\text{g/ml}$	CONCENTRACIÓN USADA M	PROMEDIO DE % ANTIAGREGACIÓN
ASA	0,1	$5.5 \times 10^{-7}$	<0
	1	$5.5 \times 10^{-6}$	61,4
	10	$5.5 \times 10^{-5}$	47,3
	30	$1.6 \times 10^{-4}$	64
	60	$3.3 \times 10^{-4}$	60
	100	$5.5 \times 10^{-4}$	53
	200	$1.1 \times 10^{-3}$	24,4
	300	$1.6 \times 10^{-2}$	30

**Tabla 3:** Concentraciones M de ASA, AC, y ACL usadas en la fase II.

CONCENTRACIONES M DE ASA	CONCENTRACIONES M DE ACIDO CAFEÍCO	CONCENTRACIONES M DE ACIDO CLOROGENICO
$5.5 \times 10^{-6}$	$8.3 \times 10^{-2}$	$2.25 \times 10^{-4}$
$5.5 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-6}$
$3.3 \times 10^{-4}$	$1.38 \times 10^{-2}$	$4.23 \times 10^{-4}$
$5.5 \times 10^{-4}$	$1.66 \times 10^{-2}$	$5.64 \times 10^{-4}$

- Tercera fase

En la tercera parte del estudio, se utilizó la información obtenida en la segunda parte (combinaciones de ASA con cada polifenol) en las concentraciones detalladas en la tabla 3. Estas concentraciones lograron alcanzar un porcentaje de agregación máximo que osciló entre el 20% y el 80% para ASA Y AC, y para ACL 20 AL 50 %. Para analizar estas combinaciones, se empleó la plataforma *Combeneft*, que utiliza el modelo de Loewe para

generar una matriz representando las interacciones de sinergismo y antagonismo entre los compuestos mencionados.

## 2.4 Análisis estadístico

La agregación plaquetaria fue evaluada mediante curvas de concentración-respuesta que representan el porcentaje de agregación logrado frente a plaquetas con el agonista AA ( $5 \times 10^{-4} M$ ). Los datos fueron normalizados considerando la máxima relajación alcanzada al adicionar AA a las cubetas. Las agregaciones registradas por el agregómetro se procesaron utilizando software del AggRam de *Helena Laboratories*. Todos los resultados se presentaron como errores estándar de la media (E.E.M.). Se trabajó con una muestra de  $n \geq 3$  para cada tratamiento. Para obtener los valores de la concentración inhibitoria CI50 y los valores p ( $-\log IC_{50}$ ), se llevó a cabo un análisis de regresión de la curva sigmoidea.

Las curvas de respuesta a diferentes concentraciones se evaluaron mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de un análisis post hoc de Tukey, con un nivel de significancia establecido en  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software Excel®-16 y GraphPad-Prism-8.0®.

Para el análisis de la tercera parte, se aplicó el modelo de Loewe en el que se evaluaron las interacciones entre cada uno de los polifenoles y ASA, generando matrices con la plataforma *Combenefit*, (Figuras 5 y 6) con puntuaciones cuya interpretación se facilita por presentarse en un espectro de colores que va desde el azul intenso, cuando hay sinergia hasta el rojo intenso cuando hay inhibición (Di Veroli et al., 2016)

## 2.5 Aspectos éticos

El presente estudio se adhirió a las pautas éticas, técnicas y administrativas para la investigación en salud establecidas en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Siguiendo los lineamientos de los artículos 11 y 55, esta investigación puede

ser clasificada como de "riesgo mínimo", ya que involucró la extracción de sangre mediante venopunción en adultos sanos (Min Salud, 1993).

Esta tesis está enmarcada dentro del proyecto número 59839 en la plataforma Hermes de la Universidad Nacional. Para los propósitos de esta investigación, se llevaron a cabo tres extracciones de sangre venosa periférica en venas distales de las extremidades superiores, obteniendo un volumen máximo de 18 cc en un máximo de dos veces a la semana, previa obtención del consentimiento informado por escrito de cada voluntario. El estudio se desarrolló siguiendo meticulosamente las directrices correspondientes de las normativas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, en estricto cumplimiento de lo estipulado en dicha resolución.

## 3. Resultados

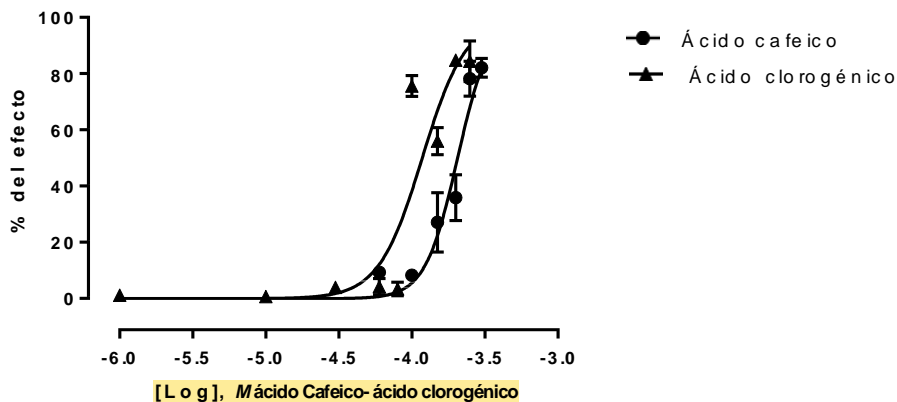
### 3.1 Resultados fase I

En los ensayos para encontrar la  $CI_{50}$  de los polifenoles y de ASA se determinaron curvas de concentración-respuesta de la agregación inducida por el agonista de AP, AA en 225  $\mu$ l de PRP, en concentraciones crecientes para ácido, cafeico para ácido clorogénico (Tabla 1), y para ASA (Tabla 2).

Además, se realizaron comparaciones simultáneas con una curva de control, donde solo se agregó DMSO al 0,1%. Los resultados demostraron una mayor eficacia de Ácido Clorogénico en comparación con ácido Cafeico. También, aunque el efecto antiagregante logrado por el polifenol ácido clorogénico es similar al alcanzado con ácido cafeico, se requiere una concentración mayor de este último en comparación, para manifestar el efecto evaluado.

