



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Efecto inhibitorio *in vitro* de cumarinas disustituidas en la
agregación de plaquetas humanas inducidas por epinefrina,
colágeno y ADP”**

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

PRESENTA:

Sergio Galicia Zapatero

Director de tesis:

Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México.

Marzo, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos PAPIIT-UNAM IN220517 y IN232020 en el laboratorio de Farmacología celular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, bajo la dirección del Doctor Fausto Alejandro Jiménez Orozco. En colaboración con el Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis, Unidad Externa de la Facultad de Medicina en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. También se contó con la colaboración del Dr. Fernando León-Cedeño del laboratorio de Química Orgánica, de la Facultad de Química en la UNAM

“Los profesores afectan a la eternidad; nadie puede decir donde se termina su influencia”

Henry Brooks Adams (1838 – 1918)

“Es mi sincero deseo que algunos de ustedes continúen con este trabajo científico y mantengan para su ambición la determinación de hacer una contribución permanente a la ciencia”

Maria Salomea Skłodowska-Curie (1867 - 1934)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme en la máxima casa de estudios y darme las herramientas necesarias para formarme como Biólogo.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala donde pude formarme como Biólogo, gracias a cada uno de los excelentes profesores, quienes me compartieron su conocimiento y experiencia en su área de trabajo. Me siento orgulloso de pertenecer a esta Facultad, así como de sus instalaciones y de todo el personal académico que en ella labora.

Al Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco, por confiar en mí, abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar este proyecto de investigación. Además de brindarme las herramientas necesarias para cumplir cada uno de los objetivos y compartirme sus conocimientos adquiridos a lo largo de su trayectoria como investigador y sus estancias en otros países.

A la Dra. Aurora de la Peña Díaz responsable del Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis, Unidad Externa de la Facultad de Medicina en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y su equipo, por facilitar todo lo necesario para la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando León-Cedeño del laboratorio de Química Orgánica, de la Facultad de Química (UNAM) y a su equipo de trabajo, por el apoyo tanto en la fase teórica como en la experimental.

A la Técnico Académico QFB Ma. Juana García Mondragón por la asesoría en cuanto al manejo de animales y la ejecución de otras técnicas en el laboratorio. También por compartirme su experiencia académica y docente. Por los consejos y las charlas que en algunas ocasiones terminaban en risas y situaciones graciosas. Así como a la auxiliar de laboratorio Nerea por las pláticas y consejos brindados.

A mis compañeros de laboratorio Manuel y Andony, quienes me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo. Por las pláticas y los consejos que me hacían ver las cosas desde otro punto de vista.

A la Dra. María Margarita Canales Martínez, al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y al Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla por revisar y enriquecer con sus conocimientos y experiencia el presente trabajo.

DEDICATORIA

En primer lugar y de manera muy especial, quiero dedicarla a María Elena Galicia Zapatero por todo el apoyo incondicional brindado durante estos años. Gracias por recorrer a mi lado todo el camino que culmina con este trabajo, pero significa el inicio de nuevos proyectos. Por confiar siempre en mí a pesar de las incontables veces que fallé. Nunca olvidaré todos los esfuerzos que realizaste para que pudiera cumplir mis sueños y darme una mejor calidad de vida. Espero poder compensar todo el apoyo que me has brindado y compartir mis nuevos logros contigo, te amo mamá

A mi abuela María de Jesús, a mis tías Ana María y María Virginia por el apoyo en cada una de las etapas académicas y personales. Gracias por estar al pendiente de mí y por sus consejos que me ayudaron a culminar con esta etapa académica y en seguir con mi formación más allá de ser un biólogo.

A mis primos, Cecilia, Mireya, Rodrigo y Mario†, por estar al pendiente y alentarme a cumplir mis objetivos académicos, buscar nuevos objetivos y por su apoyo incondicional.

A manera de invitación y no como ejemplo para mis primos, Ana Karen, Diego, Santiago Elías, Víctor Ulises e Itzel, para que se propongan metas a corto y largo plazo, tanto personales como académicas. También para externarles mi apoyo en cualquiera de los aspectos y etapas de su vida tanto en lo personal como en lo académico.

A mi amiga de la carrera Diana Gómez, por su amistad incondicional y su apoyo en cada uno de los semestres. Por compartirme experiencias personales y académicas. A mi amiga Diana Laura por hacer más amena mi estancia en la carrera y por los famosísimos equipos de tres.

A la familia Fernández Quezada por su apoyo y abrirme las puertas de su casa.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICAS	10
RESUMEN	11
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características generales de las plaquetas	1
1.1.1 Morfología plaquetaria	2
1.2 Hemostasia	5
1.2.1 Hemostasia primaria	5
1.2.2 Hemostasia secundaria	8
1.2.3 Fibrinólisis	9
1.3 Mecanismos que limitan la activación y la agregación plaquetaria	9
1.4 Técnicas para evaluar la función plaquetaria.	10
1.5 Agregación plaquetaria en plasma rico (PRP)	13
1.6 Tipos de curva de agregación	13
1.7 Cumarinas	14
1.7.1 Historia	14
1.7.2 Metabolismo y toxicidad de la cumarina	16
1.7.3 Propiedades farmacológicas de las cumarinas	18
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3 JUSTIFICACIÓN	21
4 HIPÓTESIS	25
5 OBJETIVO GENERAL	25
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	25
6 MATERIAL Y MÉTODO	26
6.1 Equipo	26
6.2 Material adicional	26
6.3 Reactivos	26
6.4 Preparación de soluciones	26
6.5 Obtención de las muestras	27

6.6	Procesamiento de la muestra	27
6.7	Ensayo de agregación plaquetaria	27
7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
8	RESULTADOS	29
9	DISCUSIÓN	36
10	CONCLUSIONES	39
11	BIBLIOGRAFÍA	40
12	APÉNDICE	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 FORMACIÓN Y LIBERACIÓN DE PLAQUETAS. PRINCIPALES EVENTOS QUE OCURREN, CUANDO LOS MEGACARIOCITOS PASAN DE CÉLULAS INMADURAS A PLAQUETAS CIRCULANTES (HARTWIG E ITALIANO, 2006 Y PATEL ET AL., 2005)	1
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LA PLAQUETA. LA FIGURA CORRESPONDE A UNA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE SECCIÓN DELGADA DE PLAQUETAS DISCOIDES EN CORTE TRANSVERSAL, EN LA CUAL PODEMOS OBSERVAR LOS PRINCIPALES COMPONENTES PLAQUETARIOS (HARTWIG ET AL., 1999) 2	2
FIGURA 3 ACTIVACIÓN PLAQUETARIA E INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES Y LAS PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CIRCULANTES. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SEPARAN A LAS PLAQUETAS DE LAS PROTEÍNAS DE ADHESIÓN A TRAVÉS DE LA PRODUCCIÓN DE INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA (KAUSHANSKY ET AL., 2006).....	6
FIGURA 4 AGREGACIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LAS PLAQUETAS. ESTE EVENTO SE PRODUCE CUANDO LAS GLICOPROTEÍNAS DE ADHESIÓN SE UNEN SIMULTÁNEAMENTE A LOS RECEPTORES DE LA INTEGRINA α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) EN DOS PLAQUETAS DIFERENTES (KAUSHANSKY ET AL., 2006).....	8
FIGURA 5 MECANISMOS QUE LIMITAN LA ACTIVACIÓN Y LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA. EN CONDICIONES NORMALES EXISTEN SEÑALES QUE INHIBEN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y LIMITAN EL TAMAÑO DEL TROMBO EN SITIO DE LESIÓN VASCULAR (NOE ET AL., 2010).....	10
FIGURA 6 DIPTERYX ODORATA, POSEE UNA GRAN GAMA DE METABOLITOS SECUNDARIOS. SUS METABOLITOS SECUNDARIOS SON UTILIZADOS COMO MATERIA PRIMA POR LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA (OLIVEROS ET AL., 2011).....	15
FIGURA 7 EL HABA TONKA Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS. LOS FRUTOS DEL ÁRBOL CONTIENEN UNA SOLA SEMILLA QUE MIDE 3-4 CM DE LARGO POR 1 CM DE ANCHO, ES DE COLOR NEGRO Y ARRUGADO. TIENE UNA AGRADABLE FRAGANCIA QUE EVOCA LA VAINILLA, LA ALMENDRA, LA CANELA Y EL CLAVO (OLIVEROS ET AL., 2011)	15
FIGURA 8 ACTIVACIÓN Y DESINTOXICACIÓN. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE LOS PASOS INICIALES EN LA VÍA DE ACTIVACIÓN (3,4-EPÓXIDO) Y DESINTOXICACIÓN (7-HIDROXICUMARINA) DE LA CUMARINA.	17
FIGURA 9 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE RECEPTORES DE PLAQUETAS Y SITIOS DE ACCIÓN. EN LA IMAGEN SE PROPORCIONA UNA DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS AGENTES DISPONIBLES, ASÍ COMO DE SUS OBJETIVOS PRINCIPALES Y SUS RESPECTIVAS VÍAS Y ETAPAS DE DESARROLLO HACIA LA ACTIVACIÓN. (COSTA -FILHO Y BOZZA, 2017).....	23
FIGURA 10 ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS EN EL PRESENTE TRABAJO. ESTRUCTURA DE LA CUMARINA Y 7 DERIVADOS CON SUSTITUCIONES EN LAS POSICIONES 6, 7 Y 8 Y LA NARINGINA	24
FIGURA 11 TRAZOS REPRESENTATIVOS DE LA AGREGACIÓN INDUCIDA CON LOS DIFERENTES AGONISTAS. CADA AGONISTA PRESENTA UN TRAZO CARACTERÍSTICO, EN LA FIGURA SE MUESTRAN LAS CURVAS CON CADA UNO DE LOS AGONISTAS Y EL TRAZO OBTENIDO AL ADICIONAR DAFNETINA A UNA CONCENTRACIÓN DE 200 μ M.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 PRINCIPALES COMPONENTES DE LOS GRÁNULOS PLAQUETARIOS. ESTOS GRÁNULOS CONTIENEN DIVERSAS MOLÉCULAS BIOACTIVAS QUE PARTICIPAN EN DIFERENTES FASES DE LA HEMOSTASIA.	3
TABLA 2 PRINCIPALES RECEPTORES PLAQUETARIOS Y SUS LIGANDOS. LA ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS DEPENDE DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL MEDIO EXTERNO E INTERNO Y SE CONSIGUE A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES MEMBRANALES.	4
TABLA 3 DIFERENTES METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA. EN LA TABLA SE DESCRIBEN LOS PRINCIPALES MÉTODOS PARA EVALUAR LA FUNCIÓN PLAQUETARIA, ASÍ COMO EL FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA (PANICCIA ET AL., 2015).	12
TABLA 4 PRINCIPALES PROPIEDADES REPORTADAS PARA LAS CUMARINAS. EN ESTA TABLA SE ENLISTAN LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS REPORTADAS PARA LAS CUMARINAS, LAS CUALES SE ENCUENTRAN AMPLIAMENTE DOCUMENTADAS (STEFANACHI ET AL., 2018)	19
TABLA 5 AGREGACIÓN INDUCIDA CON 5 μL DE EPINEFRINA (10 μM). CI_{50} Y PROMEDIO DE LA AGREGACIÓN A 200 μ M \pm DE.	30
TABLA 6 AGREGACIÓN INDUCIDA CON 1 μL DE COLÁGENO (2 μG/ML). CI_{50} , PROMEDIO DE LA INHIBICIÓN A 200 μ M \pm DE.	32
TABLA 7 AGREGACIÓN INDUCIDA CON 5 μL DE ADP (10 μM). CI_{50} , PROMEDIO DE LA INHIBICIÓN A 200 μ M \pm D.E.	34

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LOS COMPUESTOS CUMARÍNICOS EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR EPINEFRINA. EN LA GRÁFICA SE PUEDE DIFERENCIAR CLARAMENTE LA POTENCIA Y EFICACIA DE CADA UNO DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS LO QUE PERMITE CLASIFICARLOS EN TRES GRUPOS CON BASE A SU EFECTO ANTIAGREGANTE. LA DAFNETINA, ESCULETINA Y 6,7-DIMETOXICUMARINA FUERON LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS.	31
GRÁFICA 2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A LAS CONCENTRACIONES DE 50, 100, 200 Y 400 μM EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA CON EPINEFRINA. LOS COMPUESTOS 6,7-DIHIROXICUMARINA, 6,7-DIMETOXICUMARINA Y 7,8-DIHIROXICUMARINA, TUVIERON UNA EFICACIA CERCANA AL 100%, A LA CONCENTRACIÓN DE 200 μ M. MIENTRAS QUE, CUMARINA, 6,7-DIACETOXICUMARINA, 7,8-DIMETOXICUMARINA Y 7,8-DIACETOXICUMARINA, MOSTRARON UN EFECTO CERCANO AL 100%, A LA CONCENTRACIÓN DE 400 μ M. LA 6,7-DIMETOXI, 4-METILCUMARINA Y LA NARINGINA NO MOSTRARON NINGÚN EFECTO ($P < 0.05$).	31
GRÁFICA 3 PORCENTAJE DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPUESTOS CUMARÍNICOS EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR COLÁGENO. EN LA GRÁFICA SE OBSERVA LA POTENCIA Y EFICACIA DE CADA UNO DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS. LOS MÁS POTENTES Y EFICACES SON 6,7-DIMETOXICUMARINA Y 7,8-DIHIROXICUMARINA.	33
GRÁFICA 4 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A LAS CONCENTRACIONES DE 50, 100, 200 Y 400 μM EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR COLÁGENO. LOS COMPUESTOS 6,7-DIMETOXICUMARINA Y 7,8-DIHIROXICUMARINA TUVIERON UNA EFICACIA CERCANA AL 100% A LA CONCENTRACIÓN DE 200 μ M. LOS COMPUESTOS CUMARINA Y 6,7-DIHIROXICUMARINA TUVIERON UNA EFICACIA CERCANA AL 100%, SOLO A 400 μ M. LA 6,7-DIMETOXI, 4-METILCUMARINA Y LA NARINGINA NO MOSTRARON NINGÚN EFECTO EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR COLÁGENO ($P < 0.05$).	33
GRÁFICA 5 PORCENTAJE DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS COMPUESTOS CUMARÍNICOS EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR ADP. SOLO 6,7-DIMETOXICUMARINA INHIBIÓ EN MÁS DEL 50% LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA A LA CONCENTRACIÓN DE 400 μ M.	35
GRÁFICA 6 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN LAS CONCENTRACIONES DE 50, 100, 200 Y 400 μM, EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA CON ADP. LOS COMPUESTOS 6,7-DIMETOXICUMARINA Y 7,8-DIHIROXICUMARINA TUVIERON EL MAYOR EFECTO INHIBITORIO A LA CONCENTRACIÓN DE 200 μ M. LA 6,7-DIACETOXICUMARINA, 6,7-DIMETOXI, 4-METILCUMARINA, 7,8-DIACETOXICUMARINA Y 7,8-DIACETOXICUMARINA NO MOSTRARON NINGÚN EFECTO EN LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR ADP ($P < 0.05$).	35

RESUMEN

La inhibición de la activación plaquetaria es una importante medida terapéutica para la prevención de trombosis arterial, infarto de miocardio, y accidentes cerebrovasculares. La hiperactividad plaquetaria residual es una de las principales causas del fracaso terapéutico de la terapia dual (ácido acetilsalicílico y clopidogrel). Aunque se ha documentado que los antagonistas adrenérgicos β no selectivos disminuyen la hiperactividad plaquetaria residual, no hay agentes antiplaquetarios con uso terapéutico que actúen a través de este importante mecanismo de acción. Se ha documentado ampliamente que algunos fitoquímicos tienen efecto antiagregante, a través de la inhibición de las vías inducidas por ácido araquidónico, tromboxano A₂, el ionóforo de calcio (A23187), colágeno y ADP. Las cumarinas son moléculas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en plantas medicinales, como en las de consumo humano y son utilizadas ampliamente en la industria cosmética. En las últimas décadas se han documentado los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos de estos compuestos. Pero, aún no se describe ampliamente el efecto antiagregante de estos compuestos cumarínicos, así como de algunos de sus derivados.

