



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ACTIVIDAD ANTIAGREGANTE PLAQUETARIA DEL EXTRACTO DE HOJAS
DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* (BAYAS DORADAS)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADA EN TECNOLOGÍA MÉDICA

AUTORA: NICOLE MADARIAGA GONZÁLEZ
DOCENTE GUÍA: DR. TM. MARCELO ALARCÓN LOZANO

TALCA-CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINAS
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. Enfermedades cardiovasculares.....	10
3.2. Hemostasia	11
3.3. Estructura y fisiología de la plaqueta	14
3.4. Agregación plaquetaria.....	19
3.5. Disfunción endotelial, proceso aterosclerótico y participación de la plaqueta	21
3.6. Antiagregantes plaquetarios	24
3.7. Mecanismos de prevención de ECV de frutas y hortalizas.	26
3.8. <i>Physalis peruviana</i> L. (Bayas doradas)	29
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Reactivos	34
5.2. Equipos	34
5.3. Obtención de Reactivos.....	34

5.4.	Preparación de Extracto.....	35
5.5.	Preparación de suspensiones de plaquetas humanas	35
5.6.	Agregación plaquetaria.....	36
5.7.	Análisis estadístico	37
6.	RESULTADOS	38
6.1.	Estudio de la actividad antiagregante plaquetaria inducida por ADP	38
6.2.	Estudio de la actividad antiagregante plaquetaria inducida por TRAP-6.....	40
6.3.	Estudio de la Actividad antiagregante plaquetaria del extracto de hojas de <i>Physalis peruviana L.</i> inducida por ADP.....	41
6.4.	Estudio de la Actividad antiagregante plaquetaria del extracto de hojas de <i>Physalis peruviana L.</i> inducida por TRAP-6.....	43
7.	DISCUSIÓN	47
8.	CONCLUSIÓN	51
9.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINAS
Figura 1. FASES DE LA RESPUESTA PLAQUETARIA POSTERIOR A LA LESIÓN VASCULAR.	12
Figura 2. CURVAS NORMALES DE AGREGOMETRÍA PLAQUETARIA EN PRP CON ESPECTROFOTOMETRÍA	21
Figura 3. NÚCLEO ESTRUCTURAL DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE POLIFENOLES.	27
Figura 4. EFECTOS DE LOS POLIFENOLES EN PLAQUETAS.	29
Figura 5. RAMA DE UCHUVA CON FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN SUBSIGUIENTE	31
Figura 6. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE <i>SOLARIUM LYCOPERSICUM</i> INDUCIDA POR ADP (4 μ M).	38
Figura 7. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE <i>SOLARIUM LYCOPERSICUM</i> INDUCIDA POR ADP (4 μ M).	39
Figura 8. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE <i>SOLARIUM LYCOPERSICUM</i> INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μ M).	40
Figura 9. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE <i>SOLARIUM LYCOPERSICUM</i> INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μ M).	41

Figura 10.	EFFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE PHYSALIS PERUVIANA L. INDUCIDA POR ADP (4 μ M).	42
Figura 11.	INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE PHYSALIS PERUVIANA L. INDUCIDA POR ADP (4 μ M).	43
Figura 12.	EFFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE PHYSALIS PERUVIANA L. INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μ M).	44
Figura 13.	INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE PHYSALIS PERUVIANA L. INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μ M).	45

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINAS
Tabla 1.	CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS ALFA.	15
Tabla 2.	CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS DENSOS.	16
Tabla 3.	VALORES NORMALES DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA SEGÚN CADA AGONISTA.	20
Tabla 4.	EXTRACTO DE MECANISMOS DE LOS POLIFENOLES PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE ATEROSCLEROSIS. TRADUCCION DE AUTORIA PROPIA.	28
Tabla 5.	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA UCHUVA O BAYA DORADA.	31
Tabla 6.	RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>PHYSALIS PERUVIANA L.</i>	32
Tabla 7.	ESQUEMA DE TRABAJO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE FASE EXPERIMENTAL. (AUTORÍA PROPIA, 2020).	37
Tabla 8.	DATOS ESTADÍSTICOS DEL ESTUDIO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE <i>PHYSALIS PERUVIANA L.</i> (AUTORIA PROPIA, 2020).	45

1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) en la actualidad se posicionan en la primera causa de muerte en Chile y el mundo, posee factores de riesgo cardiovasculares modificables principalmente, que constituyen el principal problema en la población, donde se destacan hábitos como el tabaquismo y sedentarismo, enfermedades tales como la diabetes, enfermedad renal, entre otras, las cuales son el principal foco de intervención en la salud, cuyos objetivo es tomar medidas de control y prevención de estas condiciones.