Tenemos entonces que el ácido Clorogénico ejerció un efecto antiagregante en función de la concentración alcanzando niveles de agregación  $> 20\%$  con concentraciones de  $2 \times 10^{-6} M$ ; con una  $CI_{50}$  de  $2.3 \times 10^{-4} M$ . En segundo lugar, ácido cafeico produjo una respuesta antiagregante con concentraciones mayores, obteniendo valores de  $CI_{50}$   $6.5 \times 10^{-4} M$

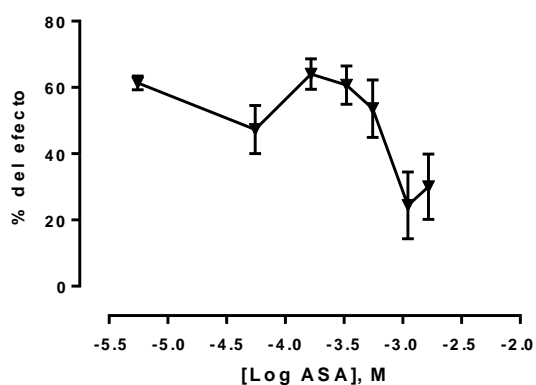
### Efecto antiagregante de ácido cafeico y ácido clorogénico frente a ácido araquidónico



**Gráfica 1.** Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido cafeico y ácido clorogénico sobre la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4}$  M).

Cada punto se representa con su respectiva  $\pm$ SEM (n = 4). \*\*p<0,01 vs. Control.

### Efecto antiagregante de ASA sobre la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico



**Gráfica 2.** Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido acetilsalicílico sobre la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4}$  M).

Cada punto se representa con su respectiva  $\pm$ SEM (n = 4). \*\*p<0,01 vs. Control.

Los valores de CI50 en esta investigación fueron obtenidos utilizando el software GraphPad-Prism-8® con un intervalo de confianza del 95%. En la tabla 2, se presentan los valores de CI50 para AC y ACL. Se observó que el valor de CI50 de ACL fue el más bajo, lo que indica su mayor potencia en comparación con AC.

**Tabla 4:** Concentración inhibitoria 50 (CI50) de AC y ACL frente a la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4}$  M)

Compuesto	LogEC50	IC Log EC50	EC50 g/mL	IC EC50 M
AC	-3,686	-3,722 to -3,650	2,06 x E- 4	0.00114
ACL	-3,928	-3,722 to -3,650	1,18 E-4	0.00033

## 3.2 Resultados fase II

Posteriormente se determinaron curvas de concentración respuesta de la agregación inducida por AA en PRP en las combinaciones y concentraciones de ASA + A CL relacionadas en la tabla 5, paralelamente se realizó el mismo procedimiento con las combinaciones de ASA + AC con las concentraciones relacionadas en la tabla 6.



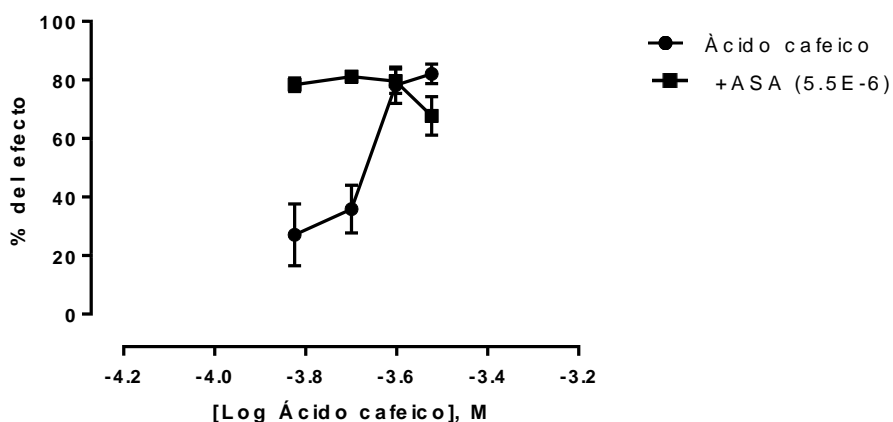
**Tabla 5:** Combinaciones de ASA +A Cl usadas en la fase II del estudio.

CONCENTRACIONES M ASA	CONCENTRACIONES M DE ACIDO CLOROGÉNICO	%ANTIAGREGACIÓN
$5.5 \times 10^{-6}$	$2.25 \times 10^{-4}$	76,5
	$2 \times 10^{-6}$	62,7
	$4.23 \times 10^{-4}$	47,1
	$5.64 \times 10^{-4}$	46,1
$5.5 \times 10^{-5}$	$2.25 \times 10^{-4}$	76,4
	$2 \times 10^{-6}$	69,3
	$4.23 \times 10^{-4}$	66,8
	$5.64 \times 10^{-4}$	43,5
$3.3 \times 10^{-4}$	$2.25 \times 10^{-4}$	83
	$2 \times 10^{-6}$	78
	$4.23 \times 10^{-4}$	78,7
	$5.64 \times 10^{-4}$	79
$5.5 \times 10^{-4}$	$2.25 \times 10^{-4}$	34
	$2 \times 10^{-6}$	44
	$4.23 \times 10^{-4}$	42
	$5.64 \times 10^{-4}$	2,3

**Tabla 6:** Combinaciones de concentraciones de ASA +A C usadas en la fase II del estudio.

CONCENTRACIONES M ASA	CONCENTRACIONES M DE ACIDO CAFEICO	% ANTIAGREGACIÓN COMBINACIÓN
$5.5 \times 10^{-6}$	$8.3 \times 10^{-3}$	78,4
	$1.1 \times 10^{-3}$	81,2
	$1.38 \times 10^{-3}$	79,5
	$1.66 \times 10^{-3}$	67
$5.5 \times 10^{-5}$	$8.3 \times 10^{-3}$	87,3
	$1.1 \times 10^{-3}$	88,9
	$1.38 \times 10^{-3}$	73,7
	$1.66 \times 10^{-3}$	67,5
$3.3 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-3}$	85,4
	$1.1 \times 10^{-3}$	82,5
	$1.38 \times 10^{-3}$	74,5
	$1.66 \times 10^{-3}$	76,1
$5.5 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-3}$	74,2
	$1.1 \times 10^{-3}$	69,4
	$1.38 \times 10^{-3}$	67,7
	$1.66 \times 10^{-3}$	63,7