En el presente trabajo comparamos la actividad antiplaquetaria in vitro de la cumarina, 7 derivados con sustituciones en las posiciones 6, 7 y 8, así como de la naringina, sobre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina, colágeno y ADP. La mayor actividad inhibitoria se observó cuando se estimuló la agregación plaquetaria con epinefrina, seguida por la estimulación con colágeno y con ADP se observó la menor respuesta inhibitoria. Las moléculas más activas fueron 6,7-Dihidroxicumarina (esculetina), 6,7-Dimetoxicumarina y 7,8-Dihidroxicumarina (dafnetina). Las acciones antiplaquetarias de las cumarinas evaluadas en el presente trabajo muestran un gran potencial para coadyuvar a la terapia antiplaquetaria de pacientes que no respondan adecuadamente a la terapia convencional.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de las plaquetas

Las plaquetas se originan a partir de los megacariocitos (MK) de la medula ósea provenientes de las células madre pluripotentes. Los megacariocitos son células mieloides que constituyen menos del 0.1% de la población celular de la medula ósea, este porcentaje puede estar regulado por factores como la trombopoyetina (TPO), las quimiocinas o la expresión localizada de los ligandos para receptores de la superficie de los megacariocitos. Posteriormente, los megacariocitos se someten a múltiples endomitosis (Nishimura et al., 2015).

A partir de la membrana plasmática de los MK maduros, se forman largas prolongaciones a la luz del vaso (proplaquetas) de las que posteriormente se desprenderán las plaquetas debido a la fuerza del torrente sanguíneo (*Figura 1*) (Larson y Watson, 2006). Un solo megacariocito puede producir de 1000 a 3000 plaquetas aproximadamente (Geddis y Kaushansky, 2004). La trombopoyetina es la hormona que permite el adecuado desarrollo de las plaquetas. Esta hormona se sintetiza en el músculo liso, la medula ósea, riñón e hígado (Jurk y Kehrel, 2005).

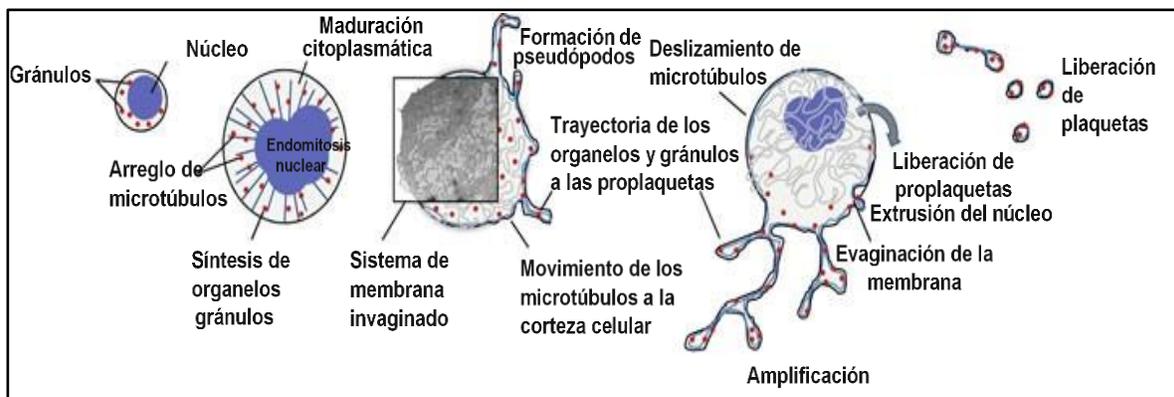


Figura 1 Formación y liberación de plaquetas. Principales eventos que ocurren, cuando los megacariocitos pasan de células inmaduras a plaquetas circulantes (Hartwig e Italiano, 2006 y Patel et al., 2005)

Las plaquetas son células anucleadas de forma discoide (en reposo) de aproximadamente 0.5 x 3.0 μm . Un humano contiene alrededor de 150-400 x10⁹ plaquetas por litro de sangre total y cada una tiene una vida promedio de 8-10 días, posteriores a la formación y separación del megacariocito (Kaushansky, 2006). Las plaquetas están involucradas tanto en la hemostasia normal (eventos trombóticos hereditarios o adquiridos), como en la inmunidad y en la inflamación (Gómez- Gómez et al., 2018). Su principal función es la formación de agregados plaquetarios estables en los sitios donde se produce una lesión vascular, mediante la adhesión a las proteínas de la matriz subendotelial expuesta. También participan en la regulación de la angiogénesis y en la inmunidad innata (Avecilla et al., 2004).

1.1.1 Morfología plaquetaria

El citoesqueleto de la plaqueta es el responsable de mantener la estabilidad de la membrana y de regular los cambios morfológicos posteriores a la activación. Entre las principales proteínas que componen el citoesqueleto se encuentran actina, miosina y talina (Lam et al., 2015). También cuenta con un sistema de canalículos que se encargan del tráfico de los diferentes mensajeros y proteínas en la activación plaquetaria; un sistema canalicular abierto (SCA) y un sistema tubular denso (STD) (Figura 2).

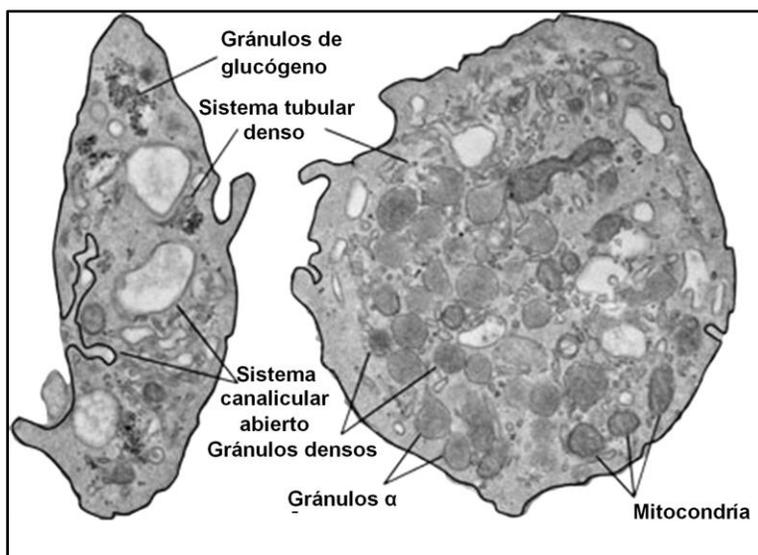


Figura 2. Características ultraestructurales de la plaqueta. La figura corresponde a una micrografía electrónica de sección delgada de plaquetas discoide en corte transversal, en la cual podemos observar los principales componentes plaquetarios (Hartwig et al., 1999)

El sistema canalicular abierto consiste en invaginaciones tubulares que conectan con la membrana externa y se encarga de incorporar las proteínas del exterior (Blair y Flaumenhaft, 2009). El sistema tubular denso se deriva del retículo endoplásmico del megacariocito y se encarga de capturar Ca^{2+} que posteriormente es liberado una vez que se activa la plaqueta (Weyrich et al., 2009). El citoplasma es rico en glucógeno y carece de ribosomas, ya que no se sintetizan proteínas en él. Los principales organelos contenidos en las plaquetas son; gránulos alfa (α), gránulos densos, lisosomas y microperoxisomas.

Los gránulos α y los cuerpos densos participan en la hemostasia liberando su contenido (*Tabla 1*), como respuesta ante un estímulo o un daño (Jurk y Kehrel, 2005). Los lisosomas se producen a partir del sistema de la membrana endosomal, a través de un mecanismo que involucra la clasificación y el tráfico de proteínas. El contenido lisosómico se libera de manera más lenta en comparación al de los gránulos α y los cuerpos densos, por lo tanto, requieren de agonistas fuertes para su liberación.

Tabla 1 Principales componentes de los gránulos plaquetarios. Estos gránulos contienen diversas moléculas bioactivas que participan en diferentes fases de la hemostasia.

Cuerpos densos	Gránulos α	Lisosomas
<ul style="list-style-type: none"> • Medidores de la función plaquetaria y la hemostasia • Adenosín difosfato (ADP) • Fosfatos • Calcio • Serotonina 	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de von Willebrand (FvW) • Fibrinógeno • Plasminógeno • B-Tromboglobulina • Albúmina • Trombospondina • Fibronectina • Selectina P • Factor V • Factor VIII • PGDF 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrolasas ácidas • Catepsinas • Colagenasas • Endoglucosidasa • Elastasa

Por otra parte, la membrana plaquetaria tiene una bicapa lipoproteica con glicoproteínas (GP) que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos (ADP, TXA₂, trombina, epinefrina y colágeno) en la agregación plaquetaria, además de poseer enzimas importantes para el funcionamiento celular (Kasperska-Zajac et al., 2005). También figuran integrinas que se caracterizan por enlazarse a proteínas que portan la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD): fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, FvW, y colágeno (*Tabla 2*) (Lam et al., 2015).

Tabla 2 Principales receptores plaquetarios y sus ligandos. La activación de las plaquetas depende de la interacción entre el medio externo e interno y se consigue a través de los receptores membranales.

Ligando	Receptor	Familia
ADP	P2Y ₁	G (G _q)
	P2Y ₁₂	G (G _i)
Trombina	PAR1	G (G _q)
	PAR4	G (G _q)
Serotonina	5HT	G
Tromboxano	TP	G (G _{13/q})
Adrenalina	α _{2A}	G (G _i)
Prostaciclina	IP	G (G _s)
Colágeno	GPVI	Inmunoglobulinas
	Fcγ-RII	
	α ₂ β ₁	Integrinas
Fibronectina	α ₅ β ₁	
Laminina	α ₆ β ₁	
Fibrinógeno, FvW	αIIβ ₃	
FvW	GPIb/Ix	Glicoproteínas (LRR)
PSGL-1	P-Selectina	Receptores de lectina de tipo C

1.2 Hemostasia

La hemostasia es un proceso en el que participan elementos celulares y plasmáticos. Sus funciones principales son; mantener la sangre en un estado líquido y fluido de tal manera que permita la circulación en los vasos sanguíneos y detener la hemorragia ante una lesión vascular (Raskob et al., 2014). Este proceso se divide en 3 fases, hemostasia primaria, hemostasia secundaria o fase plasmática de la coagulación y fibrinólisis

1.2.1 Hemostasia primaria

La hemostasia primaria es el proceso inicial de la coagulación y su principal objetivo es activar las plaquetas y crear un tapón plaquetario como respuesta ante un daño en el endotelio vascular. Durante esta fase las plaquetas sufren una serie de transformaciones que permiten la interacción plaqueta-plaqueta y el reclutamiento plaquetario para la formación del tapón. Esta fase se divide en 4 etapas; 1) adhesión, 2) activación, 3) amplificación y secreción, 4) agregación (Broos et al., 2011).

1. Adhesión

En esta fase se dan las primeras uniones inestables o de baja afinidad entre las plaquetas con el subendotelio expuesto. Se activan algunas cinasas relevantes para la siguiente fase. Este fenómeno es rápido, en condiciones normales, se inicia de 1 a 2 segundos posteriores a la ruptura del vaso y de la adhesión de las plaquetas a los bordes del corte, en condiciones normales. (Savage et al., 2002).

El FvW soluble que circula en el plasma se une tanto al colágeno endotelial, como al receptor plaquetario GPIIb/IIIa (Kim et al., 2010). La unión del ligando de $\alpha_2\beta_1$ y de las Integrinas β_1 y β_3 estimula la interacción entre plaquetas. Las primeras interacciones entre las plaquetas y la matriz extracelular se dan según las tasas de corte. En arteriolas y vénulas (tasa de corte $>1000 \text{ s}^{-1}$) la interacción se da entre la glucoproteína GPIIb/IIIa y FvW, mientras que en arterias y venas grandes (tasa de corte $<1000 \text{ s}^{-1}$) se

lleva a cabo por los receptores para colágeno GPIa/IIa y GPVI (Herr et al 2009, Kawamura et al 2009).

2. Activación

Tras la unión estable de las plaquetas a la pared del vaso dañado, se inducen diferentes cascadas de señalización que convergen en puntos críticos para la liberación de gránulos (*Figura 3*). En esta fase, la plaqueta se contrae y sufre cambios morfológicos que permiten la interacción plaqueta -plaqueta.

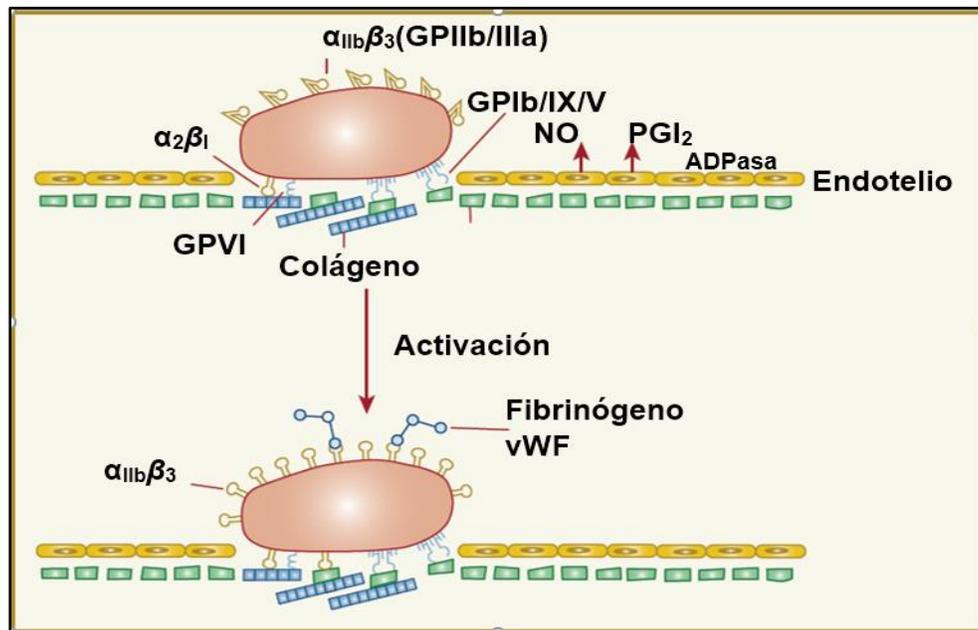


Figura 3 Activación plaquetaria e interacción entre los receptores y las proteínas de adhesión circulantes. Las células endoteliales separan a las plaquetas de las proteínas de adhesión a través de la producción de inhibidores de la función plaquetaria (Kaushansky et al., 2006).

La mayoría de los agonistas de la activación plaquetaria actúan a través de la fosfolipasa C. En la membrana, el agonista se une al receptor y activa proteínas G, en su mayoría de las subfamilias G_q y G_i . Esta unión estimula a la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) y como consecuencia se induce la formación de dos importantes mensajeros; el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG). El IP_3

permite la movilización del calcio de la membrana del STD hacia el citosol mientras que el DAG activa la proteínkinasa C (PKC) (Kaushansky et al., 2006)

3. Amplificación y secreción

Una vez que se libera el calcio al citosol en presencia de la calmodulina, se activa la fosforilación de la miosina. Esta es la única forma de unión entre la miosina y la actina. Como consecuencia, la plaqueta cambia de su forma discoidea a una forma con protrusiones citoplasmáticas o pseudópodos (plaqueta activada).