Se han realizado estudios frente a componentes de ciertas frutas y verduras, que con su consumo influyen en generar factores protectores contra diversas enfermedades cardiovasculares, donde las plaquetas tienen amplia relación con su desarrollo, por su relevancia en la generación de trombos causantes de procesos ateroscleróticos o trombóticos. Los Berries o Bayas poseen sustancias químicas como los polifenoles que tiene efectos vasodilatadores, atenúan la oxidación de las lipoproteínas, entre otras, y los Golden Berries o bayas doradas poseen un alto contenido, esta fruta está distribuida ampliamente en la zona sur de Chile.

En este estudio se obtuvo como resultado que las hojas de *Physalis peruviana L.* poseen actividad antiagregante plaquetaria, con un porcentaje de inhibición alrededor del 90%, esto se interpreta como una alternativa preventiva de ECV y es necesario obtener más antecedentes comparativos para lograr asimilar el efecto de estos extractos en funciones plaquetarias.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) en la actualidad se han posicionado como la primera causa de muerte a nivel mundial, por lo que buscar tratamientos preventivos ha sido el foco de la salud. En los últimos tiempos se ha estudiado que una alimentación saludable donde se utilicen en su mayor proporción frutas y verduras generan una disminución de la prevalencia de ECV, donde sus factores de riesgo sean de tipo modificables por una dieta balanceada, considerando lo anterior, se establece que utilizar extractos naturales con propiedades antiplaquetarias, que contribuyan a prevenir los eventos tromboticos o ateroscleróticos, como una vía suplementaria de tratamiento preventivo de estas enfermedades.

En la actualidad la problemática de las ECV ha sido enfocado a que sus tratamientos, como el consumo de fármacos antiplaquetarios, presentan un amplio efecto secundarios a largo plazos, como causar alteraciones gastrointestinales, es por ello, que en los últimos tiempos ha incrementado la necesidad de presentar alternativas a tratamientos que manifiesten un desarrollo con una menor generación de efectos secundarios, debido a lo anterior, es que se han enfocado en estudios con extractos de frutas y verduras, ya que, han logrado presentar efectos fisiológicos similares a las obtenido por fármaco, pero con la disminución de secuelas en su consumo.

El uso de extractos como el de las hojas de la planta *Physalis peruviana L.* productora de bayas doradas se ha seleccionado por su presencia de una gran cantidad de propiedades asociadas a su composición, tales como, de esteroides, flavonoides, taninos, alcaloides, entre otros, que por sus características puede tener un efecto en la inhibición de la agregación plaquetaria y consigo una reducción de la hiperactividad de las plaquetas para lograr evitar la formación de trombosis por lesiones ateroscleróticas coronarias, que se presentan más prevalentemente en pacientes con ECV.

Se puede decir, que obtener estudios capaces de verificar la función de las propiedades de los extractos naturales para utilizarse como una vía suplementaria de prevención de ECV, a través, de la inhibición de la agregación plaquetaria, pueden evidenciar como una terapia no solamente eficaz, sino que también, segura y con mayor tolerancia a su consumo. Con lo anterior, se puede manifestar que lograr obtener antecedentes empíricos de sus efectos beneficiosos, puede llegar a establecerse como una medida preventiva a personas con antecedentes familiares y/o genéticos de riesgo de desarrollar enfermedades asociadas. En este trabajo se evaluó la actividad antiagregante plaquetaria de las hojas de *Physalis peruviana* L., las cuales generan una disminución de la agregación plaquetaria frente a diferentes agonistas.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades crónicas, definidas como enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de discapacidad y muerte en el mundo, éstas son un grupo de enfermedades que no se caracterizan por un origen de una infección aguda sino, son el resultado de afectaciones de salud a largo plazo. En este grupo de enfermedades se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV), esta categoría se constituye con la mayoría de las muertes por ENT de aproximadamente 17,9 millones cada año (1, 2).

El contexto epidemiológico en Chile no está muy ajeno a la realidad mundial, debido a que en este país también las ECV son la principal causa de muerte, además, se presentan en el segundo lugar en la carga de años de vida ajustados por discapacidad (AVISA) y son causantes de un 27,5% del total de defunciones a nivel país, de las cuales un 29% corresponden a infarto agudo al miocardio (IAM) y un 30% a ataque cerebrovascular (ACV) (3).