## Efecto antiagregante de ácido cafeico en ausencia y presencia de ASA



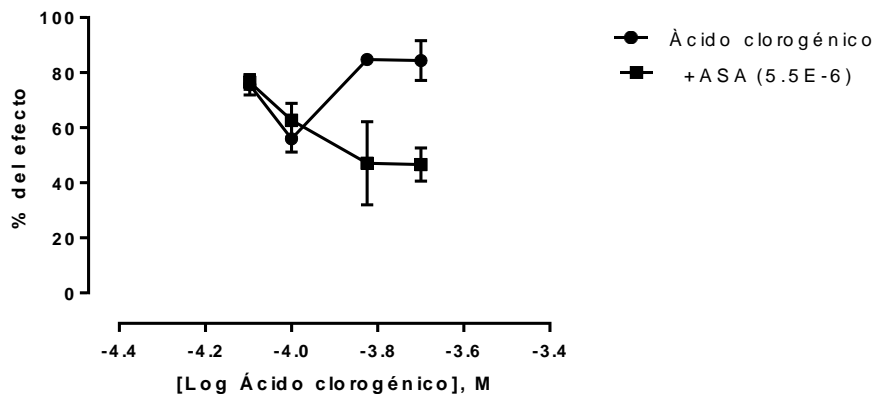
**Gráfica 3.** Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido cafeico en presencia y ausencia de ASA 5.5 E-M sobre la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4}$  M).

Cada punto se representa con su respectiva  $\pm$ SEM (n = 4). \*\*p<0,01 vs. Control.

Durante el análisis de estas combinaciones, se pudo constatar el efecto antiagregante del ASA experimentó un notable incremento combinado con el ácido cafeico.

**Gráfica 4.** Curva de concentración – respuesta del efecto antiagregante de ácido clorogénico en presencia y ausencia de ASA 5.5 E-6 M sobre la agregación plaquetaria inducida por AA ( $5 \times 10^{-4}$  M).

**Efecto antiagregante de ácido clorogénico en ausencia y presencia de ASA**

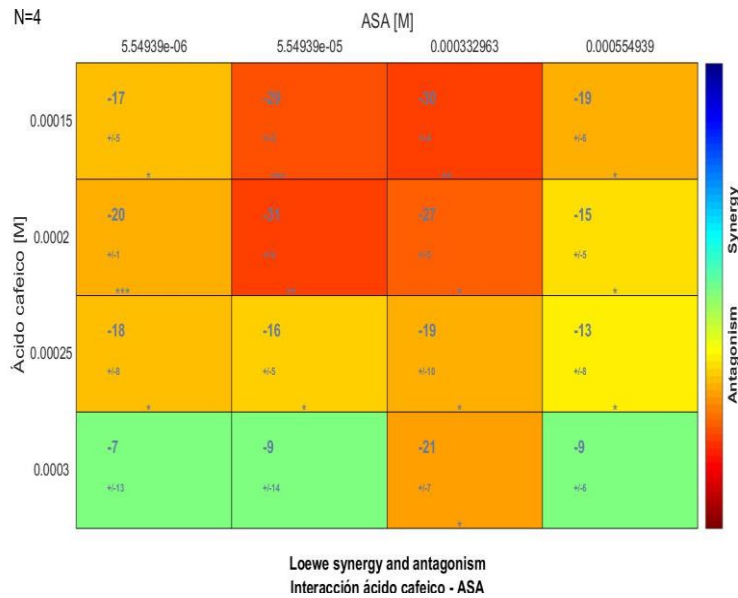


Cada punto se representa con su respectiva  $\pm$ SEM ( $n = 4$ ).  $**p < 0,01$  vs. Control.

La grafica nos muestra que el efecto antiagregante de las combinaciones entre ASA+ ácido clorogénico es dependiente de la concentración, además que de esta combinación el resultado es un porcentaje menor de antiagregación comparado con la combinación de ASA + ácido cafeico.

### 3.3 Resultados fase III

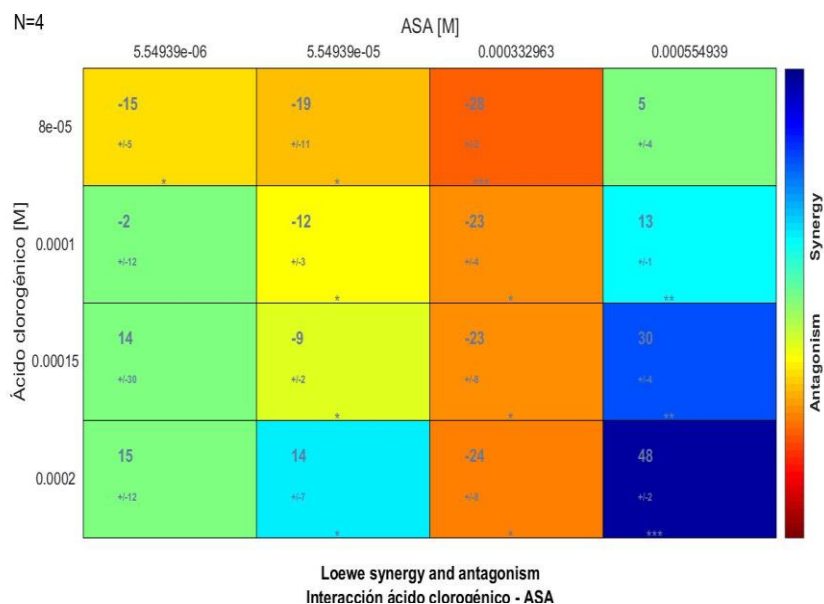
La figura 5 muestra que existe un efecto de antagonismo de la combinación ácido cafeico en todas las combinaciones utilizadas. Para ilustrar estas interacciones, se ha dispuesto una tabla que correlaciona las diversas concentraciones de ambos compuestos, mostrando el porcentaje de sinergismo entre ellos. En tonos de azul, que varían de claro a oscuro, se representan aquellas combinaciones que generan sinergismo, mientras que en una gama que va de amarillo a rojo se indican las concentraciones que resultan en antagonismo.