Posteriormente se liberan los gránulos al citoplasma, estos se fusionan con la membrana externa de la plaqueta formando invaginaciones para posteriormente verter su contenido en el medio. El sinergismo entre el calcio y la PKC promueve la degranulación plaquetaria. Los gránulos liberados contienen activadores plaquetarios importantes que producen una retroalimentación de señales, la cual actúa de forma paracrina y autocrina.

4. Agregación

Posteriormente a la liberación granular, el tapón hemostático continua en una fase de agregación. Las plaquetas se agregan entre si a través del receptor para fibrinógeno GPIIb/IIIa, también conocido como integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Este fenómeno conduce a la formación de un trombo rico en fibrina y marca el inicio de la siguiente etapa, la hemostasia secundaria (Kulkarni et al., 2000).

La agregación se produce en dos fases: primaria y secundaria. En la agregación primaria las plaquetas se adhieren laxamente entre sí, debido a un estímulo débil, esta fase es reversible. La agregación secundaria tarda más tiempo en ocurrir e inicia

debido a la síntesis de tromboxano A₂. En esta fase las plaquetas liberan su propio ADP y otras moléculas almacenadas en los gránulos (*Figura 4*).

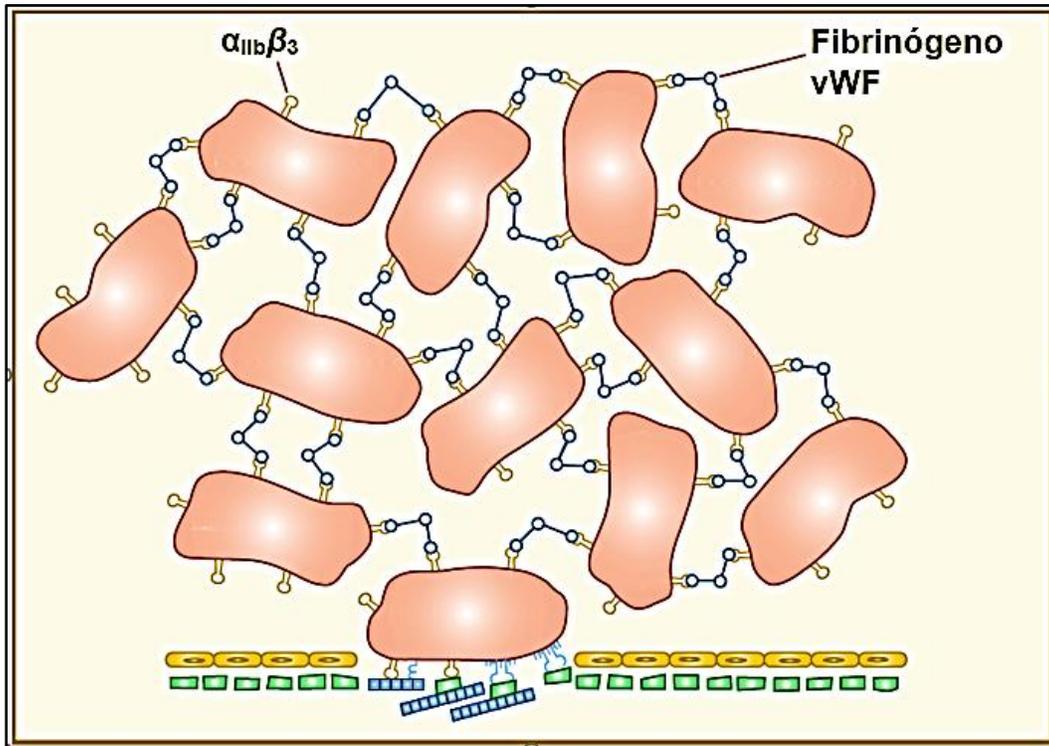


Figura 4 Agregación primaria y secundaria de las plaquetas. Este evento se produce cuando las glicoproteínas de adhesión se unen simultáneamente a los receptores de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) en dos plaquetas diferentes (Kaushansky et al., 2006)

1.2.2 Hemostasia secundaria

En la hemostasia secundaria, interactúan proteínas plasmáticas o factores que se activan en una serie compleja de reacciones que culminan con la formación de un coágulo rico en fibrina. Como resultado, se forma una malla que refuerza el tapón plaquetario inicial formando un coágulo definitivo. En el proceso intervienen factores de la coagulación y proteínas anticoagulantes (antitrombina, proteína C y proteína S) que evitan que la coagulación se lleve a cabo de manera generalizada (Huntington, 2012).

1.2.3 Fibrinólisis

Esta fase consiste en la transformación del plasminógeno a plasmina (su forma activa), la cual es capaz de degradar a la fibrina y eliminar el coágulo. Esto depende de la acción proteolítica del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA). La plasmina digiere la fibrina del coágulo y la transforma en productos de digestión del fibrinógeno (PDF) que contienen residuos de lisina y arginina en la posición carboxilo terminal (Ünlü et al., 2017).

1.3 Mecanismos que limitan la activación y la agregación plaquetaria

En condiciones normales, existen señales que inhiben la activación plaquetaria y limitan el tamaño del trombo en sitio de la lesión vascular (*Figura 5*). Por otra parte, las plaquetas en reposo no se pueden unir a la superficie de las células endoteliales debido, a la repulsión eléctrica ocasionada por la carga negativa del heparán sulfato (Reitsma et al., 2011).

El aumento de AMP cíclico (AMPc) es una de las principales señales inhibitorias de la agregación plaquetaria, que resulta de la estimulación de receptores acoplados a proteínas G_s que activan a la enzima adenilato ciclasa, la cual sintetiza a este segundo mensajero (Stitham et al., 2007). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA) que fosforila e inhibe a la cinasa de cadena ligera de miosina, lo que impide la fosforilación de estas proteínas que participan en la contracción y cambio morfológico durante la activación plaquetaria (Noe et al., 2010).

Por otra parte, la PKA disminuye los niveles de calcio intraplaquetario, fosforilando e inactivando los canales de IP₃ en el sistema tubular denso, pero también activando los sistemas de recaptura de calcio en ese mismo reservorio a través de las proteínas vasodilatadoras (Noe et al., 2010). Otra forma de incidir en la actividad de la PKA es a través de la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) que son las enzimas que degradan al AMPc (Sun et al., 2007). Algunos ejemplos de receptores que participan en la vía de AMPc-PKA son los de adenosina, los de prostaciclina (PGI₂) y el adrenoreceptor β₂ (AR-β₂) que están acoplados a proteínas G_s.

En las plaquetas el óxido nítrico (NO) es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (ONS), a partir de la L-arginina. El NO derivado del endotelio, se difunde a través de la membrana plaquetaria y se une a la guanilato ciclasa soluble (GCs). Esto aumenta los niveles de GMPc intracelular y estimula la actividad de la PKG. Como consecuencia se mantienen bajos los niveles de calcio intracelular, se inhibe el reordenamiento del citoesqueleto plaquetario, la activación de la integrina y la secreción de gránulos densos (Walter y Gambaryan, 2009).

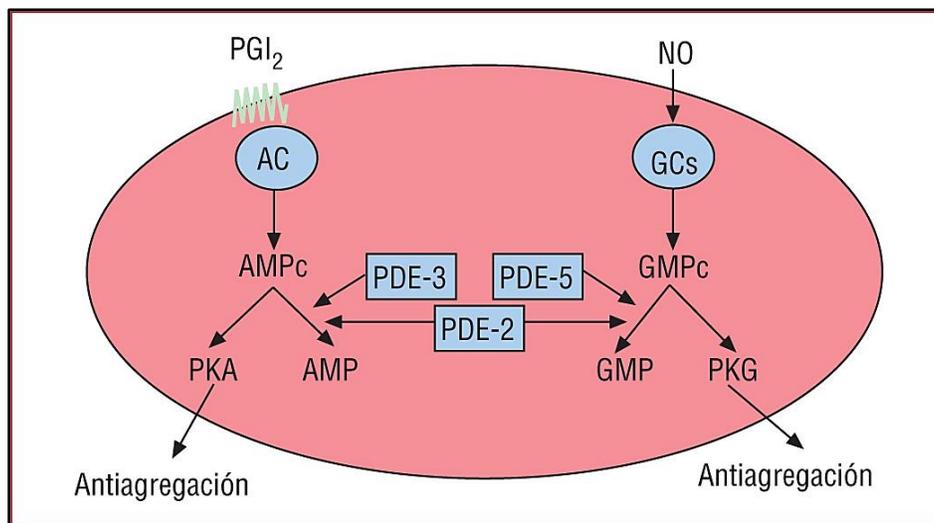


Figura 5 Mecanismos que limitan la activación y la agregación plaquetaria. En condiciones normales existen señales que inhiben la activación plaquetaria y limitan el tamaño del trombo en sitio de lesión vascular (Noe et al., 2010)

1.4 Técnicas para evaluar la función plaquetaria.

En lesiones ateroscleróticas, las plaquetas forman trombos con un núcleo plaquetario rico en P-selectina. El trombo está rodeado por una cubierta de plaquetas que dependerán de una retroalimentación secundaria a través de varios receptores (Stalker et al., 2013). La formación de trombos puede ocasionar accidentes cerebro vasculares o infarto al miocardio (Shukla, 1999). Por lo que las disfunciones plaquetarias heredadas o adquiridas deben ser diagnosticadas de manera rápida, ya que es muy importante identificar a los pacientes con mayor riesgo de presentar hemorragias. La monitorización de la función plaquetaria permite identificar pacientes con hipo o hiperrespuesta y con riesgo de trombosis o hemorragia (Pakala y Waksman, 2011)

En los últimos años, la evaluación de la función plaquetaria se ha vuelto cada vez más necesaria en diversos entornos clínicos, por ejemplo, a) para identificar pacientes con trastornos hemorrágicos, b) para controlar la respuesta al tratamiento plaquetario, c) para evaluar la hemostasia preoperatoria d) en la medicina transfusional (Kehrel y Brodde, 2013).

Las pruebas de función plaquetaria simulan el proceso de adhesión y de agregación lo que permite la cuantificación de la respuesta plaquetaria, la identificación de una función anormal y posteriormente, el diagnóstico de individuos con defectos en alguna fase de este proceso (Jackson, 2007).

Los diferentes métodos para evaluar la función plaquetaria pueden basarse en alguna de las fases de la hemostasia primaria, en condiciones especiales de cizallamiento y en el análisis de las propiedades físicas del coágulo (Pakala y Waksman, 2011) (*Tabla 3*). El método de Agregometría plaquetaria por transmisión de luz (ATL) establecido por Brien y Born es considerado como el estándar de oro en la agregometría plaquetaria. Esta técnica se basa en el método turbidimétrico; el cual permite evaluar y monitorear *in vitro* muestras de pacientes que presentan hemorragias causadas por trombocitopatías y valorar el efecto de los fármacos antiplaquetarios (Rand et al., 2003).

Tabla 3 Diferentes metodologías para la evaluación de la función plaquetaria. En la tabla se describen los principales métodos para evaluar la función plaquetaria, así como el fundamento de la técnica (Paniccia et al., 2015).

Método	Muestra	Aplicación de método	Principio del método	
Tiempo de sangrado	Sangre total	Prueba de detección	Medición <i>in vivo</i> del bloqueo hemorrágico	
Pruebas basadas en la agregación plaquetaria				
Agregometría plaquetaria por transmisión de luz (ATL)	PRP	Detección de tendencia hemorrágica, diagnóstico de defectos plaquetarios y monitoreo del tratamiento antiplaquetario	Medición foto-óptica del aumento de la transmisión de luz en relación con la agregación plaquetaria	
Impedancia	Sangre total		Medición del aumento de la impedancia eléctrica en relación con la agregación plaquetaria	
Lumi-agregometría			Detección de trastornos de almacenamiento/liberación	Agregación combinada con luminiscencia
Función plaquetaria			Monitoreo de la respuesta plaquetaria a diferentes agentes antiplaquetarios	Recuento de plaquetas antes y después de la activación
Pruebas basadas en la adhesión plaquetaria (tasa de cizallamiento)				
PFA-100 PFA-200	Sangre total	Evaluación de riesgo de sangrado, efectos de fármacos y búsqueda de disfunciones plaquetarias	Evaluación del tiempo de flujo, (alto cizallamiento) bloqueado por el tapón plaquetario	
Prueba de trombosis global		Evaluación de la función plaquetaria y trombólisis	Formación del tapón plaquetario dependiente de la velocidad de cizallamiento	
Métodos de función plaquetaria combinados con prueba viscoelástica				
TEG	Sangre total	Evaluación de la hemostasia global y monitoreo de tratamientos antiplaquetarios	Formación de coágulos	
ROTEM			Impedancia eléctrica en relación con la agregación	
Análisis por citometría de flujo				
Citometría de flujo	Sangre total, PRP	Conteo, detección, activación y biomarcadores plaquetarios	Detección basada en laser	

1.5 Agregación plaquetaria en plasma rico (PRP)

El agregómetro mide el promedio de la agregación plaquetaria, que proviene de la diferencia de densidad óptica que existe entre, el PRP y el plasma pobre en plaquetas (PPP). La transmitancia es directamente proporcional al número de plaquetas que se activan y se agregan. El equipo está acoplado a un sistema computarizado, el cual digitaliza los resultados en forma de curva, así como el tiempo de latencia y el porcentaje máximo de respuesta (O'Brien y Bor, 1962).

La curva resultante proporciona la rapidez de la respuesta y cada fragmento proporciona información de las plaquetas como, el cambio morfológico, la generación de pseudópodos y la secreción del contenido de los gránulos (Gómez-Gómez et al., 2018). Antes de la adición del agonista se observa una oscilación al azar de la línea, después de la adición, se produce un retraso en la respuesta (Hayward et al., 2009).

La función plaquetaria, se evalúa *in vitro* con el uso de diferentes agonistas, como adenosina difosfato (ADP), epinefrina, colágeno, trombina y ácido araquidónico (Zhou y Schmaier, 2005). Cada agonista tiene un diferente mecanismo fisiológico de acción; por ejemplo, la activación del receptor de ADP P2Y₁₂ y de los adrenoreceptores α_{2A} (AR- α_{2A}) y α_{2B} (AR- α_{2B}) inducen el cambio conformacional de GPIIb/IIIa su forma activa, lo que permite tanto la unión a fibrinógeno, cómo la unión entre plaquetas (Kottke-Marchant y Corcoran, 2002). El colágeno y la trombina inducen la liberación de ADP y tromboxano A₂ (TxA₂) (Seegmiller y Sarode, 2007).

1.6 Tipos de curva de agregación

Cada agonista presenta características específicas en su gráfico, ya que interactúa con receptores específicos de la plaqueta. La curva de agregación puede ser monofásica o bifásica. Cuando se utiliza ácido araquidónico, colágeno y agonistas del receptor para trombina, el tipo de curva resultante es monofásica. El acoplamiento estímulo-respuesta inducido por el agonista, se produce antes que cualquier respuesta de agregación y como

consecuencia en la curva resultante no se observa distinción entre la onda de agregación primaria y la secundaria (Charo et al.,1997).