Las enfermedades cardiovasculares se definen como un conjunto de trastornos al corazón y a los vasos sanguíneos, se clasifican en cardiopatía coronaria (infarto agudo de miocardio), hipertensión arterial (presión alta), enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y miocardiopatías (4).

El aumento de la probabilidad de fallecer a causa de alguna ECV se conoce como factor de riesgo cardiovascular (FRCV) el cual es una característica biológica, estilo o hábito de

vida que potencia estas enfermedades. Estos factores de riesgo se clasifican como modificables o no modificables, los no modificables dependen de la edad, sexo o factores genéticos y los modificables son los factores que se pueden actuar de manera preventiva, como la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus (DM) y el sobrepeso u obesidad (5).

En Chile los factores de riesgo cardiovasculares se presentan en mayor prevalencia el Sedentarismo, Malnutrición por exceso, sobrepeso, tabaquismo, obesidad e hipertensión arterial y los de menor prevalencia la diabetes mellitus y el consumo de alcohol (6).

Existen factores de riesgo de tipo modificable que están influenciados por la alimentación, tales como, la hipercolesterolemia, hipertensión arterial y el exceso de peso (7), donde se presenta que el bajo consumo de frutas y verduras está asociado a un aumento de riesgo de enfermedades no transmisibles, en donde, aproximadamente 3,9 millones de muertes se ocasionaron por un consumo inadecuado de frutas y verduras (8), por otra parte, las frutas y hortalizas tienen un rol protector de ocasionar ECV, debido a que presentan un efecto antitrombótico (9).

3.2. Hemostasia

La hemostasia es un proceso fisiológico del organismo que actúa en la pérdida excesiva de sangre producto de una lesión vascular, como un mecanismo de defensa (10). La importancia del mecanismo hemostático general radica en que un fallo de este puede generar como consecuencia una trombosis, siendo esta una de las principales causales de ECV (11, 12). Frente a un eventual daño vascular la hemostasia mantiene la integridad del sistema circulatorio cerrado y de alta presión, su actuación se divide en hemostasia primaria y secundaria (13).

La hemostasia primaria es el proceso de formación tapón plaquetario, tras una lesión vascular y se caracteriza por el reclutamiento y activación de las plaquetas. Esta fase actúa por los mecanismos de adhesión, activación, secreción y agregación (13). Las plaquetas son fragmentos provenientes de la maduración de los megacariocitos y de la formación y fragmentación de las proplaquetas (14). El recuento de plaquetas humanas se considera normal entre 150.000 y 400.000 / μ l (15). La adhesión y activación plaquetaria en el sitio de lesión se produce por la presencia de agonistas circulantes que activan las plaquetas, a través, de receptores plaquetarios específicos (Figura 1) (13, 16).