**Figura 5.** Matriz generada por *Combenefit* empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ASA y ácido cafeico

Donde \* hace alusión a la significancia estadística, de la siguiente manera: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; y \*  $p < 0,05$ .

La figura 6 muestra un efecto dual, con incremento del efecto antiagregante y disminución del efecto de agregación, dependiendo de la concentración de ASA que se combina con ácido clorogénico. Se presenta el porcentaje de sinergismo entre estos dos compuestos, con tonos azules representando las concentraciones que generan sinergismo, y tonos de amarillo a rojo para las concentraciones que resultan en antagonismo.



**Figura 6.** Matriz generada por *Combenefit* empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ASA y ácido clorogénico.

Donde \* hace alusión a la significancia estadística, de la siguiente manera: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; y \*  $p < 0,05$ .

Cabe destacar que en las figuras 5 y 6 en cada punto representa diferentes combinaciones de ASA y los polifenoles de estudio. La posición por encima del eje cero en el eje de % sinergia indica sinergismo, mientras que por debajo del cero señala antagonismo. Si los puntos se encuentran en el plano o cero de porcentaje de sinergia, se interpreta como aditividad.

## 4. Discusión de resultados

La investigación tuvo como objetivo principal evaluar la existencia de sinergismo entre los polifenoles ácido cafeico y ácido clorogénico, compuestos presentes en *Solanum tuberosum* junto con el ácido acetilsalicílico (ASA). Estos polifenoles no habían sido previamente estudiados en términos de sus posibles interacciones. Para alcanzar este propósito, se realizaron análisis de las curvas de concentración - respuesta, utilizando el porcentaje de agregación de plasma rico en plaquetas (PRP), mediante la técnica descrita por Born en 1962. Estos ensayos permitieron examinar la influencia de las diferentes concentraciones de los compuestos mencionados en la inhibición de la agregación plaquetaria, proporcionando información relevante sobre sus efectos combinados y posibles sinergias.

Aunque se encontró en estudios anteriores que la CI50 del ácido cafeico aislado de *S. tuberosum* sobre la agregación plaquetaria inducida por AA en plaquetas humanas es de  $2 \times 10^{-6}$  g/mL (Buitrago 2012), en el presente estudio arrojó un resultado para CI50  $2.06 \times 10^{-4}$  g/mL requiriendo así concentraciones mayores, las cuáles podrían atribuirse a diferencias con el método y/o posibles diferencias en las condiciones sanguíneas basales de los voluntarios sanos. Con relación al ácido clorogénico, para lograr una respuesta que inhibiera la agregación plaquetaria, y se obtuvieran porcentajes de inhibición de agregación entre el 20 y 80% se requirieron concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$ , y  $3 \times 10^{-4}$  g/mL, mismas concentraciones que se usaron para el estudio de sinergia con combinaciones de ASA.

En la literatura, se ha documentado la acción inhibitoria del ácido cafeico en la agregación plaquetaria utilizando diferentes concentraciones que varían de  $1,25 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-4}$  M, utilizando DMSO al 0.2% como vehículo. En los ensayos realizados en el estudio de Alencar Silva en 2020, se empleó trombina a 0.05 U/mL como estimulante de la agregación, y el experimento se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Born. Los resultados obtenidos revelaron porcentajes de agregación que dependen de la concentración, oscilando entre 30% y menos del 10% (Alencar Silva et al., 2020).

Este efecto inhibitorio del ácido cafeico se atribuye a la producción de prostaciclina, como PGI<sub>2</sub>, que es el primer factor relajante derivado del ácido araquidónico (AA). PGI<sub>2</sub> actúa como un potente inhibidor de la agregación plaquetaria al aumentar los niveles de AMPc intraplaquetario y reducir la movilización de calcio (Polini 2004).

Se han relacionado estos datos con ensayos que buscan actividad de ácido en otro tipo de efectos como relajación en anillos de aorta de rata en donde se asoció que los efectos de este compuesto podrían estar relacionados directamente con el bloqueo del receptor de AT<sub>1</sub> o del receptor TX-A<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> que estimula la síntesis de la COX-2, la cual cataliza la formación de TX-A<sub>2</sub> y la producción de PGI<sub>2</sub>, que disminuye la movilización de calcio, llevando a la inhibición de la agregación plaquetaria y a la vasodilatación muscular. Estos resultados son muy similares a los observados con el fármaco losartan (Li et al., 2008)

En relación con el ácido clorogénico, en el presente ensayo se determinó una CI<sub>50</sub> de  $1.18 \times 10^{-4}$  g/mL en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por AA en plaquetas humanas. Aunque no se encontró bibliografía específica para esta CI<sub>50</sub> frente al agonista usado en este estudio, se hallaron datos de un estudio previo donde el ácido clorogénico, en una concentración de 10 µg/mL, presentó un porcentaje de agregación plaquetaria del  $79 \pm 3$  (error estándar de la media) en al menos 5 experimentos (Buitrago, 2012).

Durante la búsqueda literaria de ensayos sobre la actividad antiagregante del ácido clorogénico, se encontraron resultados que llaman la atención. En ensayos en los que se utilizaron colágeno (10 µg/mL) y AA (150 µg/mL) como agonistas, el ácido clorogénico no mostró ningún efecto antiagregante plaquetario en plaquetas humanas, en concentraciones que oscilaron entre 1 µg/mL y 100 µg/mL, siguiendo la técnica descrita por Born, mientras que sí se obtuvo respuesta de inhibición de la agregación usando como inductores como ADP (10 µM) con una CI<sub>50</sub> de < 0.1 µg/mL. (Buitrago et al., 2012)

Un estudio demostró que un ácido clorogénico proveniente del café conocido como 5-O- cafeoilquínico (5-CQA) proveniente de un grupo de ésteres químicos, fue capaz de inhibir la COX-I la cual interviene en la activación plaquetaria haciendo una supresión de la producción de tromboxano y la expresión de la P- selectina trayendo como consecuencia la disminución de del calcio intracelular afectando también la exposición del receptor GP IIb/IIIa, este podría ser una de las vías por la cual el ácido clorogénico inhibe la agregación plaquetaria (Park, 2015). Aunque también Fuentes et al., 2014 llegaron a la conclusión de que los efectos antiplaquetarios del clorogénico están vinculados a la vía de señalización relacionada con el receptor A2A/adencilato ciclasa/cAMP/PKA 20.