Los llamados agonistas débiles, como ADP y epinefrina, producen una curva de agregación bifásica, (*Figura 11*). Se les considera agonistas débiles porque tienen una secreción dependiente de la agregación. En la primera fase, se inicia la formación de agregados plaquetarios pequeños que corresponde al ascenso de la curva (fase primaria) (Kehrel y Brodde, 2013). Esto activa la transducción de las señales internas en la plaqueta que estimulan la liberación de los contenidos granulares que promueven la fase secundaria. Si no se estimula la liberación del contenido granular la línea reversará y descenderá hasta la base (Rodgers et al., 2006).

1.7 Cumarinas

En el mundo, muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, contienen cierto porcentaje cumarínico. La cumarina representa un andamio para múltiples químicos medicinales (warfarina, acenocumarina y fenprocumón), gracias a sus características fisicoquímicas y a su versátil transformación sintética en una gran variedad de cumarinas funcionalizadas. Las propiedades farmacológicas de las cumarinas dependen de su estructura central (cumarinas simples, cumarinas policíclicas, cumarinas fusionadas, biscumarinas) y del patrón de sustitución (Stefanachi et al., 2018).

1.7.1 Historia

La cumarina fue aislada por primera vez en 1820 por Vogel, a partir de semillas pertenecientes al árbol *Dipteryx odorata* (*Figura 6*). Este árbol pertenece a la familia Fabaceae, cuya semilla también es conocida como; haba tonka, cumaruna, cumarú, cumbarú, sarrapia o tagua (*Figura 7*). Desde entonces, se ha reportado el aislamiento, la caracterización

estructural, la síntesis y la actividad biológica de miles de derivados cumarínicos (O’Kennedy y Thornes, 1997).



Figura 6 *Dipteryx odorata*, posee una gran gama de metabolitos secundarios. Sus metabolitos secundarios son utilizados como materia prima por la industria farmacéutica (Oliveros et al., 2011)

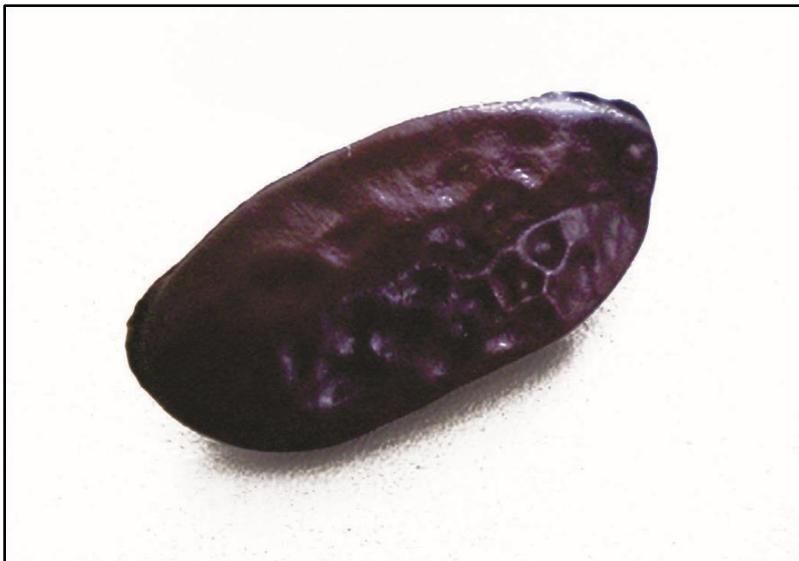


Figura 7 El Haba tonka y sus principales características. Los frutos del árbol contienen una sola semilla que mide 3-4 cm de largo por 1 cm de ancho, es de color negro y arrugado. Tiene una agradable fragancia que evoca la vainilla, la almendra, la canela y el clavo (Oliveros et al., 2011)

Esta molécula ha sido ampliamente estudiada ya que, muchos agentes biológicamente activos parten de esta estructura (Stefanachi et al., 2018). Los anticoagulantes orales son los medicamentos con estructura cumarínica que se recetan con frecuencia para tratar y prevenir la tromboembolia (Su et al., 2012). Este grupo de sustancias se descubrió en 1920, al observar hemorragias fatales en vacas después de comer montones de heno de trébol dulce en mal estado, en la década de 1920 (Baggiolini et al., 2015).

Después de varios años, los investigadores pudieron aislar y sintetizar el primer dicumarol de cumarina. Una forma más potente de este medicamento, la warfarina, inicialmente utilizada como veneno para ratas, se introdujo como un anticoagulante oral en la década de 1950 y actualmente es el anticoagulante oral más utilizado. Estas moléculas requieren de un grupo hidroxilo en la posición 4 y de un sustituyente no polar en la posición 3 del núcleo cumarínico para inhibir a las reductasas de vitamina K, que es lo que origina sus acciones anticoagulantes (Venugopala et al., 2013). Sin embargo, la cumarina misma y algunos de sus derivados, como los estudiados en el presente trabajo, carecen de actividad anticoagulante, pero tienen acciones antiagregantes.

La exposición alimentaria a las cumarinas es bastante alta, ya que se encuentran en verduras, frutas, semillas, nueces, café, té y vino. Se estima que la dieta occidental promedio puede contener aproximadamente 1 g/día de benzopironas, principalmente cumarinas y flavonoides (Lake, 1999).

1.7.2 Metabolismo y toxicidad de la cumarina

Se han descrito principalmente dos vías de metabolismo para la cumarina que es dependiente de la especie. Amplios estudios han demostrado que la cumarina es biotransformada rápidamente en el hígado a 7-hidroxycumarina por el citocromo CYP2A6 en los humanos, y por el CYP2A5 en cepas de ratones. Posteriormente la molécula es conjugada en el grupo hidroxilo a ácido glucurónico para ser eliminada a través de secreción tubular renal en la orina (Raunio et al., 2012). Otros posibles metabolitos de la cumarina son la 3,4-Dihidrocumarina (DHC) y las cumarinas hidroxiladas en las posiciones 4, 5, 6 y 8, que se forman en una extensión mucho menor que en la posición 7 (Kai et al., 2008).

En otras especies, como la rata, a través de otros citocromos, la cumarina es biotransformada a 3,4-epóxido que es un metabolito hepatotóxico. Esto dio lugar a que en los años 50 la Food Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés) clasificara a esta molécula como carcinogénica categoría 1 (Egan et., al 1990) (*Figura 8*).

Debido a que las cumarinas también han sido utilizadas en la industria cosmética y de la perfumería, se han realizados numerosos estudios de biotransformación, toxicidad y carcinogenicidad de estas moléculas para evaluar su seguridad en los humanos (Cohen et al., 1978).

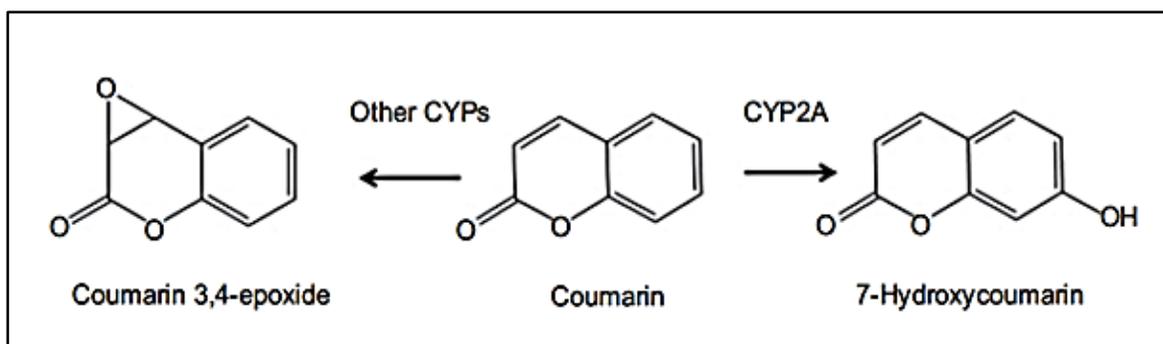


Figura 8 Activación y desintoxicación. Esquema simplificado de los pasos iniciales en la vía de activación (3,4-epóxido) y desintoxicación (7-hidroxicumarina) de la cumarina.

Por una parte, existen revisiones donde los autores concluyen que la exposición diaria de cumarinas que reciben los humanos no representa ningún riesgo para la salud (Hartwig et al., 1999; Lacy et al., 2004) y estudios clínicos multicéntricos han reportado baja toxicidad de la cumarina en el humano (Cox et al., 1989). Por otro lado, se han reportado casos de toxicidad en pacientes con linfedema tratados con cumarina incluso a bajas dosis (Farinola et al., 2007).

Aunque se ha reportado que los humanos son eficientes biotransformadores de la cumarina, algunos autores proponen que la toxicidad observada se debe a la existencia de poblaciones con isoformas del CYP2A6 con baja actividad, que biotransforma la molécula a la posición 3 y posteriormente a la vía hepatotóxica 3,4 epóxido (Farinola et al., 2007; Hu et al., 2017). Sin embargo, la evidencia de los estudios farmacogenéticos no es contundente y los casos de toxicidad reportados con la cumarina permanecen como idiopáticos.

Curiosamente, en estudios recientes basados en datos en humanos establecieron la ingesta diaria tolerable (TDI) de cumarina en 0.1 mg/kg de peso corporal. En Alemania, durante la temporada navideña el TDI de cumarina se rebasa a menudo por el consumo de canela (*Cinnamomum cassia*). Por lo tanto, para la mayoría de la población que consume cantidades moderadas de canela no se espera ningún riesgo de hepatotoxicidad, a menos que pertenezcan al subgrupo sensible (Abraham et al., 2010)

1.7.3 Propiedades farmacológicas de las cumarinas

Las numerosas propiedades farmacológicas de las cumarinas dependen de su estructura central y del patrón de sustitución, el cual le permite unirse de manera más fácil a diversos objetivos proteicos. El tipo de sustituyentes y el patrón de sustitución determinan, la energía y la potencia de unión, así como las interacciones selectivas de los distintos derivados cumarínicos estableciendo finalmente su perfil biofarmacológico. A continuación, se enlistan las propiedades farmacológicas de las cumarinas (*Tabla 4*).

Tabla 4 Principales propiedades reportadas para las cumarinas. En esta tabla se enlistan las propiedades farmacológicas reportadas para las cumarinas, las cuales se encuentran ampliamente documentadas (Stefanachi et al., 2018)

Propiedades farmacológicas	Referencia
Antibacteriana	Penta, 2015; O’Kennedy y Thornes, 1997
Antituberculoso	Keri et al., 2015
Antifúngica	Khan et al., 2004
Antiviral	Neyts et al., 2009
Antimutagénico	Matsumoto et al., 2017
Antioxidante	Bubols et al., 2013
Eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	Al-Majedy et al., 2016
Antiinflamatorio	Kontogiorgis y Hadjipavlou-Litina, 2005
Antitrombótico	Jain et al., 2013
Anticancerígeno	Sashidhara et al., 2010
Anticoagulante	Abdelhafez et al., 2010
Inhibidor de ciclooxigenasa, lipoxigenasa, colinesterasa (ChE), monoamina oxidasa (MAO)	Nargotra et al., 2011; Kwon et al., 2011
Estimulante del SNC	Patill et al., 2013
Vasodilatador	Najmanová et al., 2015
Efectos citotóxicos en líneas celulares	Jiménez Orozco et al 1999, 2001 y 2011; Kostova, 2005

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reactividad plaquetaria residual, también llamada “resistencia”, es un problema clínico en el que los enfermos presentan dificultad para inhibir la actividad plaquetaria aun después de haber sido tratados con dosis apropiadas de antiagregantes plaquetarios.

Algunos estudios han analizado los efectos antiplaquetarios de varias cumarinas sobre la agregación inducida por colágeno, ADP, trombina, el factor activador de plaquetas, el análogo de tromboxano A₂ (U-46619) y el ionóforo de calcio A23187 (Chen et al., 1996; Di Braccio et al., 2004; Kontogiorgis et al., 2015).

Se ha reportado que la 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina podría ser particularmente útil, ya que su efecto antiplaquetario es el resultado tanto, de la inhibición de COX-1, como del antagonismo del receptor para TxA₂ (Macáková et al., 2012). Sin embargo, existe poca información sobre la actividad inhibitoria de cumarinas simples en vías de agregación inducidas por otros agonistas como la epinefrina.

Estudios clínicos recientes demuestran que los antagonistas β no específicos disminuyen la reactividad plaquetaria residual en pacientes que reciben ácido acetilsalicílico y clopidogrel como terapia antiplaquetaria (Ilardi et al., 2018; Ignjatovic et al., 2016). Otros grupos han propuesto la síntesis de antagonistas adrenérgicos α_{2B} como agentes antiplaquetarios para disminuir la reactividad plaquetaria residual (Marketou et al., 2013; Marcinkowska et al., 2018). Estos reportes evidencian la importancia de desarrollar nuevas moléculas con fines antiplaquetarios que actúen sobre los adrenoreceptores.

El GPIIb/IIIa es otro blanco farmacológico relevante para el desarrollo de nuevos agentes antiagregantes y recientemente se ha reportado que algunas cumarinas tienen afinidad por esta proteína (Zaragoza et al., 2016). Sin embargo, los efectos antiagregantes que se han reportado no son del todo claros. El grupo de farmacología celular cuenta con distintos derivados cumarínicos que quizá podrían tener mayor actividad inhibitoria.

3 JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud señala que las enfermedades cardiovasculares, son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año en países de ingresos bajos y medianos, el 80% de las defunciones son causadas por este tipo de enfermedades. Dentro de las enfermedades cardiovasculares, la trombosis arterial es la principal causa de infarto al miocardio y de accidentes cerebrovasculares. Se prevé que para el 2030, aproximadamente 23,6 millones de personas morirán a causa de alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares (OMS, 2011).

La terapia antiplaquetaria tiene como principal blanco terapéutico receptores y enzimas que regulan la hemostasia primaria. Por ejemplo, la inhibición de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) con bajas dosis de ácido acetil salicílico (AAS) para prevenir la síntesis de tromboxano A₂ (TxA₂) durante la fase de activación plaquetaria.

El antagonismo de los receptores activados por ADP (P2Y₁ y P2Y₁₂) es otra estrategia relevante para inhibir la activación plaquetaria y la amplificación de la señal de transducción (Bross et al., 2011). Sin embargo, la respuesta plaquetaria de los pacientes tratados con clopidogrel, puede verse influenciada por diversos factores que limitan su uso. El más importante es la presencia de polimorfismos genéticos (Simon et al., 2008), que provocan un metabolismo deficiente y no permiten la formación adecuada del metabolito activo. Este punto ha tenido gran relevancia ya que, la FDA incluyó una nota en el empaque del medicamento; alertando de la posible falta de eficacia en algunos individuos y la necesidad de determinar los polimorfismos del CYP 420 antes del uso del medicamento (Costa-Filho y Bozza, 2017).

En el caso de pacientes que reciben el tratamiento de clopidogrel y AAS (terapia dual) existe un riesgo elevado de sufrir hemorragias y trombocitopenia como efecto adverso. En caso de pacientes con alto riesgo de agregación plaquetaria, como es el caso de los pacientes con síndromes coronarios agudos o que se someten a intervenciones coronarias percutáneas, se recomienda la terapia dual (Steinhubl et al., 2002). Sin embargo, durante dicho tratamiento, un importante número de pacientes desarrollan reactividad plaquetaria residual, que es una de las principales causas del fracaso terapéutico (Fiolaki et al., 2017).

Dentro de los blancos farmacológicos más novedosos que hasta ahora se han considerado para el desarrollo de nuevos agentes antiplaquetarios, están los antagonistas selectivos para los receptores de trombina PAR-1 y PAR-4 (voraxapar, atoxapar). La inhibición de diferentes receptores de colágeno ha sido propuesta como otro importante blanco terapéutico (Induruwa et al., 2016) y actualmente se ha identificado un metabolito activo de losartán que antagoniza el receptor de colágeno GPVI.