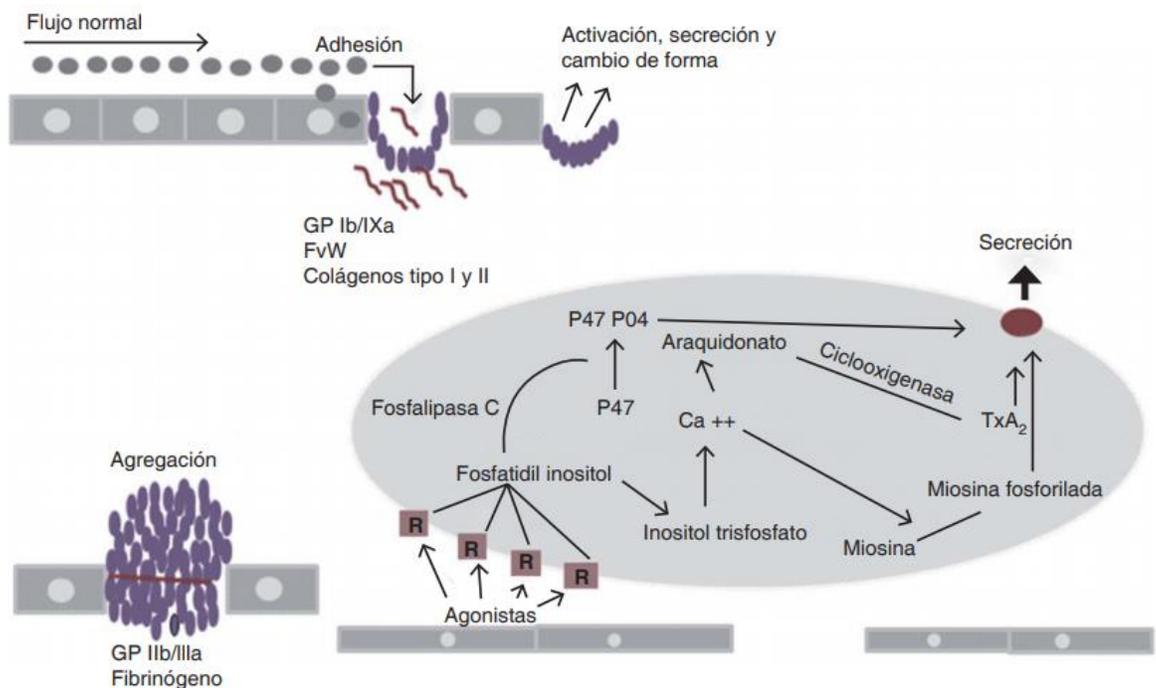


Figura 1. FASES DE LA RESPUESTA PLAQUETARIA POSTERIOR A LA LESION VASCULAR. La adhesión plaquetaria al subendotelio depende del colágeno, factor de von Willebrand (FvW) y GPIb/IXa. La agregación depende de la GPIIb/IIIa y el fibrinógeno es el puente. La enzima ciclooxigenasa convierte al araquidonato en tromboxano A2 (TxA2) un agente agonista y vasoconstrictor (Flores-Rivera et al., 2014)(13).

La hemostasia secundaria comprende a la activación del sistema de coagulación y actúa según tres fases de una iniciación, amplificación y propagación, llegando al producto primario que es la fibrina y terminando con el proceso de fibrinólisis (13). La interacción que se realiza en la hemostasia secundaria, es a través, de proteínas plasmáticas o factores de coagulación que activan reacciones en cascada y conducen a la formación de fibrina, esta tiene una función de reforzar el trombo plaquetario para construir finalmente un coágulo o trombo definitivo (17).

El fibrinógeno es una glucoproteína plasmática que circula en el torrente sanguíneo a una concentración promedio de 2,8 g/L y posee una vida media aproximada de 64 a 96 horas (18). Los factores de coagulación circulan de forma preenzimática o inactiva (zimógenos) y se convierten en forma activa en presencia de lesiones, donde realizan su acción en cascada para la producción de trombina. El mecanismo se puede iniciar por una vía intrínseca, es decir, que todos los componentes están en presente en la sangre y su origen se realiza por la presencia de cargas negativas que inician el proceso de activación, utilizando componentes de un sistema de contacto o por una vía extrínseca donde se necesita la exposición de un compuesto externo a la sangre como el factor tisular (FT) de la pared vascular o tromboplastina tisular para iniciar la activación (19, 20).

Para regular la coagulación se liberan glucosaminoglicanos de la superficie endotelial y la trombomodulina que son potentes inhibidores de la coagulación, además actúan activadores del proceso de fibrinólisis que limitan el depósito de fibrina. La fibrinólisis es un proceso enzimático que regula la conversión de la proenzima circulante (plasminógeno) en la enzima activa (plasmina) para realizar una lisis de fibrina y disolución del trombo. Posee sus mecanismos de regulación: PAI-1, que inhibe los activadores de plasminógeno, la α 2-antiplasmina, que inhibe la plasmina y el TAFI, inhibidor fibrinolítico activado por trombina (10, 13, 21).

3.3. Estructura y fisiología de la plaqueta

La función plaquetaria se relaciona principalmente a procesos hemostáticos en la coagulación sanguínea, donde ingresa a su estado activo cuando ocurre una lesión del vaso sanguíneo. Cabe destacar que posee otras funciones que regulan la homeostasis del cuerpo (22). Las plaquetas no solo se limitan a regular la hemostasia y la trombosis, sino que también desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad (23).

Las plaquetas fragmentos de citoplasma que surgen de una célula poliploide llamada megacariocitos ubicada en la medula ósea, poseen un diámetro tipo de entre 2 a 3 μm ., presenta una circulación de forma elipsoidal y su promedio de vida en humanos es de aproximadamente 10 días (15, 24-26). Las plaquetas al activarse sufren un cambio de forma y estructura, donde sus membranas se estrechan y se realizan proyecciones citoplasmáticas secretando sus gránulos (27). También se considera un recuento de plaquetas humanas como normal en un valor entre 150.000 y 400.000 $/\mu\text{l}$ (15).