Con el propósito de identificar el tipo de relación con todas las combinaciones de los polifenoles examinados, los datos se sometieron a análisis en la plataforma Combenefit, utilizando el enfoque de Loewe. Este modelo posibilita categorizar las respuestas de las distintas combinaciones de compuestos como sinergia o antagonismo farmacológico (Tang et al., 2015).

En la matriz del enfoque de Loewe, se relacionan simultáneamente las distintas concentraciones de los polifenoles, paralelamente junto con ASA, mostrando el nivel de interacción entre estos compuestos. Las concentraciones que resultan en sinergismo se representan en tonos de azul, desde más claro a más oscuro. Por otro lado, las concentraciones que dan lugar a antagonismo se reflejan en una gama de colores que va desde el amarillo hasta el naranja y rojo.

La definición exacta de sinergia farmacológica está en discusión, y se puede considerar como una forma de interacción positiva que genera un efecto farmacológico. A diferencia de la eficacia, que es una medida de la respuesta a una combinación de fármacos, la sinergia no garantiza necesariamente que se alcance el efecto farmacológico esperado (Tang et al., 2015).

Después de consultar la literatura sobre estudios de sinergia con ASA, se identificó una posible interacción sinérgica con el extracto 50 de *Ginkgo biloba* en un estudio de agregación plaquetaria en PRP de aurícula de conejos. En este estudio, se prepararon plaquetas lavadas y se utilizó el extracto como agonista de agregación AA a una concentración de 1.5 mM. Además, se probó la aspirina a concentraciones de 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 mg/mL. Utilizando la plataforma Synergyfinder2.0, se analizaron los efectos



---

combinados de ambos fármacos, y los resultados mostraron sinergia en los rangos de concentración, frente a AA y otros inductores (Ke et al., 2021).

Este estudio demostró que tanto el ácido cafeico como el ácido clorogénico presentan efectos antiagregantes, aunque con comportamientos distintos. Es relevante tener en cuenta las diferencias en las curvas de combinación en *GraphPad* y *CombeneFit*, ya que estas ofrecen interpretaciones diferentes. En particular, *GraphPad* muestra que la combinación con ácido cafeico aumenta el efecto antiagregante, mientras que con ácido clorogénico disminuye combinándolos paralelamente con la concentración más baja de ASA 1 µg/mL. Por tanto, se debe considerar la necesidad de un análisis exhaustivo y comparativo de los resultados obtenidos en ambas plataformas para una interpretación adecuada de los datos además se recomienda ampliar el rango de concentraciones probadas y aumentar el tamaño de la muestra para obtener resultados más sólidos y precisos.

Estos hallazgos sugieren que, al utilizar concentraciones más bajas de ASA, es posible observar una mayor apreciación de las interacciones sinérgicas con otros compuestos. Este estudio resalta la importancia de explorar diferentes combinaciones de concentraciones para optimizar la sinergia entre fármacos y mejorar los efectos terapéuticos en futuras investigaciones.

Considerada efectivamente como una ventaja de la complejidad química para los metabolitos secundarios de plantas, la sinergia se refiere a que el efecto y/o potencia de una combinación o mezcla de compuestos es mayor que cada compuesto por separado, ejerciendo un efecto coadyuvante. En el contexto de esta investigación, se buscó mejorar el efecto antiagregante del ASA en presencia de ciertas concentraciones de ácido cafeico y ácido clorogénico, metabolitos presentes en *S Tuberosum*. Actualmente, se está incrementando el interés en enfocar la investigación hacia las interacciones sinérgicas en fitoterapia, con el objetivo de mejorar el efecto terapéutico y reducir los posibles efectos adversos. De esta manera, se proyecta una fitoterapia que involucre la combinación de diversos compuestos.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- Los compuestos polifenólicos ácido cafeico y ácido clorogénico ejercen efectos antiagregantes en función de la concentración, confirmando lo hallado en estudios previos.
- El ácido acetil salicílico, en el rango de concentraciones probadas en este estudio, ejerce un efecto antiagregante plaquetario que disminuye al aumentar su concentración, lo cual es consistente con su mecanismo de acción farmacológica.
- No se puede afirmar que, en el rango de concentraciones probadas en este estudio, se ejerzan efectos claramente de tipo sinérgico entre estos polifenoles y ASA, pero es necesario que en futuros estudios se amplíe el tamaño de muestra y el espectro de concentraciones.

### 5.2 Recomendaciones

- Realizar ensayos con combinaciones en concentraciones de concentraciones más bajas tanto de los polifenoles como de ASA, puesto que se observó un efecto inhibición de actividad antiagregante atribuido a las altas combinaciones usadas en este trabajo.
- Para obtener resultados más sólidos y precisos en el estudio de las interacciones, se sugiere aumentar el tamaño de la muestra al realizar ensayos.