El receptor para fibrinógeno GPIIB/IIIa, es otro importante blanco farmacológico, existen anticuerpos monoclonales (abciximab y eptifibatida), así como una proteína de fusión (tirofiban) que inhiben la agregación plaquetaria, sin embargo, el alto costo de los biotecnológicos limita su uso sobre todo en los países en vías de desarrollo.

Aunque las terapias antiplaquetarias disponibles son relativamente seguras y efectivas, el tema de la alta reactividad plaquetaria residual en pacientes que reciben agentes antiplaquetarios se ha enfatizado en gran medida en la literatura temática. Por ello, es indispensable identificar fármacos antiplaquetarios más potentes, eficaces y seguros que actúen a través de mecanismos de acción diferentes a los de los agentes convencionales a fin de poder coadyuvar en el tratamiento antiplaquetario (*Figura 9*).

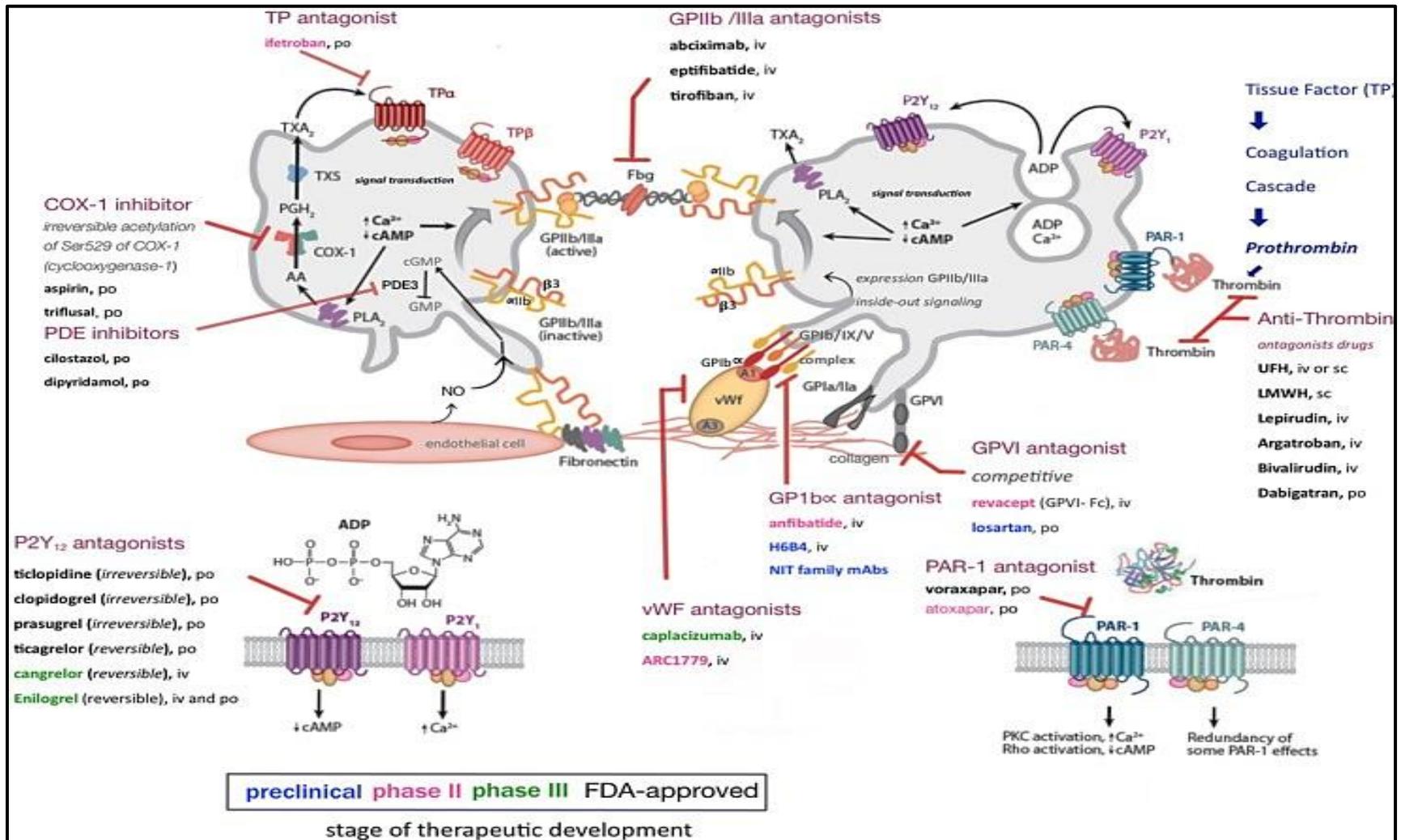


Figura 9 Diagrama esquemático de receptores de plaquetas y sitios de acción. En la imagen se proporciona una descripción general de los agentes disponibles, así como de sus objetivos principales y sus respectivas vías y etapas de desarrollo hacia la activación. (Costa -Filho y Bozza, 2017)

Las cumarinas son moléculas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en plantas medicinales, como en las de consumo humano y son utilizadas ampliamente en la industria cosmética (Lake, 1999) En las últimas décadas se han documentado los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos de estos compuestos (Kirsch et al., 2016). Pero, aun no se describe ampliamente el efecto antiagregante de estos compuestos cumarínicos, así como de algunos de sus derivados. Por lo que, en el presente trabajo se evaluó la cumarina y 7 derivados con sustituciones en las posiciones 6, 7 y 8 y de la Naringina (Figura 10).

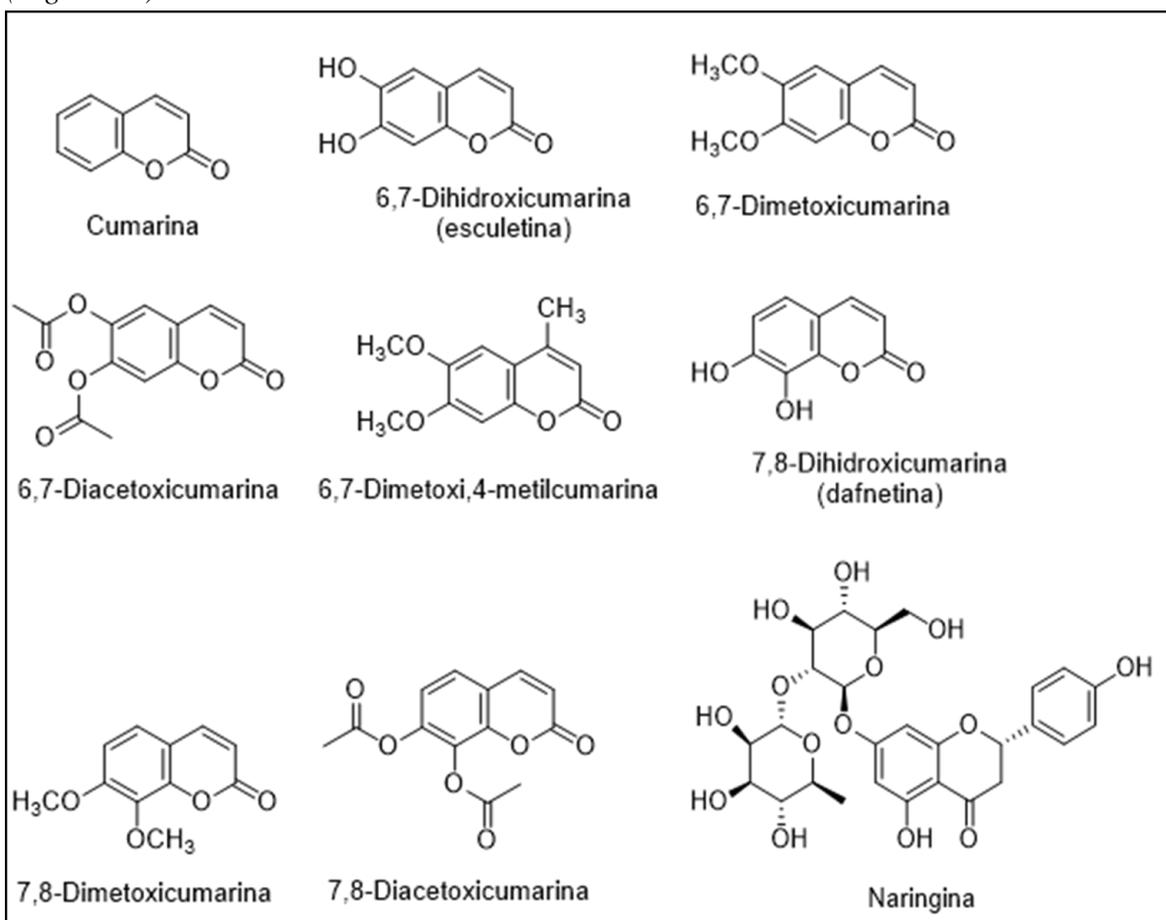


Figura 10 Estructura de los compuestos evaluados en el presente trabajo. Estructura de la cumarina y 7 derivados con sustituciones en las posiciones 6, 7 y 8 y la Naringina

4 HIPÓTESIS

Los compuestos cumarínicos inhibirán la agregación plaquetaria inducida por epinefrina, colágeno y ADP.

5 OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad antiplaquetaria *in vitro* de la cumarina, 7 derivados con sustituciones en las posiciones 6, 7 y 8, así como de naringina, sobre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por epinefrina, colágeno y ADP.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar curvas concentración-respuesta inhibitoria de la agregación plaquetaria y obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para cada uno de los compuestos cumarínicos y la naringina.
- Elaborar gráficos y tablas comparativas con los resultados obtenidos empleando como agonistas epinefrina, colágeno y ADP.
- Identificar los compuestos con mayor potencia y eficacia para inhibir la agregación plaquetaria inducida con epinefrina, colágeno y ADP.

6 MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Equipo

Agregómetro Chrono-Log, Modelo 700, Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometers, centrífuga PowerSpin™ LX y un analizador de hematología automatizado multiparamétrico Cell Dyn Ruby.

6.2 Material adicional

Las cubetas siliconizadas y las barras magnéticas fueron adquiridas de Chrono-PAR Corporation (Havertown, PA, EE. UU.) CHRONO-LOG®. Los tubos con citrato de sodio y sistema de vacío fueron adquiridos a BD Vacutainer®

6.3 Reactivos

El adenosín difosfato, el colágeno y la epinefrina se obtuvieron de la empresa Chrono-PAR Corporation (Havertown, PA, EE. UU.) CHRONO-LOG®. La cumarina, la esculetina (6,7-dihidroxycumarina), 6,7-dimetoxicumarina, 6,7-Dimetoxi,4-Metilcumarina, la dafnetina (7,8-Dihidroxycumarina) y la naringina fueron adquiridas de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). La 6,7-Diacetoxicumarina, la 7,8-Dimetoxicumarina, la 7,8-Diacetoxicumarina y la 6-Hidroxi,7-Metoxicumarina fueron sintetizadas por el grupo del Dr. León-Cedeño en el laboratorio de Química Orgánica, de la Facultad de Química (UNAM).

6.4 Preparación de soluciones

Para realizar la curva de concentración-respuesta *in vitro* en plaquetas humanas, la dafnetina y la esculetina se disolvieron en etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemania). De cada compuesto se hicieron diluciones en PBS (estéril y con pH de 7.4) para alcanzar las concentraciones equimoleculares de 50, 100, 200, y 400 μ M.

La concentración final de etanol fue del 2% v/v, de tal manera que no modificó la respuesta biológica al comparar con las muestras control. El resto de los compuestos se disolvieron en DMSO y se probaron bajo las mismas condiciones. La concentración final de DMSO fue del 0.4 % v/v, la cual no modificó la respuesta biológica al comparar las muestras con el control.

6.5 Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Los donadores cumplieron los requisitos ya establecidos en el instituto para la donación de sangre. Previamente se solicitó su autorización para que una muestra de su sangre (5 mL) fuera utilizada con fines de Investigación (*APÉNDICE*). La técnica de extracción fue a través de una punción en la vena antecubital. Se descartaron los plasmas lipémicos y hemolizados, ya que en estas muestras el paso de la luz es deficiente y como consecuencia, los porcentajes de agregación resultantes serían incorrectos.

6.6 Procesamiento de la muestra

Las muestras obtenidas se centrifugaron a 1000 RPM (457 g) por 3 minutos para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP). Después, se realizó un pool con el PRP obtenido de todas las muestras. El remanente de células, se recentrifugó a 3500 RPM (1828 g) por 20 minutos, para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente se realizó un ajuste del PRP con el PPP, para tener un volumen final de 2.5×10^5 plaquetas/ μ L.

6.7 Ensayo de agregación plaquetaria

Para cada medición, el PRP ajustado (500 μ L) se incubó previamente a 37°C durante 5 minutos en el agregómetro. Posteriormente, se adicionó la concentración

correspondiente (10.3 μ l) de cada compuesto y se indujo la agregación plaquetaria con cada uno de los agonistas; epinefrina (10 μ M), colágeno (2 μ g/ml) y a ADP (10 μ M). El registro se detuvo hasta que el gráfico mostró una tendencia lineal (6-15 minutos). Se realizaron 6 experimentos independientes para cada uno de los compuestos. Los controles (PRP y disolvente) fueron considerados como el 100% de la respuesta y los controles de funcionalidad (PRP y agonista), se utilizaron para descartar que el disolvente interfiriera en el efecto antiagregante de los compuestos.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados por la prueba ANOVA y posteriormente por la prueba post-Dunnet. Los resultados se presentan con el promedio DS. El valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los cálculos se realizaron con el software GraphPad, PRISMA versión 7.04.

8 RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del agregómetro, empleando dafnetina a una concentración de 200 μM para cada uno de los agonistas inductores empleados. En particular la epinefrina muestra una curva bifásica de agregación plaquetaria, característica que se pierde en presencia de dafnetina, (*Figura 11A*). En la agregación inducida con colágeno (*Figura 11B*), la dafnetina inhibe la agregación de manera completa ya que no exhibe curva de agregación como lo hace en el control. Para la agregación inducida con ADP, la curva muestra una amplitud moderada en comparación con el control (*Figura 11C*) y los resultados obtenidos por los otros agonistas.