Las características estructurales de las plaquetas son tres: una membrana intra y extracelular, gránulos y organelos intracitoplasmáticos, y un citoesqueleto. En primer lugar, se encuentra una membrana plaquetaria cuya función es mantener la integridad vascular y frenar el sangrado, está compuesta por proteínas y lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol, posee una cubierta plaquetaria o glicocálix que está formado por cadenas de oligosacáridos provenientes de glicolípidos, glicoproteínas de membrana y cadenas de polisacáridos que provienen de proteoglicanos plasmáticos y proteínas tales como la albumina y el fibrinógeno. La función del glicocálix es mantener una carga negativa en la superficie plaquetaria y se utiliza para la repulsión de interacciones con otros elementos de la circulación sanguínea. En segundo lugar, presenta gránulos o organelas intracitoplasmáticas, donde se subdivide en un sistema tubular denso que contiene enzimas activas tales como Ca^{2+} -ATPasas y ciclooxigenasa 2 (COX-2), gránulos de secreción que contiene cuatro tipos de gránulos citoplasmáticos: gránulos α (Tabla 1), gránulos densos

(Tabla 2), los lisosomas y los peroxisomas. Finalmente posee un citoesqueleto que está organizado por una malla de proteínas estructurales, que está compuesto principalmente por tubulina y polímeros de actina (28).

Tabla 1. CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS ALFA (28).

Categorías	Contenido de α gránulo	Funciones
Proteínas adhesivas	VWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TSP-2, laminina-8	Interacciones de contacto celular, hemostasia primaria y constituyentes de la matriz extracelular
Factores de la coagulación y sus inhibidores	Factor V/Va, factor XI, multimerina, proteína S, HMWK, proteasa, nexina-1 y -2, TFPI, inhibidor de proteína C, gas6	Generación de trombina, formación del coágulo y proliferación de la matriz extracelular
Factores fibrinolíticos y sus inhibidores	Plasminógeno, PAI-1, u-PA, α 2-antiplasmina, TAFI, α 2-macroglobulina	Producción de plasmina y remodelación vascular
Proteasas y antiproteasas	MMP-1, -2, -4, -9, ADAMTS13, ADAMS10, ADAMS17 (TACE), TIMPs 1-4, inhibidor plaquetario del FIX, C1 inhibidor, α 1-antitripsina.	Angiogénesis, regulación de la coagulación y de mecanismos celulares
Factores de crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B y C), EGF, IGF-1, VEGF (A y C), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2, -4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	Quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis
Quimioquinas y citoquinas otros	TGF- β 1 y - β 2, IL-1, RANTES (CCL5), IL-8, MIP-1 α , MIP-2, GRO- α , MCP-1, MCP-3, PF4, β -TG, NAP-2, angiopoyetina-1, HMGB1, IL-6sR, endostatina, osteonectina, dickkopf-1, osteoprotegerina	Regulación de angiogénesis, quimiotaxis, interacción celular, remodelación vascular

Categorías	Contenido de α gránulo	Funciones
Proteínas antimicrobianas	Trombocidinas, quinocidinas	Bactericida y fungicida
Glicoproteínas de membrana	aIIbb3, avb3, GPIb, PECAM-1, constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, P-selectina, TLT-1, CD63, CD40L, TF, TRAIL, furina, cellubrevina, syntaxina-2, clatrina	Adhesión y agregación plaquetaria, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacción plaqueta-leucocito y plaqueta pared vascular
Otras	4-sulfato de condroitina, albúmina, inmunoglobulinas G y M, precursor de amiloide b proteína, factor H de complemento, semaforina 3A.	Varias

Tabla 2. CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS DENSOS (28)

Categorías	Contenido de δ gránulo	Funciones
Señalización celular	Rho-GDP- inhibidor del dominio N terminal de calcio-calmodulina, 14-3-3 proteína	Regulador de proteínas Rho, movilización y unión de calcio, activadores de Tyr 3-hidroxilasas, unión de proteínas a fosfatidilserina
Moléculas chaperones	Ciclofilina A, grp78, proteína heat shock 70 kDa, disulfuro-isomerasa	Facilitan el ensamble de proteínas multiméricas, actúan en unión de Ca ²⁺ y ATP y catalizan uniones -S-S
Citoesqueleto	β actina, α actina, proteína asociada a adenilatociclase, cofilina 1, filamina A, precursor de gelsolin, kindin1, cadena liviana de miosina-2, pleckstrina, talina 1, transgelin 2,	Involucran movilidad celular, reciclan actina y cofilina, controlan la polimerización de actina, anclan proteínas de transmembrana a la actina, regulan cambio de forma y secreción, pueden ser sustratos de