## 6. Bibliografía

- Alan D Michelson. (2013). *Platelets* (Alan D Michelson, Marco Cattaneo, Adrew relinger, & Peter Newman, Eds.; 3rd ed., Vol. 3).
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2013). Antiagregación plaquetaria Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. In *Rev Esp Cardiol Supl* (Vol. 13). <https://www.revespcardiol.org/?ref=1917747156>,
- Bermejo, E. (2017). Plaquetas. *Hematología*, 10-18. <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/06-Vol%2021-extra.pdf>
- 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. Borda, D.C. (2020). *Evaluación del efecto sobre la agregación plaquetaria de una dieta enriquecida en cáscara de papa. [Tesis maestrpía]*. 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](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042007000100007)
- Chen, Y., Yuan, Y., & Li, W. (2018). Sorting machineries: How platelet-dense granules differ from  $\alpha$ -granules. In *Bioscience Reports* (Vol. 38, Issue 5). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20180458>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. In *Cancer Research* (Vol. 70, Issue 2, pp. 440–446). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- de Alencar Silva, A., Pereira-de-Morais, L., Rodrigues da Silva, R. E., de Menezes Dantas, D., Brito Milfont, C. G., Gomes, M. F., Araújo, I. M., Kerntopf, M. R., Alencar de Menezes, I. R., & Barbosa, R. (2020). Pharmacological screening of the phenolic compound caffeic acid using rat aorta, uterus and ileum smooth muscle. *Chemico-Biological Interactions*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109269>
- FAO,. (2008.). *RESEÑA DE FIN DE AÑO AÑO INTERNACIONAL DE LA PAPA 2008*. Roma, Italia . <https://www.fao.org/3/i0500s/i0500s.pdf>

Di Veroli, G. Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J. L., Richards, F. M., & Jodrell, D. I. (2016). Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, 32(18), 2866–2868. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw230>

ENVIRONMENT DIRECTORATE JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY Cancels & replaces the same document of 21 December 2020 REVISED CONSENSUS DOCUMENT ON COMPOSITIONAL CONSIDERATIONS FOR NEW VARIETIES OF POTATO (*Solanum tuberosum*): Key Food and Feed Nutrients, Toxicants, Allergens, Anti-nutrients and Other Plant Metabolites Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 33 JT03470054 OFDE. (2021).

Fernando, G. L., & Frade, R. (2008). *Manual de trombosis y terapia antitrombótica* (V. J. Aldrete, Ed.; Vol. 1).

Fuentes, E., Caballero, J., Alarcón, M., Rojas, A., & Palomo, I. (2014). Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090699>

Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2014). ScientificWorld Ltd. <https://doi.org/10.1155/2014/781857>

Goodman, & Gilman. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (L. Bruton, B. Chabner, & Bjorn Knollman, Eds.; 12th ed.).

Gremmel, T., Frelinger, A. L., & Michelson, A. D. (2016). Platelet physiology. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* (Vol. 42, Issue 3, pp. 191–204). Thieme Medical Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>

Guadalupe Sánchez-Arias, A., Bobadilla-Serrano, M. E., Dimas-Altamirano, B., Gómez-Ortega, M., & González-González, G. (n.d.). *Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel Heart diseases: the leading cause of morbidity in a third-level hospital*. [www.medigraphic.com/revmexcardiol](http://www.medigraphic.com/revmexcardiol)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)

- Harrison, P. (2005). Platelet function analysis. *Blood Reviews*, 19(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002>
- Jm, C. (2017.). *Fisiología de la hemostasia. Introducción general Normal haemostasis. Introduction.* (Vol. 21. 4–6). <https://www.sah.org.ar/revistasah/numeros/vol21/extra/04-Vol%2021-extra.pdf>
- Li, Y., Shi, W., Li, Y., Zhou, Y., Hu, X., Song, C., Ma, H., Wang, C., & Li, Y. (2008). Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC12 cells induced by methylmercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.12.008>
- Lim, T. K., & Lim, T. K. (2016). Solanum tuberosum. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, 12–93. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26065-5_2)
- 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>
- Machlus, K. R., & Italiano, J. E. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 201, Issue 6, pp. 785–796). <https://doi.org/10.1083/jcb.201304054>
- Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 87, pp. 71–88). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.002>
- 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>
- Park, J. B. (2015). Potential Effects of Chlorogenic Acids on Platelet Activation. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 709–717). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00079-6>
- Pavlíková, N. (2023). Caffeic Acid and Diseases—Mechanisms of Action. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24010588>
- Rubenstein, D. A., & Yin, W. (2018). Platelet-activation mechanisms and vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1117–1156. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170049>
- 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](https://www.agamfec.com/wp/wp-content/uploads/2014/07/18_1_actua_1.pdf)

- Tang, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, T. (2015). What is synergy? The Saariselki agreement revisited. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 6, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00181>
- Tom, E. N. L., Girard-Thernier, C., & Demougeot, C. (2016). The Janus face of chlorogenic acid on vascular reactivity: A study on rat isolated vessels. *Phytomedicine*, *23*(10), 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.06.012>
- Tyszka-Czochara, M., Bukowska-Strakova, K., Kocemba-Pilarczyk, K. A., & Majka, M. (2018). Caffeic acid targets AMPK signaling and regulates tricarboxylic acid cycle anaplerosis while metformin downregulates HIF-1 $\alpha$ -induced glycolytic enzymes in human cervical squamous cell carcinoma lines. *Nutrients*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070841>
- Ulrich-Merzenich, G. S. (2014). Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products-Potential and challenges for drug development. In *Synergy* (Vol. 1, Issue 1, pp. 59–69). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2014.07.011>
- Van der Meijden, P. E. J., & Heemskerk, J. W. M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 166–179). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., & Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 403–413). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150474>
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. In *Fitoterapia* (Vol. 92, pp. 133–147). <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>
- Yeung, J., Li, W., & Holinstat, M. (2018). Platelet signaling and disease: Targeted therapy for thrombosis and other related diseases. *Pharmacological Reviews*, *70*(3), 526–548. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014530>



## 7. Anexos

### Anexo A : Consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica humana.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA MOLECULAR (FARMOL, CoI0064459 )

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE**, para evaluar las interacciones de los metabolitos polifenólicos de *Solanum tuberosum*, ácido cafeico y ácido clorogénico con ácido acetil salicílico sobre la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico

#### DECLARACIÓN DE INFORMACION

El (la) señor(a): \_\_\_\_\_

1. Ha suministrado información acerca de su condición de salud y el consumo de medicamentos.
2. Ha recibido información de **Angélica Natalí Moreno Tristancho** respecto a su propósito de desarrollar estudios de las interacciones de los metabolitos polifenólicos de *Solanum tuberosum*, ácido cafeico y ácido clorogénico con ácido acetil salicílico sobre la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico.
3. Ha suministrado 10-18 mL para tal fin.
4. Ha tenido la libertad de hacer preguntas y éstas han sido respondidas adecuadamente con el fin de aclarar sus inquietudes.
5. Ha sido informado de su derecho de declinar su continuidad en este proyecto en el momento en el que lo considere necesario.
6. Ha sido informado acerca de la finalidad y naturaleza de este estudio, que hace parte del desarrollo del proyecto: Evaluación de las interacciones de metabolitos polifenólicos obtenidos de *Solanum tuberosum* sobre la actividad antiagregante plaquetaria del ácido acetil salicílico.