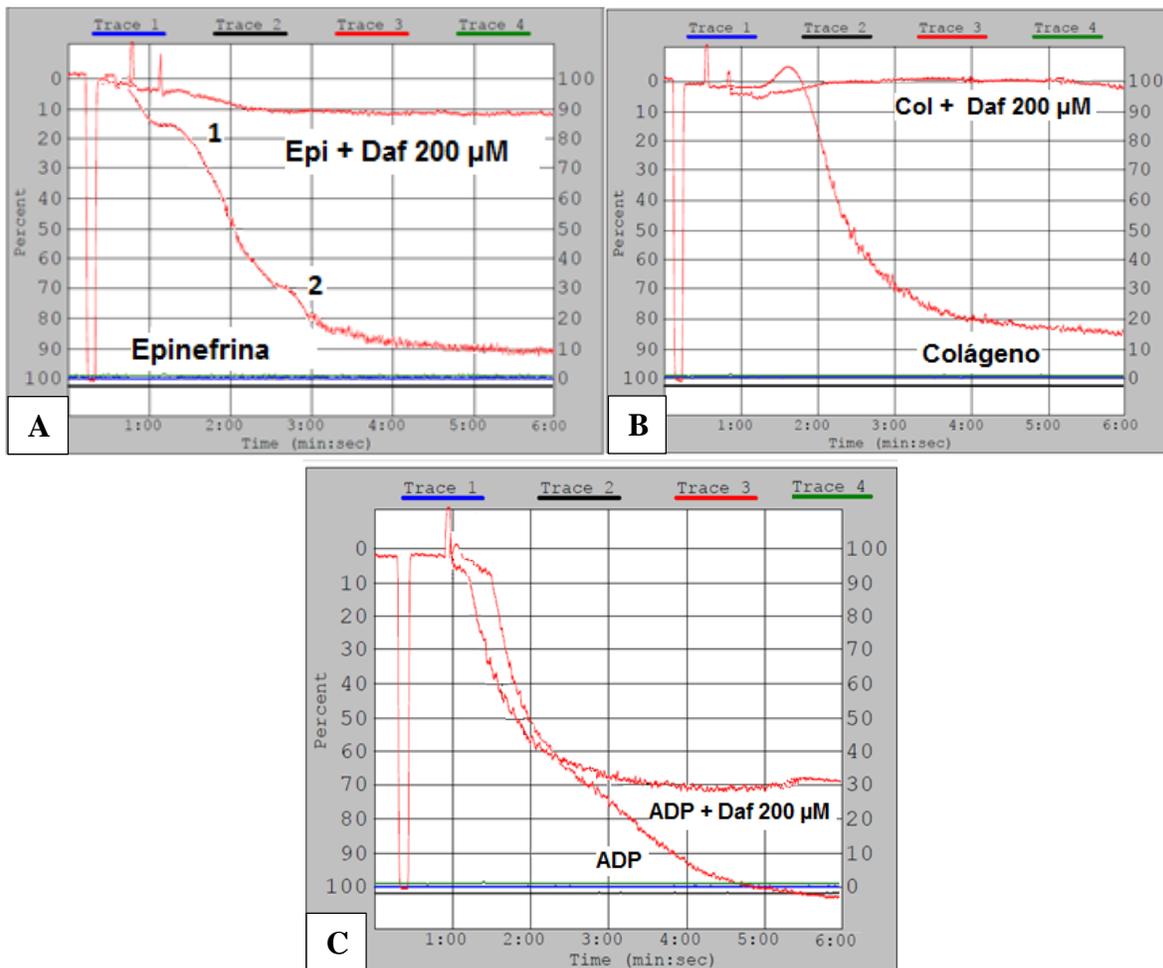


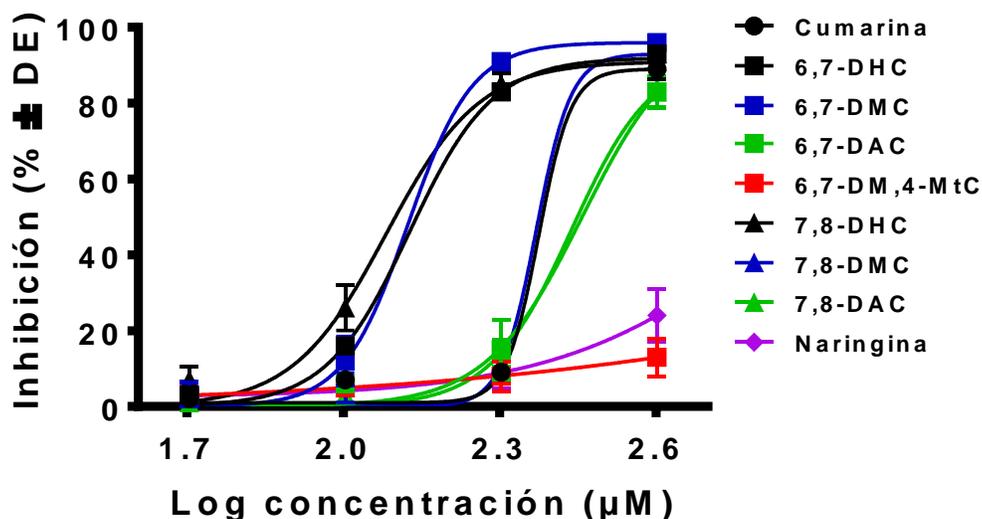
Figura 11 Trazos representativos de la agregación inducida con los diferentes agonistas. Cada agonista presenta un trazo característico, en la figura se muestran las curvas con cada uno de los agonistas y el trazo obtenido al adicionar dafnetina a una concentración de 200 μM .

Los compuestos cumarínicos evaluados, mostraron mayor actividad inhibitoria cuando se adicionó epinefrina como agente agonista, seguida por la agregación inducida con colágeno, siendo menor su potencia y eficacia. La menor actividad inhibitoria se observó al agregar ADP como agente agonista.

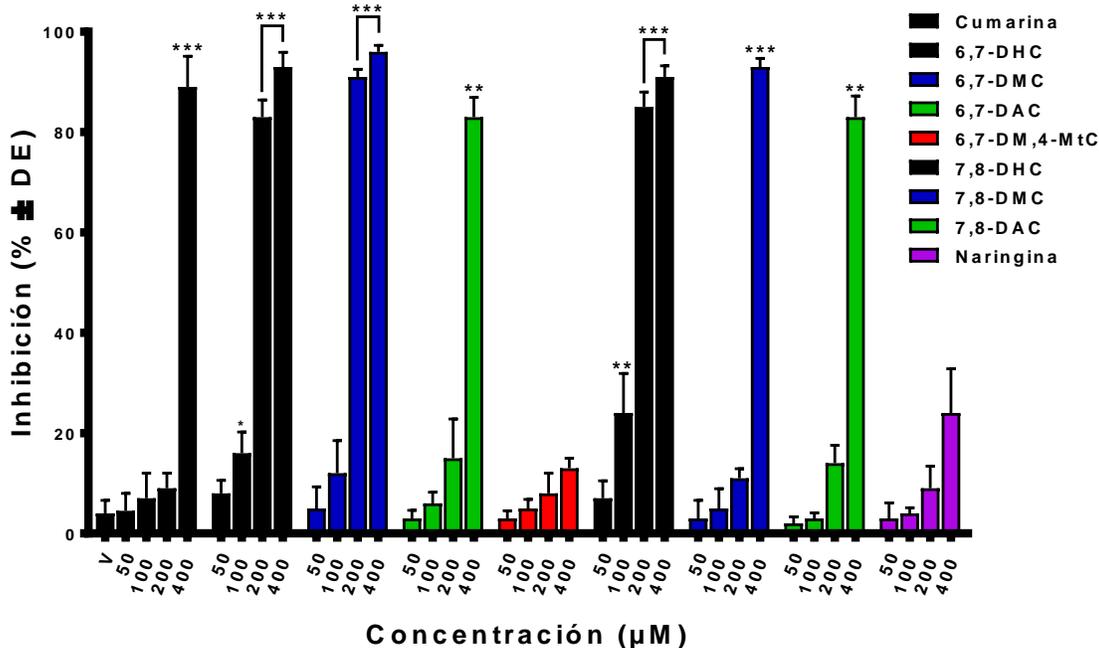
En la agregación inducida con epinefrina, la mayoría de los compuestos tuvieron una eficacia cercana al 100% (*Tabla 5*) y con base a su potencia, agrupamos a los compuestos en tres categorías (*Gráfica 1*): los más activos que tuvieron una CI_{50} menor a 150 μM (dafnetina, esculetina, 6,7-Dimetoxicumarina), los compuestos medianamente activos que tienen una CI_{50} entre 200 (*Gráfica 2*) y 325 μM (Cumarina, 6,7-Diacetoxicumarina, 7,8-Dimetoxicumarina, 7,8-Diacetoxicumarina) y compuestos poco activos cuando a la concentración de 400 μM , inhibieron en menos del 50% la agregación (6,7-Dimetoxi, 4-metilcumarina y Naringina).

Tabla 5 Agregación inducida con 5 μL de epinefrina (10 μM). CI_{50} y promedio de la agregación a 200 $\mu M \pm DE$.

EPINEFRINA		
Compuesto evaluado	CI_{50} (μM)	(%) Inhibición 200 μM
Cumarina	236 \pm 1.9	9 \pm 3
6,7-Dihidroxycumarina (esculetina)	139 \pm 3.9	83 \pm 3.4
6,7-Dimetoxicumarina	140 \pm 11.1	91 \pm 1.5
6,7-Diacetoxicumarina	325 \pm 9.9	15 \pm 7.8
6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina	> 400	8 \pm 4
7,8-Dihidroxycumarina (dafnetina)	123 \pm 5.1	85 \pm 3
7,8-Dimetoxicumarina	232 \pm 1	11 \pm 1.9
7,8-Diacetoxicumarina	279 \pm 6.1	14 \pm 3.6
Naringina	> 400	9 \pm 4.4



Gráfica 1 Porcentaje de inhibición de los compuestos cumarínicos en la agregación inducida por epinefrina. En la gráfica se puede diferenciar claramente la potencia y eficacia de cada uno de los compuestos evaluados lo que permite clasificarlos en tres grupos con base a su efecto antiagregante. La dafnetina, esculetina y 6,7-Dimetoxicumarina fueron los compuestos más activos.

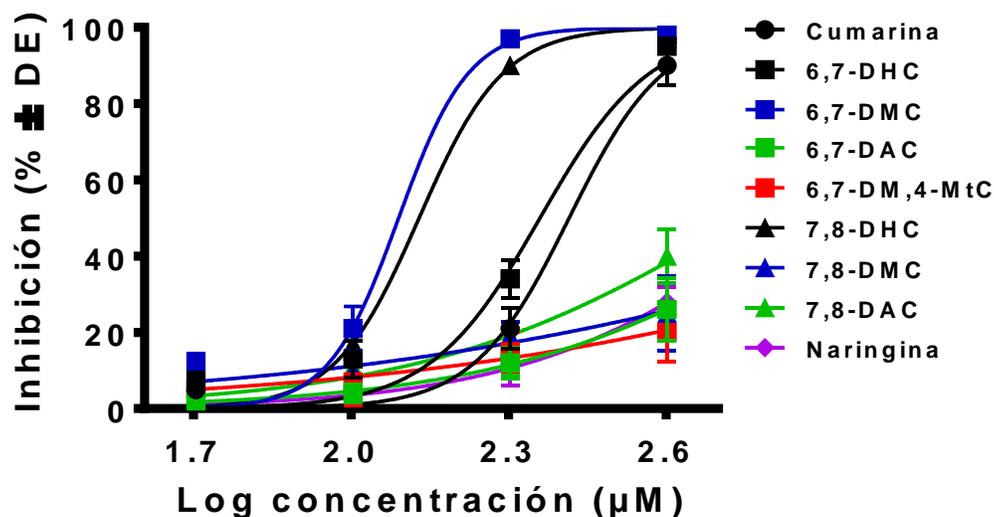


Gráfica 2 Porcentaje de inhibición a las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µM en la agregación inducida con epinefrina. Los compuestos 6,7-Dihidroxycumarina, 6,7-Dimetoxicumarina y 7,8-Dihidroxycumarina, tuvieron una eficacia cercana al 100%, a la concentración de 200 µM. Mientras que, Cumarina, 6,7-Diacetoxicumarina, 7,8-Dimetoxicumarina y 7,8-Diacetoxicumarina, mostraron un efecto cercano al 100%, a la concentración de 400 µM. La 6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina y la Naringina no mostraron ningún efecto ($p < 0.05$).

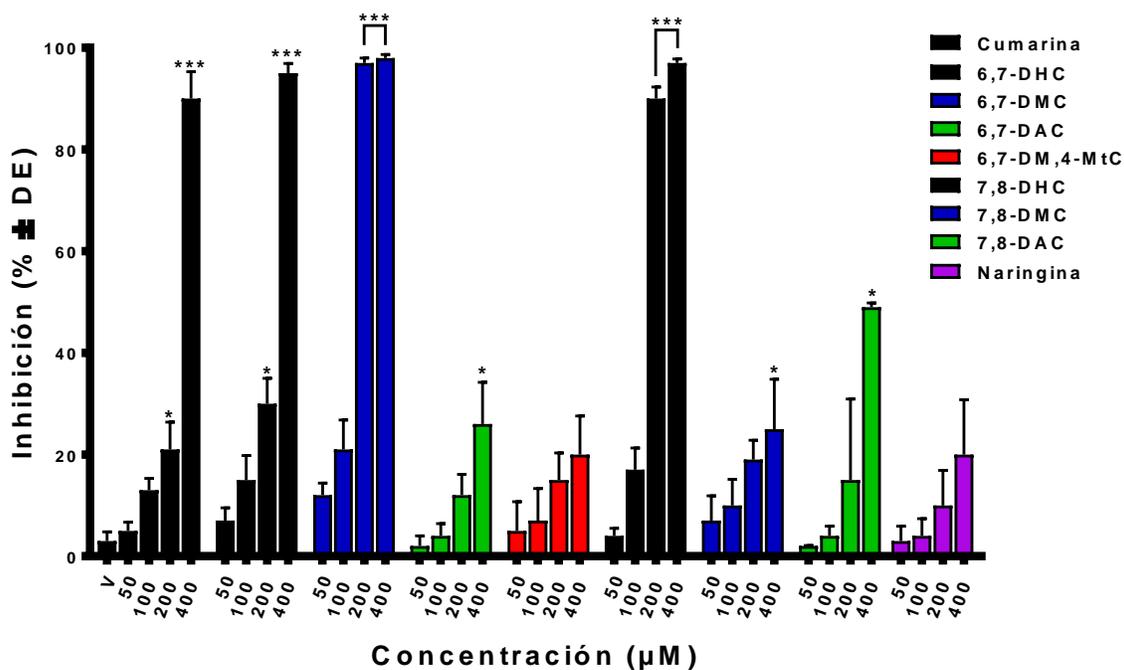
Para la agregación inducida por colágeno (Tabla 6), sólo cuatro compuestos tuvieron una eficacia cercana al 100% de la respuesta. Los compuestos altamente activos, que tuvieron CI_{50} menores a 150 μ M fueron dafnetina y 6,7-Dimetoxicumarina (Gráfica 3). Los dos compuestos medianamente activos que tuvieron CI_{50} entre 200 (Gráfica 4) y 300 μ M, fueron la cumarina y la esculetina. El resto de las moléculas no tuvieron actividad en las condiciones experimentales estudiadas.

Tabla 6 Agregación inducida con 1 μ L de colágeno (2 μ g/ml). CI_{50} , promedio de la inhibición a 200 μ M \pm DE.

COLÁGENO		
Compuesto evaluado	CI_{50} (μ M)	(%) Inhibición 200 μ M
Cumarina	233 \pm 2.6	21 \pm 5.4
6,7-Dihidroxycumarina (esculetina)	226 \pm 3.6	30 \pm 5.0
6,7-Dimetoxicumarina	122 \pm 7.3	97 \pm 1
6,7-Diacetoxicumarina	> 400	12 \pm 4.1
6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina	> 400	15 \pm 5.3
7,8-Dihidroxycumarina (dafnetina)	131 \pm 5.2	90 \pm 2.3
7,8-Dimetoxicumarina	> 400	19 \pm 3.8
7,8-Diacetoxicumarina	> 400	15 \pm 15.9
Naringina	> 400	10 \pm 6.9



Gráfica 3 Porcentaje del efecto inhibitorio de los compuestos cumarínicos en la agregación inducida por colágeno. En la gráfica se observa la potencia y eficacia de cada uno de los compuestos evaluados. Los más potentes y eficaces son 6,7-Dimetoxicumarina y 7,8-Dihidroxycumarina.