	trombopoyetina, cadenab, tropomiosina, vinculina	PKC en la reorganización del citoesqueleto, etc
Glicólisis	Aldolasa, aenolasa 1, GAPDH, lactato dehidrogenasa B, piruvatokinasa	Convierte: F-1, 6-DP en GAP y DHAP, piruvato en GAP, GAP en 1,3 BPG, piruvato en lactato y fosfoenolpiruvato
Relacionadas a la función plaquetaria	Precursor de beta-tromboglobulina, FXIII, precursor de la cadena alfa de fibrinógeno, región C de la cadena Ig gamma, factor plaquetario 4, glicoproteína II, precursores de proplaquetas, albúmina sérica, precursor de trombospondina-1	Neutralización de heparinas (asociada a α gránulos), cross-linking de las cadenas de fibrina, polimerización de fibrina, actúan como cofactor en la agregación y son receptores para fibrinógeno y fibronectina.

La activación plaquetaria está asociada a la fase inicial de la cascada de coagulación, cuando ocurre un daño en el vaso sanguíneo. Los estímulos que actúan al activarse las plaquetas se reconocen como proagregadores o agonistas plaquetarios, que su función es promover la acción de adhesión plaquetaria a las superficies endoteliales que presenten una lesión (23).

Ocurrida la lesión, las plaquetas captan, a través, de sus receptores, estímulos exógenos o endógenos que causan en ella, un cambio de forma y una liberación del contenido de sus gránulos para formar agregados, comenzando la adhesión entre ellas. Todo lo anterior se debe a una unión de ligandos a los receptores glicoproteicos, que finalmente su función es generar la formación de agregados llamados tapón plaquetario o trombos blancos. Cabe destacar que los receptores GPIb-V-IX y GPIIa-IIb y los compuestos subendoteliales como el FvW y el colágeno interactúan entre sí para mediar este procedimiento (22).

El mecanismo de activación plaquetaria inicia con la unión a un agonista en la superficie y con esto, se activa la fosfolipasas C y A₂. Con la activación de la fosfolipasa C (PLC) esta actúa sobre el fosfatidil inositol 4,5 difosfato que tras su degradación generara el 1,2 diacilglicerol (DG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃). Este último se unirá a receptores del sistema tubular denso que liberaran al citosol el Calcio almacenado, este actuara como mensajero e iniciara acciones trombocíticas, tales como: cambio de forma con la emisión de pseudópodos que ayudan a la interacción plaquetaria, agregación plaquetaria actuando en el complejo GpIIb/IIa, el cual con su cambio de forma fijara proteínas adhesivas principalmente el fibrinógeno, realizara una contracción del citoesqueleto con la activación de la miosina quinasa y finalmente actuara en la secreción de gránulos con la formación de invaginaciones de la membrana para generar la exocitosis (24).

Por otra parte el DG es degradado generando 1-monoacilglicerol y acido araquidónico, donde este activa la fosfolipasa A₂ y promueve dos mecanismos oxidativos: la ciclooxigenasa, encargado de la liberación de prostaglandinas y activación de TxA₂ que potencia la activación plaquetaria con la liberación de Calcio, y lipoxigenasa, que actúan sintetizando leucotrienos que incrementa el calcio intracelular (24, 29).

Posterior a la activación plaquetaria se producen mecanismos endógenos de inhibición de las plaquetas, que su función es contrarrestar los efectos de los agonistas que inducen la activación plaquetaria. Dentro de estos se encuentra el óxido nítrico (NO) que actúa reduciendo el reclutamiento de nuevas plaquetas, inhibe la exocitosis de gránulos densos, los lisosomas y gránulos plaquetarios, también posee un segundo mensajero que es el GMP cíclico (GMPc) que tiene tres mecanismos de inhibición de plaquetas: el primero es el aumento de AMPc de manera indirecta que produce la inhibición de fosfodiesterasa 3 (PDE-3), el segundo es la acción de inhibición de la activación de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y el tercero es la producción de fosforilación del receptor TxA₂ que inhibe su función. Adicionalmente se encuentran actuando las prostaciclina, derivada del producto de ácido araquidónico de las células endoteliales, cuya función es reducir la activación y la agregación de las plaquetas con la mantención de un estado no activo. La activación de la

prostaciclina produce la estimulación de la adenilato ciclasa plaquetaria que aumenta la concentración de AMPc en la plaqueta, que permite la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), que se relaciona con la inhibición de GPIIb/IIIa, e inhibe la movilización del calcio y la desgranulación plaquetaria (30).