Yo consiento que la investigadora **Angélica Natalí Moreno Tristancho**, obtenga muestras de sangre suministradas por mí, con el fin de desarrollar su trabajo de tesis:, **Evaluación de las interacciones de metabolitos polifenólicos obtenidos de *Solanum tuberosum* sobre la actividad antiagregante plaquetaria del ácido acetil salicílico.** Así mismo, se



me ha explicado que el grado de riesgo existente en este procedimiento es mínimo y que la información obtenida será utilizada únicamente con fines investigativos.

La investigadora Angélica Natalí Moreno Tristancho, bajo la tutoría del profesor **Mario Francisco Guerrero Pabón**, desarrollará su trabajo investigativo en el Laboratorio de investigaciones en farmacología A (código Hermes 193) del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá y estará disponible con el fin de aclarar las dudas que surjan respecto al propósito de esta investigación.

- Correo electrónico: [amorenotr@unal.edu.co](mailto:amorenotr@unal.edu.co)
- Número telefónico móvil: 322 2525422

En constancia a lo anterior firma el donante.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

C.C.

Ciudad y fecha:

El testigo

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

C.C.

Ciudad y fecha:



## Anexo B. Porcentajes de Antiagregación combinación cada uno de los polifenoles en diferentes concentraciones y ASA en diferentes concentraciones

### Combinación ASA + ACL

Combinación	%Antiagregación 1	%Antiagregación 2	%Antiagregación 3	%Antiagregación n 4
1µg/ml ASA+ A Clorogénico 8 x10 <sup>(-5)</sup> g/ml	79,5	80,8	69	76,9
1µg/ml ASA+ A Clorogénico 1 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	71	44,8	65	70
1µg/ml ASA+ A Clorogénico 1,5 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	46,7	63	5	73,8
1µg/ml ASA+ A Clorogénico 2 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	33,5	48,3	62,2	42,4
10µg/ml ASA+ A Clorogénico 8 x10 <sup>(-5)</sup> g/ml	60	80	85	80,6
10µg/ml ASA+ A Clorogénico 1 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	70	71,6	65,6	70,3
10µg/ml ASA+ A Clorogénico 1,5 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	65	64,9	69,6	67,7
10µg/ml ASA+ A Clorogénico 2 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	42	35	52,6	44,4
60µg/ml ASA+ A Clorogénico 8 x10 <sup>(-5)</sup> g/ml	85	81	83	83
60µg/ml ASA+ A Clorogénico 1 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	80	71,7	81	80
60µg/ml ASA+ A Clorogénico 1,5 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	70	75	85	85
60µg/ml ASA+ A Clorogénico 2 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	71	80	75	90
100µg/ml ASA+ A Clorogénico 8 x10 <sup>(-5)</sup> g/ml	-10	48	54,2	45,7
100µg/ml ASA+ A Clorogénico 1 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	10	40	43,4	41,3
100µg/ml ASA+ A Clorogénico 1,5 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	94,6	21	30,2	23,7
100µg/ml ASA+ A Clorogénico 2 x10 <sup>(-4)</sup> g/ml	-10	10	4,7	6,5

<b>COMBINACIÓN ASA+ AC</b>				
<b>Combinación</b>	<b>%Antiagregación 1</b>	<b>%Antiagregación 2</b>	<b>%Antiagregación 3</b>	<b>%Antiagregación 4</b>
1µg/ml ASA+ ACAFEICO 1,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	78,5	80,7	71,8	82,6
1µg/ml ASA+ ACAFEICO 2 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	80,5	83	81,3	80
1µg/ml ASA+ ACAFEICO 1,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	71,2	86,7	87	73,3
1µg/ml ASA+ ACAFEICO 3 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	83,1	63	72,7	52,3
10µg/ml ASA+ ACAFEICO 1,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	89,6	87,8	86,5	85
10µg/ml ASA+ ACAFEICO 2 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	87,7	94,6	89,2	84,4
10µg/ml ASA+ ACAFEICO 2,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	75	78,4	66,1	76
10µg/ml ASA+ ACAFEICO 3 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	84,1	62,4	72,2	50
60µg/ml ASA+ ACAFEICO 1,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	90	81	86,3	84,6
60µg/ml ASA+ ACAFEICO 2 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	76,7	82	88	83,4
60µg/ml ASA+ ACAFEICO 2,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	60,7	74,8	82	80,5
60µg/ml ASA+ ACAFEICO 3 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	83	67,3	80	74,3
100µg/ml ASA+ ACAFEICO 1,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	81,5	72,7	75	67,6
100µg/ml ASA+ ACAFEICO 2 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	62,5	70,5	72	72,6
100µg/ml ASA+ ACAFEICO 2,5 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	58,7	77,4	66	69
100µg/ml ASA+ ACAFEICO 3 x 10 <sup>(-4)</sup> g/ml	54,8	63,5	70,5	64,5