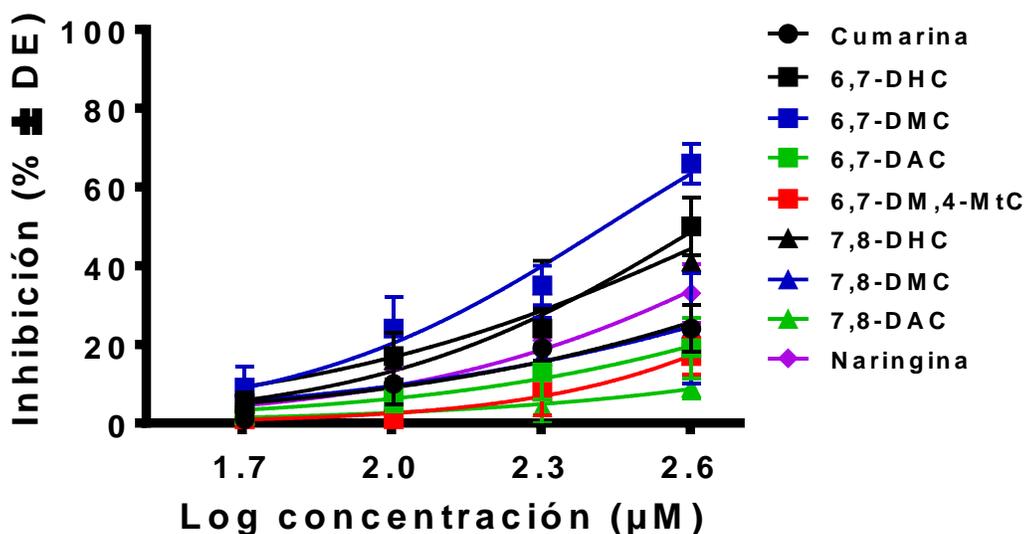


Gráfica 4 Porcentaje de inhibición a las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µM en la agregación inducida por colágeno. Los compuestos 6,7-Dimetoxicumarina y 7,8-Dihidroxycumarina tuvieron una eficacia cercana al 100% a la concentración de 200 µM. Los compuestos Cumarina y 6,7-Dihidroxycumarina tuvieron una eficacia cercana al 100%, solo a 400 µM. La 6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina y la Naringina no mostraron ningún efecto en la agregación inducida por colágeno ($p < 0.05$).

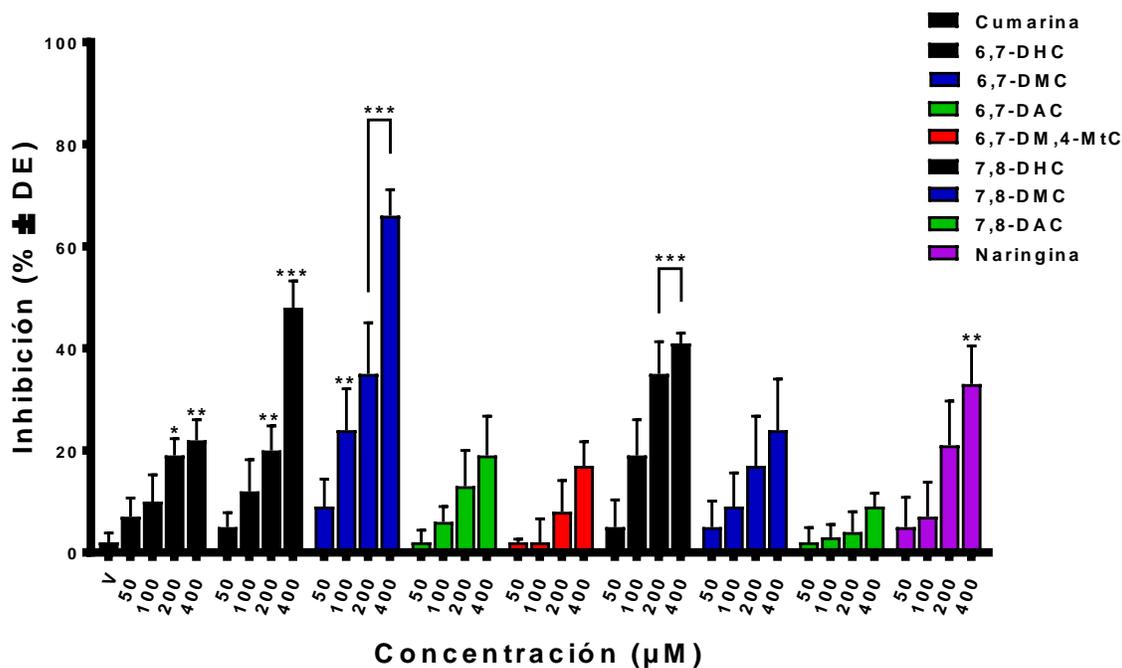
En la agregación inducida por ADP, (Tabla 7) los compuestos tuvieron una eficacia y potencia menor a la observada en las otras vías (Gráfica 5). La única molécula que inhibió la agregación plaquetaria en más del 50% fue la 6,7-Dimetoxicumarina a una concentración de $279 \pm 3.2 \mu\text{M}$ (Gráfica 6) Sólo la dafnetina y la esculetina mostraron un efecto inhibitorio a la concentración de $400 \mu\text{M}$ con una inhibición de 41 % y 50 % respectivamente.

Tabla 7 Agregación inducida con 5 μL de ADP (10 μM). CI_{50} , promedio de la inhibición a $200 \mu\text{M} \pm \text{D.E.}$

ADP		
Compuesto evaluado	CI_{50} (μM)	(%) Inhibición $200 \mu\text{M}$
Cumarina	> 400	19 ± 3.3
6,7-Dihydroxicumarina (esculetina)	> 400	24 ± 10.5
6,7-Dimetoxicumarina	279 ± 3.2	35 ± 15.8
6,7-Diacetoxicumarina	> 400	13 ± 7
6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina	> 400	15 ± 5.3
7,8-Dihydroxicumarina (dafnetina)	> 400	35 ± 6.3
7,8-Dimetoxicumarina	> 400	17 ± 9.7
7,8-Diacetoxicumarina	> 400	4 ± 4
Naringina	> 400	21 ± 8.7



Gráfica 5 Porcentaje del efecto inhibitorio de los compuestos cumarínicos en la agregación inducida por ADP. Solo 6,7-Dimetoxicumarina inhibió en más del 50% la agregación plaquetaria a la concentración de 400µM.



Gráfica 6 Porcentaje de inhibición las concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µM, en la agregación inducida con ADP. Los compuestos 6,7-Dimetoxicumarina y 7,8-Dihidroxycumarina tuvieron el mayor efecto inhibitorio a la concentración de 200 µM. La 6,7-Diacetoxicumarina, 6,7-Dimetoxi, 4-Metilcumarina, 7,8-Diacetoxicumarina y 7,8-Diacetoxicumarina no mostraron ningún efecto ($p < 0.05$).

9 DISCUSIÓN

A pesar de que las acciones de las catecolaminas han sido estudiadas ampliamente por diferentes grupos de investigación, la participación de los diferentes adrenoreceptores en la regulación de la agregación plaquetaria aún no es del todo clara. En las plaquetas hay una mayor proporción de adrenoreceptores α_{2A} (AR- α_{2A}) y α_{2B} (AR- α_{2B}) acoplados a proteína G_i , pero también una pequeña cantidad de AR- β_2 , acoplado a G_s (Steer et al 1982; Marketeu et al., 2013).

Como se ha descrito en la introducción (ver activación plaquetaria), las diferentes vías de señalización que incrementan el calcio intraplaquetario ($[Ca^{2+}]_{ip}$), favorecen la agregación, mientras que la vía de AMPc y PKA disminuye los niveles de $[Ca^{2+}]_{ip}$, por lo que actúan como una señal antiagregante. De esta manera, la activación de receptores acoplados a proteínas G_i , contribuyen a disminuir las señales de AMPc y a favorecer la elevación de $[Ca^{2+}]_{ip}$.

El efecto agregante de las catecolaminas se explica frecuentemente a través de la interacción con los AR- α_{2A} y AR- α_{2B} . Sin embargo, la epinefrina tiene mayor afinidad por el AR- β_2 y las acciones mediadas por este receptor no pueden considerarse insignificantes ya que, en experimentos *ex vivo*, antagonistas β inducen una reducción leve pero significativa en el contenido de AMPc intraplaquetario (Anfonssi et al., 1996). Estos datos son consistentes con recientes estudios clínicos donde se ha observado que antagonistas β no selectivos como el carvedilol, disminuyen la reactividad plaquetaria residual en pacientes con terapia doble (Ilardi et al 2018, Ignjatovic et al., 2016).

Algunos autores proponen que las acciones del carvedilol en la agregación plaquetaria residual se debe a la disminución de la presión arterial de los pacientes, así como a la disminución de las concentraciones de catecolaminas circulantes (Bonten et al.,2014). Sin embargo, también se han reportado acciones directas del carvedilol en la agregación plaquetaria, donde se propone que además de las acciones a través de receptores, debe haber interacciones con otras macromoléculas como canales y enzimas, así como efectos de estabilización de membrana debido a la alta lipofilia de la molécula (Petrikova et al., 2005).

Tanto la evidencia clínica, como la experimental, indica que los AR- β_2 son importantes blancos farmacológicos para disminuir la reactividad plaquetaria residual.

Otros grupos han propuesto el antagonismo del AR- α_{2B} , como una estrategia alternativa para el desarrollo de nuevos agentes antiplaquetarios (Marketeu et al., 2013). Recientemente, se han sintetizado antagonistas adrenérgicos α_{2B} con fines antiagregantes, lo que confirma la importancia del estudio al identificar moléculas que inhiben la agregación plaquetaria inducida por epinefrina (Marcinkowska et al., 2018).

Desconocemos sobre que componente de la vía activada por colágeno, podrían estar actuando las cumarinas. Los receptores de colágeno **GpVI** y GpIa/IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) tienen un papel fundamental en la hemostasia, así como en la activación del receptor de fibrinógeno **GPIIb/IIIa**.

El receptor **GPVI** tiene una región citoplasmática (FcR γ) con actividad catalítica semejante al inmunoreceptor de tirosina (ITAM), que transduce cascadas de señalización (Moroi et al., 2004, Getz et al., 2010). Este receptor tiene baja afinidad por el colágeno, pero a través de un sinergismo con la integrina $\alpha_2\beta_1$, activa a la integrina GPIIb/IIIa lo que permite una adhesión estable y firme de la plaqueta con pared el vaso (Herr et al., 2009, Auger et al., 2005, Induruwa et al., 2016).

El receptor **$\alpha_2\beta_1$** tiene alta afinidad por varias secuencias de colágeno, de las cuales la más relevante son Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg (Emsley et al., 2000). Se ha reportado que en pacientes que no expresan GPVI la integrina $\alpha_2\beta_1$ puede compensar la respuesta plaquetaria (Ludeman et al., 2004) La activación de los receptores para colágeno GpVI y GpIa/IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) incrementan la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , inducen la liberación de gránulos intraplaquetarios, formación de TXA₂ y finalmente, propician la activación sostenida del **receptor de fibrinógeno GPIIb/IIIa** (Broos et al., 2011).

El cambio de GPIIb/IIIa de un estado inactivo a otro activo, es un evento fundamental en la agregación plaquetaria (Brooss, 2011), y la inhibición de este blanco farmacológico es muy relevante para el desarrollo de nuevos agentes antiplaquetarios

El receptor para fibrinógeno **GPIIb/IIIa** es de alta afinidad y es el más abundante en la superficie plaquetaria. Este receptor es fundamental al final del proceso de adhesión ya que,

favorece uniones firmes con la matriz extracelular. Dichas uniones estimulan tanto cascadas de señalización tirosina cinasa, como de receptores acoplados a proteínas G_q , lo que incrementa la concentración citoplasmática de Ca^{2+} y con ello, inicia la activación plaquetaria.

También se ha reportado que, en lesiones vasculares, el colágeno expuesto por el subendotelio interacciona con el complejo GPIIb/IIIa-vWF, lo que disminuye la velocidad de las plaquetas en el flujo sanguíneo. Esta primera unión es de baja afinidad, pero permite el acople posterior de plaquetas con otras moléculas de adhesión como colágeno, laminina, fibronectina y trombospondina. Estas interacciones dan paso a la fase de activación plaquetaria (Kim et al., 2010, Yago et al., 2008).

La actividad inhibitoria de la naringina en la agregación inducida por colágeno ya reportada (Yu et al., 2011), así como la actividad antiagregante en plaquetas humanas (Kim et al., 2010), coincide con los datos obtenidos en este trabajo. En nuestro modelo, la naringina tuvo poca actividad, ya que a la mayor concentración (400 μ M) sólo se produjeron efectos entre el 24 y 29 % de inhibición al estimular con los diferentes agonistas, lo cual concuerda con los reportes arriba mencionados.

Por otra parte, los resultados de la agregación plaquetaria obtenidos con un ionóforo de calcio como agente inductor y por citometría de flujo (Zaragoza et al., 2016) no son comparables con los datos obtenidos en este trabajo ya que ellos utilizaron una metodología distinta. En el presente estudio, la esculetina inhibió con mayor magnitud la agregación inducida por todos los agonistas, que la naringina. También observamos que la dafnetina y la 6,7-Dimetoxicumarina tienen mayor actividad antiplaquetaria que la esculetina. Esto nos lleva a pensar que también se debe evaluar en futuros trabajos la participación de receptores de colágeno.

10 CONCLUSIONES

- ◆ Los blancos farmacológicos sobre los que actúan los derivados cumarínicos estudiados en el presente trabajo son diferentes a los que inhiben el ácido acetil salicílico y el clopidogrel.
- ◆ Las diferencias en el mecanismo de acción de estas moléculas son una oportunidad para el desarrollo de nuevos agentes antiplaquetarios que coadyuven en el manejo de los pacientes que no responden adecuadamente a la terapia convencional.
- ◆ No existe evidencia bibliográfica que indique la presencia de acciones cardiovasculares que pudieran limitar su uso, lo que resulta promisorio para continuar estudiando el efecto antiplaquetario de estas moléculas.
- ◆ Se estableció una relación estructura-actividad de derivados cumarínicos disustituidos en las posiciones 6, 7 y 8, con su efecto inhibitorio en la agregación plaquetaria inducida por epinefrina y colágeno
- ◆ Es necesario hacer más estudios que nos permitan determinar con mayor precisión los sitios de unión de estas moléculas, así como su mecanismo de acción.

11 BIBLIOGRAFÍA

Abraham, K.; Woehrlin, F.; Lindtner, O.; Heinemeyer, G.; Lampen, A. Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 228–239.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* 357(Pt 3): 593–615.

Anfossi, G., & Trovati, M. (1996). Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance. *European journal of clinical investigation*, 26(5), 353-370.

Arthur, J. F., Dunkley, S. and Andrews, R. K. (2007), Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *British Journal of Haematology*, 139: 363-372.

Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, Watson SP, Heemskerk JW. (2005). Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *The FASEB Journal* 2005 19:7, 825-827.

Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F, Rafii S. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 10:64–71

Baggiolini M. (2015). CXCL8 - The First Chemokine. *Frontiers in immunology*, 6:285.

Blair P, Flaumenhaft R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 23(4): 177–189.

Bonten TN, Plaizier CE, Snoep JJ, Stijnen T, Dekkers OM, van der Bom JG. (2014). Effect of beta-blockers on platelet aggregation: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 78:940–949. Emplea la misma estructura de referencia

Born GV. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927–929

Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*, 25(4), 155-167.

- Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC. (1997). Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest.* 60:866-873.
- Chen, Y, Wang T, Lee K, Tzeng C, Chang Y, Teng C. (1996). Synthesis of Coumarin Derivatives as Inhibitors of Platelet Aggregation. *HCA* 79: 651-657.
- Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J. G., Cohen, P. T., Vanaman, T. C. and Nairin, A. C. (1978). Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS letters*, 92(2), 287-293.
- Collet JP, Cuisset T, Rangé G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, Henry P, Motreff P, Carrié D, Boueri Z, Belle L, Van Belle E, Rousseau H, Aubry P, Monségu J, Sabouret P, O'Connor SA, Abtan J, Kerneis M, Saint-Etienne C, Barthélémy O, Beygui F, Silvain J, Vicaut E, Montalescot (2012). Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med.* 367(22): 2100-9.
- Costa-Filho RC, Bozza FA. (2017). Platelets: an outlook from biology through evidence-based achievements in critical care. *Ann Transl Med* 5(22):449.
- Cox D, O'Kennedy R, Thornes RD. (1989). The Rarity of Liver Toxicity in Patients Treated with Coumarin (1,2-Benzopyrone). *Human Toxicology* 8(6):501–506.
- Di Braccio M, Grossi G, Roma G, Grazia Signorello M, Leoncini G. (2004). Synthesis and in vitro inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperazinyl) coumarins. *Eur J Med Chem.* 39(5): 397-409. 2004
- Egan D, O'Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes RD. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev* 22(5):503-29.
- Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.*101(1):47-56.
- Farinola N, Piller NB. (2007). CYP2A6 polymorphisms: Is there a role for pharmacogenomics in preventing coumarin-induced hepatotoxicity in lymphedema patients? *Pharmacogenomics* 8:151–158.

- Feijge MA, Marion AH, Ansink K, Vanschoonbeek K, Heemskerk, Johan WM. (2004). Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type- 3. *Biochem Pharmacol* 67(8):1559–1567.
- Fiolaki A, Katsanos AH, Kyritsis AP, Papadaki S, Kosmidou M, Moschonas IC, (2017). High on treatment platelet reactivity to aspirin aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci.* May; 376: 112–6.
- Gavras I, Gavras H. (2001) Role of α_2 -adrenergic receptors in hypertension, *American Journal of Hypertension* 14(3)71S–177S.
- Geddis, A. E., & Kaushansky, K. (2004). Megakaryocytes express functional Aurora-B kinase in endomitosis. *Blood*, 104(4), 1017-1024.
- Getz, T M, Dangelmaier C A, Jin J, Daniel J L, Kunapuli, S P. (2010). Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis* 8(10):2283–2293.
- Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. (2018). Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Medicina Interna* 34(2):44-263.
- Goto S, Ikeda Y, Murata M, Handa M, Takahashi E, Yoshioka A, Fujimura Y, Fukuyama M, Handa S, Ogawa S. (1992). Epinephrine augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. *Circulation.* 86(6):1859-63.
- Grant JA, Scrutton MC. (1979). Novel alpha2-adrenoreceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. *Nature.* 277(5698): 659-61.
- Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J (1999) The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb Haemost* 82:392–398
- Hartwig JH, Italiano JE Jr (2006) Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis* 36(2):99–103
- Hayward CP, Pai M, Liu Y, Moffat KA, Seecharan J, Webert KE, Cook RJ, Heddle NM. (2009), Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a

prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7:676-684.

Herr AB, Farndale RW. (2009). Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen. *J Biol Chem*. 284(30):19781-5.

Hu M, Piller NB. (2017). Strategies for Avoiding Benzopyrone Hepatotoxicity in Lymphedema Management-The Role of Pharmacogenetics, Metabolic Enzyme Gene Identification, and Patient Selection. *Lymphat Res Biol*. 15(4):317-323.

Huntington JA. (2012). Thrombin plasticity. *Biochim Biophys Acta.*: 1824(1):246-252.

Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, Andjelkovic N, Davidovic G, Djurdjevic P, Stolic R, Iric-Cupic V, Simic I, Ignjatovic VD, Petrovic N, Smiljanic Z, Zdravkovic V, Simovic S, Jovanovic D, Nesic J. (2016). Influence of different beta-blockers on platelet aggregation in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 21:44–52.

Iardi F, Gargiulo G, Schiattarella GG, Giugliano G, Paolillo R, Menafra G, De Angelis E, Scudiero L, Franzone A, Stabile E, Perrino C, Cirillo P, Morisco C, Izzo R, Trimarco V, Esposito G. (2018). Effects of Carvedilol Versus Metoprolol on Platelet Aggregation in Patients With Acute Coronary Syndrome: The PLATE-BLOCK Study. *Am J Cardiol*. 122(1):6-11.

Induruwa I, Jung SM, Warburton EA. (2016). Beyond antiplatelets: The role of glycoprotein VI in ischemic stroke. *Int J Stroke*. 11(6):618-25.

Jackson SP. (2007). The growing complexity of platelets. *Blood* 10(9): 5087-5095.

Jiang P, Jandrot-Perrus M. (2014). New advances in treating thrombotic diseases: GPVI as a platelet drug target. *Drug Discov Today* 19(9):1471-5.

Jurk K, Kehrel BE. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 31:381-392.

Kai, K., Mizutani, M., Kawamura, N., Yamamoto, R., Tamai, M., Yamaguchi, H. and Shimizu, B. I. (2008). Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA

by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55(6), 989-999.

Kasperska-Zajac A, Rogala B. (2005). Markers of platelet activation in plasma of patients suffering from persistent allergic rhinitis with or without asthma symptoms. *Clin Exp Allergy* 35:1462–1465.

Kaushansky K (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 354:2034–2045

Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. (2009). Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl(3)-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb.*;16(6):807-14.

Kehrel B E, Brodde M F. (2013). State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother* 40:73–86.

Kim J, Zhang CZ, Zhang X, Springer TA. (2010) A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature. *Nature*. 466 (7309):992-5.

Kirsch G, Abdelwahab AB, Chaimbault P. (2016). Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation. *Molecules*. 21(10):1322.

Kontogiorgis C, Nicolotti O, Mangiatordi G F, Tognolini M, Karalaki F, Giorgio C, Patsilinakos A, Carotti A, Hadjipavlou-Litina D, Barocelli E. (2005) Studies on the antiplatelet and antithrombotic profile of anti-inflammatory coumarin derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 30(6): 925-33.

Kottke-Marchant K. and Corcoran G (2002) The Laboratory Diagnosis of Platelet Disorders. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: February 2002, Vol. 126, No. 2, pp. 133-146.

Kulkarni, S, Dopheide, SM, Yap CL, Ravanat, C, Freund, M, Mangin, P, Jackson, S. P. (2000). A revised model of platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation*, 105(6):783–791.

- Lacy, A. and O’Kennedy, R. (2004). Studies on coumarines and coumarin related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.*, 10, 3797–3811.
- Lake BG. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 37:423-453.
- Lam FW, Vijayan KV, Rumbaut, RE. (2015). Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells. *Comprehensive Physiology* 5(3):1265-80.
- Larson MK, Watson SP (2006) A product of their environment: do megakaryocytes rely on extracellular cues for proplatelet formation? *Platelets* 17:435–440
- Ludeman MJ, Zheng YW, Ishii K, Coughlin SR. (2004). Regulated shedding of PAR1 N-terminal exodomain from endothelial cells. *J Biol Chem.* 279(18): 18592-9.
- Macáková K, Reháková Z, Mladenka P, Karlíčková J, Filipický T, Ríha M, Prasad A, Parmar VS, Jahodár L, Pávek P, Hrdina R, Luciano S. (2012). In vitro platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins. *Biochimie* 94: 2681-2686.
- Marcinkowska M, Kotańska M, Zagórska A, Śniecikowska J, Kubacka M, Siwek A, Bucki A, Pawłowski M, Bednarski M, Sapa J, Starek M, Dąbrowska M, Kołaczkowski M. (2018). Synthesis and biological evaluation of N-arylpiperazine derivatives of 4,4-dimethylisoquinoline-1,3(2H,4H)-dione as potential antiplatelet agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 33(1):536-545.
- Marketou ME, Kintsurashvili E, Androulakis NE, Kontaraki J, Alexandrakis MG, Gavras I, Vardas PE, Gavras H. (2013). Blockade of platelet alpha2B-adrenergic receptors: a novel antiaggregant mechanism. *Int J Cardiol.*;168(3): 2561-6.
- Moroi M, Jung SM. (2004). Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 114(4): 221-33.
- Mustonen P, Lassila R. (1996). Epinephrine augments platelet recruitment to immobilized collagen in flowing blood--evidence for a von Willebrand factor-mediated mechanism. *Thromb Haemost.* 75(1): 175-81.

Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H. (2001). Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med.* 193(4): 459-69.

Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi, H, Nagai R. (2015). IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *The Journal of cell biology* 209(3), 453–466.

Noe L, Peeters K, Izzi B, Van Geet C, Freson K (2010) Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 17:2897–2905

O' Brien JR. (1963). Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds in platelets in vitro and in vivo. *Nature* 200:763–4.

O'Brien JM. (1962). Platelet aggregation. II. Some results from a new method of study. *J Clin Pathol.* 15:452–458.

O'Kennedy, R, Thornes, RD. (1997). Coumarins: biology, applications, and mode of action. John Wiley & Sons, Chichester; New York

Oliveros A, Cordero I, Paredes D, Buendia D, Domínguez F. (2011). Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. *Revista latinoamericana de química* 39 (12) 17-31

OMS, O.M.d.l.S. Cardiovascular diseases, 2011 [cited 2011 May]; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.

Pakala R, Waksman R. (2011). Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages. *Cardiovasc Revasc Med* 12 312–322.

Paniccia R, Piora R, Liotta AA, Abbate, R. (2015). Platelet function tests: a comparative review. *Vascular health and risk management*, 11, 133–148.

Patel SR, Fla JH, Italiano JE Jr (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 115:3348–3354.

Petrikova M, Jancinova V, Nosal R, Majekova M, Fabryova V. (2005). Carvedilol--a beta-blocker with considerable antiaggregatory effect on human blood platelets. *Bratisl Lek Listy* 106(1):20-5.

Rand ML, Leung R, Packham MA. (2003). Platelet function assays. *Transfus Apher Scio* 28:307-127.

Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, Buller H, Gallus A, Hunt BJ, Hylek EM, Kakkar A, Konstantinides SV, McCumber M, Ozaki Y, Wendelboe A, Weitz JI. (2014). Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:2363-2371

Raunio, H. and Rahnasto-Rilla, M. (2012). CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function, *27(2)*, pp. 73-88.

Reitsma S, Oude Egbrink MG, Heijnen VV, Megens RT, Engels W, Vink H, Slaaf DW, van Zandvoort MA (2011) Endothelial glycocalyx thickness and platelet-vessel wall interactions during atherogenesis. *Thromb Haemost* 106(5):939–46.

Rodgers G. (2006). Qualitative platelet disorders and von Willebrand disease. En: Kjeldsberg CR, Ed. *Practical diagnosis of hematologic disorders*. 4th edition. ASCP Press; 2006.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007). Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007;100: 1673–85.

Savage, B., Sixma, J. J., & Ruggeri, Z. M. (2002). Functional self-association of von Willebrand factor during platelet adhesion under flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 425-430.

Seegmiller A, Sarode R. (2007). Laboratory Evaluation of platelet function. *Hematol Oncol Clin N Am* 21:731-742.

Shukla SD. (1999). Platelet activating factor and platelets. Rao G, Ed. *Handbook of platelets physiology and pharmacology*. Boston: Kluwer Academic Publishers 120-141.

Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L; French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-

Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. (2008). Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 360(4):363-75.

Stalker, T. J., Traxler, E. A., Wu, J., Wannemacher, K. M., Cermignano, S. L., Voronov, R., Scott LD, Brass, L. F. (2013). Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 121(10), 1875–1885.

Steer ML, Atlas D. Demonstration of human platelet betaadrenergic receptors using 125I-labeled cyanopindolol and 125I-labeled hydroxybenzylpindolol. *Biochim Biophys Acta*. 1982;686(2):240–244.

Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. (2018). Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules* 23(2):250.

Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT III. (2002). Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events during Observation. *JAMA*.;288(19):2411–2420. Zaragoza C, Monserrat J, Mantecón C, Villaescusa L, Zaragoza F, Álvarez-Mon M. (2016). Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs. *Vascul Pharmacol*. 87:139-149.

Stitham J, Arehart EJ, Gleim SR, Douville KL, Hwa J (2007) Human prostacyclin receptor structure and function from naturally occurring and synthetic mutations. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82:95–108

Su Y1, Vilgelm AE, Kelley MC, Hawkins OE, Liu Y, Boyd KL, Kantrow S, Splittgerber RC, Short SP, Short SP, Sobolik T, Zaja-Milatovic S, Dahlman KB, Amiri KI, Jiang A, Lu P, Shyr Y, Stuart DD, Levy S, Sosman JA, Richmond A. (2012). RAF265 Inhibits the Growth of Advanced Human Melanoma Tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(8):2184–2198.

Sun B, Li H, Shakur Y, Hensley J, Hockman S, Kambayashi J, Manganiello VC, Liu Y. (2007). Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell Signal* 19(8):1765–1771.

Ünlü B, Bogdanov VY, Versteeg HH. (2017). Interplay between alternatively spliced Tissue Factor and full-length Tissue Factor in modulating coagulant activity of endothelial cells. *Thromb Res.* 156:1-7.

Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. (2013) Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2:963248.

Walter U., Gambaryan S. (2009) cGMP and cGMP-Dependent Protein Kinase in Platelets and Blood Cells. In: Schmidt H.H.H.W., Hofmann F., Stasch JP. (eds) *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 191. Springer, Berlin, Heidelberg

Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. (2009). Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost.* 7:241–246.

Wilson SJ, Dowling JK, Zhao L, Carnish E, Smyth EM. (2007). Regulation of thromboxane receptor trafficking through the prostacyclin receptor in vascular smooth muscle cells: role of receptor heterodimerization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:290–296.

Yago T, Lou J, Wu T, Yang J, Miner JJ, Coburn L, López JA, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, McEver RP, Zhu C. (2008). Platelet glycoprotein Iba α forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF. *J Clin Invest.* 118(9) :3195-207.

Yu HY, Park SW, Chung IM, Jung YS. Anti-platelet effects of yuzu extract and its component. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 3018–3024

Zahid M, Mangin P, Loyau S, Hechler B, Billiald P, Gachet C, Jandrot-Perrus M. (2012). The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost.* 10(12): 2418-2427.

Zaragozá C, Monserrat J, Mantecón C. (2016). Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs. *Vascul Pharmacol.* 87:139-149.

Zhou L, Schmaier AH. (2005). Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol.* 123(2): 172 183.

12 APÉNDICE

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____

Declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado:

El estudio consiste en una toma de muestra de sangre venosa, la cual no representa un riesgo agregado para mi persona. Los propósitos del proyecto que lleva como título: **“Efecto inhibitorio *in vitro* de cumarinas disustituidas en la agregación de plaquetas humanas inducidas por epinefrina, colágeno y ADP”** El contar con nuevos fármacos permitirá que los enfermos que lo requieren, puedan recibirlos y no presenten efectos colaterales o adversos y beneficiar a pacientes con nuevos tratamientos.

Para solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme del presente estudio en el momento que lo desee. En caso de que decidiera no participar, la atención que como paciente recibo en esta Institución no se verá afectada.

Firma

TESTIGO

TESTIGO

Fecha

La carta de consentimiento informado de este trabajo fue elaborada por el control interno entre el área de investigación y el banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Por lo que no se elaboró conforme a lo señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012 del expediente clínico.