3.4. Agregación plaquetaria

Se conoce como agregación plaquetaria al proceso de estimulación de agonistas sobre la unión de unas plaquetas con otras, el reclutamiento de más plaquetas y el crecimiento del coagulo (13). Los agonistas que más se utilizan son: ADP, adrenalina, colágeno, ácido araquidónico y ristocetina (31).

Para que se realice el reclutamiento de plaquetas se necesitan distintos mecanismos de señalización, donde la primera acción es la unión de los agonistas a las proteínas G constituidas por siete segmentos transmembrana (STRs), esta unión activará los sitios de unión a ligandos en la GP IIB-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), integrina que es el principal receptor en la agregación plaquetaria, cuya función principal es unir al fibrinógeno al factor von Willebrand (VWF) e incorporar y almacenar el fibrinógeno plasmático a los gránulos α (28).

Los Agonistas que provienen de contenido plaquetario son; el tromboxano A₂ (TxA₂), producto de la metabolización del ácido araquidónico (AA) que se une a un receptor específico de tromboxano (TP-1,-2), ADP liberado de los gránulos densos que se une principalmente a dos receptores de tipos P2Y₁ y P2Y₁₂ y la serotonina, que estimula la plaqueta a través de un receptor de tipo 5-HT-2. Otros Agonistas son hormonas liberadas por otros tejidos, como la vasopresina proveniente de la hipófisis y la adrenalina (epinefrina), que se une a receptores plaquetarios adrenérgicos de tipo α_2 . También se encuentra la trombina que corta a su receptor STR (receptor activador de proteasas, PAR 1,4) formando

un nuevo péptido N-terminal que se unirá a la porción C-terminal del receptor. El colágeno que se une al receptor GPVI como principal o GPIV (CD 36) como transductor de señales (28).

La medición de la agregación plaquetaria *in vitro* consiste en una medición fotométrica de la agregación en plasma rico en plaquetas (PRP). El método consiste en la preparación de PRP a partir de sangre total titulada por centrifugación. Un haz de luz se ilumina a través de una parte alícuota de la suspensión de plaquetas agitada, y la luz transmitida detectada por una célula fotométrica. Tras la agregación de las plaquetas, se produce un aumento en la transmisión de luz. Este método ha tenido un valor incalculable en los estudios de la función plaquetaria, pero su uso está limitado porque es solo semicuantitativo. El aumento de la transmisión de luz está asociado tanto con la formación de agregados plaquetarios como con su densidad creciente. Una limitación adicional del método es que el comportamiento de las plaquetas en la sangre total, una situación que se acerca más a las condiciones *in vivo*, no se puede estudiar. Se sabe que la función plaquetaria puede estar modulada por agentes formados por otros tipos de células sanguíneas (32).

Las dosis de agonistas pueden variar en los diferentes centros donde se realice la técnica, se señalan en la tabla 3 los valores normales de la agregación plaquetaria con los diferentes agonistas y en la figura 2 los patrones normales de las curvas de agregometría plaquetaria (33).

Tabla 3. VALORES NORMALES DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA SEGÚN CADA AGONISTA (33).

Agonista	Concentración	Agregación (%)
Adenosín difosfato	5 μ M	68-88
	10 μ M	71-88
Acido araquidónico	0,5 mg/mL	74-99