### Anexo C. porcentajes de antiagregación polifenoles AC Y ACL en diferentes concentraciones en ausencia de ASA

COMPUESTO DE PRUEBA	CONCENTRACIÓN USADA g/mL	% Antiagregación		
		1	2	3
Ácido Cafeico	$6 \times 10^{-5}$	11,4	10	8,6
	$1 \times 10^{-4}$	9,5	7	8
	$1,5 \times 10^{-4}$	9,2	21	57,7
	$2 \times 10^{-4}$	21,1	56,6	41,3
	$2,5 \times 10^{-4}$	85,6	83,2	65,9
	$3 \times 10^{-4}$	75,8	88,4	77
Ácido clorogénico	$1 \times 10^{-6}$	-16,4	3,4	-0,7
	$1 \times 10^{-5}$	-10,9	1,5	0,5
	$3 \times 10^{-5}$	0,9	4,7	6,3
	$6 \times 10^{-5}$	-0,4	4,7	12,3
	$8 \times 10^{-5}$	80,7	75,6	81
	$6 \times 10^{-4}$	52,4	64,1	38,4
	$1,5 \times 10^{-4}$	80,5	83,7	87,8
	$2 \times 10^{-4}$	61,8	76,1	84,3

**Anexo D. Porcentajes de antiagregación de ASA a diferentes concentraciones**

COMPUESTO DE PRUEBA	CONCENTRACIÓN USADA µg/mL	% Antiagregació 1	% Antiagregació 2	% Antiagregació 3
ASA	0,1	-113,3	-107,4	-54,7
	1	65,3	58,1	60,8
	10	61,4	36,9	43,7
	30	64,6	71,7	55,8
	60	53,3	72,2	56,7
	100	41,3	70,4	49
	200	15,3	44,6	13,3
	300	20,5	19,8	49,8

## Anexo E. Reporte emitido por software *GraphPad* sobre CE50 Acido cafeico y Ácido clorogénico

LogEC50 different for each data set	Ácido caféico	Acido clorogénico
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	= 0,0
Top	= 100,0	= 100,0
LogEC50	-3,686	-3,928
HillSlope	3,920	2,917
EC50	0,0002060	0,0001180
Span	= 100,0	= 100,0
Std. Error		
LogEC50	0,01731	0,02723
HillSlope	0,6380	0,4790
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-3,722 to -3,650	-3,983 to -3,873
HillSlope	2,605 to 5,234	1,948 to 3,886
EC50	0,0001898 to 0,0002236	0,0001039 to 0,0001339

P value	< 0,0001
Conclusion (alpha = 0.05)	Reject null hypothesis
Preferred model	LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)	43,26 (1,64)

## Anexo G. Reporte de originalidad emitido por Turnitin

2/8/23, 11:39

Turnitin - Informe de Originalidad - Tesis Maestria

Turnitin Informe de Originalidad											
Procesado el: 02-ago.-2023 09:37 -05 Identificador: 2140427195 Número de palabras: 17235 Entregado: 1 Tesis Maestria Por Angelica Natali Moreno Tristancho	<table border="1"> <tr> <td>Índice de similitud</td> <td>26%</td> </tr> <tr> <td>Similitud según fuente</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Internet Sources:</td> <td>22%</td> </tr> <tr> <td>Publicaciones:</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td>Trabajos del estudiante:</td> <td>7%</td> </tr> </table>	Índice de similitud	26%	Similitud según fuente		Internet Sources:	22%	Publicaciones:	5%	Trabajos del estudiante:	7%
Índice de similitud	26%										
Similitud según fuente											
Internet Sources:	22%										
Publicaciones:	5%										
Trabajos del estudiante:	7%										
5% match (Internet desde 24-jul.-2023) <a href="http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83793/10693042602022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2">http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83793/10693042602022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2</a>											
5% match () <a href="#">Ortiz Sánchez, Alejandra Paola. "Evaluación de las interacciones vasculares de los principios metabolitos activos presentes en <i>Croton schiedeanus</i> ("Almirillo")". 2018</a>											
4% match (trabajos de los estudiantes desde 11-dic.-2020) <a href="#">Submitted to Universidad Nacional de Colombia on 2020-12-11</a>											
2% match (Internet desde 16-ene.-2023) <a href="https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77788/Tesis%20David%20Borda.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=1">https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77788/Tesis%20David%20Borda.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=1</a>											
1% match (Internet desde 25-sept.-2022) <a href="https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82145/52886876_2022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=3">https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82145/52886876_2022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=3</a>											
1% match (Internet desde 13-may.-2023) <a href="http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/13268/3/2022A001133.pdf">http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/13268/3/2022A001133.pdf</a>											
1% match (Internet desde 17-sept.-2017) <a href="http://ir.library.osaka-u.ac.jp/dspace/bitstream/11094/2504/1/22704_%e8%ab%96%e6%96%87.pdf">http://ir.library.osaka-u.ac.jp/dspace/bitstream/11094/2504/1/22704_%e8%ab%96%e6%96%87.pdf</a>											
< 1% match (Internet desde 09-jul.-2023) <a href="http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/52208/1/INASANARRIABECFERRA_2017.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=1">http://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/52208/1/INASANARRIABECFERRA_2017.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=1</a>											
< 1% match () <a href="#">León Peña, Juan Carlos. "Estudio químico y evaluación de la actividad antihipertensiva y antiagregante plaquetaria del extracto de peridermis de <i>Solanum tuberosum</i> (SOLANACEAE)". 2017</a>											
< 1% match (Internet desde 03-feb.-2023) <a href="https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83280/40043535_2022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2">https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83280/40043535_2022.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2</a>											
< 1% match (Internet desde 25-sept.-2022) <a href="https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82277/52415581-2021.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2">https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82277/52415581-2021.pdf?isAllowed=v&amp;sequence=2</a>											
< 1% match () <a href="#">Juvó Rojas, Deissy Katherine. "Novel organ-specific genetic factors for quantitative resistance to late blight in potato". Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá. 2019</a>											
< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 24-jun.-2021) <a href="#">Submitted to Universidad Nacional de Colombia on 2021-06-24</a>											
< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 02-may.-2015) <a href="#">Submitted to Universidad Nacional de Colombia on 2015-05-02</a>											
< 1% match () <a href="#">Troya Estayillo, María. "Avances en el uso del plasma rico en factores de crecimiento en la regeneración periodontal.". 2018</a>											
< 1% match () <a href="#">Rueda Calle, Elov. "Evaluación de la eficacia y seguridad de Ácido acetilsalicílico de liberación sostenida en pacientes con cardiopatía isquémica de evolución crónica".</a>											