Colágena	2 μ g/mL	70-94
Epinefrina	5 μ M	78-88
Ristocetina	1,25 mg/mL	87-102

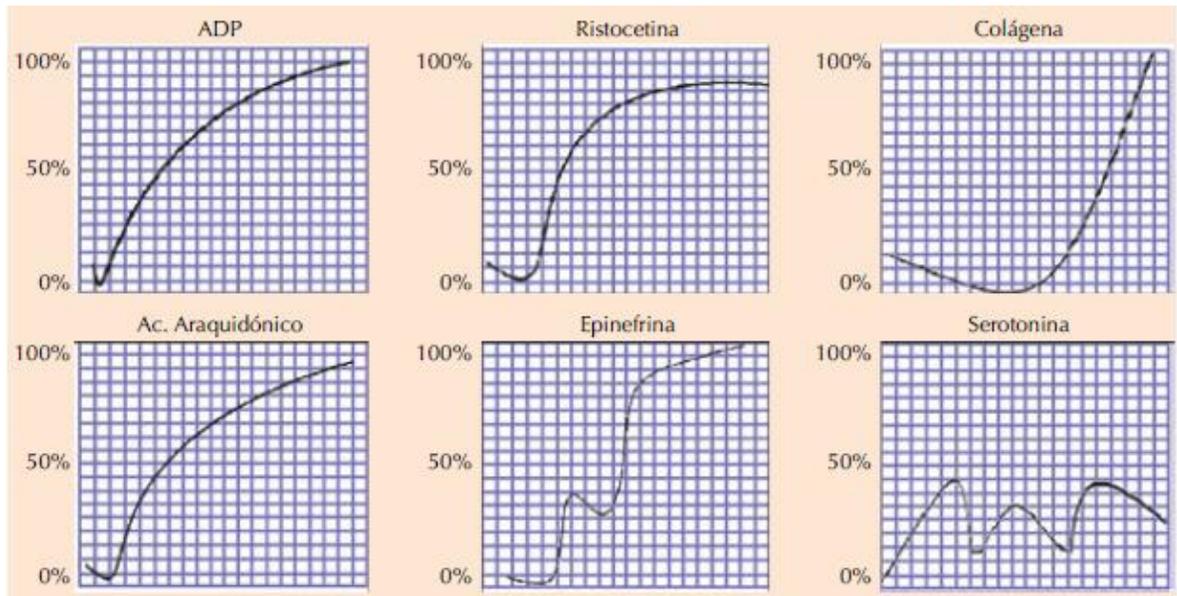


Figura 2: CURVAS NORMALES DE AGREGOMETRÍA PLAQUETARIA EN PRP CON ESPECTROFOTOMETRÍA (Gómez-Gómez et al., 2018)(33).

3.5. Disfunción endotelial, proceso aterosclerótico y participación de la plaqueta

El endotelio es el órgano más grande de la economía del mamífero y más importante en el peso de la economía humana, este se puede definir como una monocapa que separa los tejidos de la sangre, donde cada célula tendrá funciones específicas según su ubicación y forman el sistema circulatorio comprendiendo arterias, venas y capilares. Dentro de sus funciones se destaca: responsable de la circulación del torrente sanguíneo, de la fluidez de la sangre, del tono vascular y de los mecanismos de defensa del organismo como el fenómeno inflamatorio y la respuesta inmune (34, 35).

La disfunción endotelial (DE) se conoce como la presencia de un fenotipo endotelial alterado en cual se caracteriza por una biodisponibilidad reducida de NO, estrés oxidativo aumentado, expresión aumentada de factores protrombóticos y proinflamatorios y una vaso reactividad aumentada (35). Esta disfunción endotelial es la reacción fisiológica de una respuesta exacerbada o descontrolada por un defecto en la regulación de la cascada inflamatoria, donde sus manifestaciones clínicas más frecuentes son una vasoconstricción, una formación de trombo, hipertensión y/o aterosclerosis (36).

La aterosclerosis es el engrosamiento y endurecimiento que afecta de manera exclusiva a las arterias de mediano y gran calibre, esta es provocada por el acumulo del colesterol en la capa interna de la arteria resultando en una obstrucción de la corriente circulatoria y un desarrollo de un proceso inflamatorio que en conjunto de una alteración de la coagulación con lleva a la formación de trombo que desencadena en una rotura de la placa ateromatosa (37, 38).

Dependiendo de sus características clínicas al momento de manifestarse un enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) se clasifica en Cardiopatía isquémica o cardiopatía coronaria, (Oclusión en el corazón), enfermedad cerebrovascular (Isquemia en el cerebro), enfermedad arterial periférica (claudicación de arterias periféricas) o aterosclerosis aortica (aparición de aneurismas torácicos y abdominales) (38).

La fisiopatología de la aterosclerosis se manifiesta debido a que con el aumento de las concentraciones séricas de colesterol LDL, de manera persistente y en un gran rango, penetran las paredes de las arterias, se depositan y acumulan entre las células, en donde se liberan radicales libres de oxígeno que producirán una oxidación del LDL y una liberación de partículas proinflamatorias, además, producto del engrosamiento de la arteria se produce un estrés hemodinámico, las células endoteliales comienzan a liberar moléculas de adhesión como la molécula vascular de adhesión tipo 1 (VCAM-1) y las células del musculo liso liberan quimioquinas que atraen monocitos, linfocitos, mastocitos y neutrófilos al interior de

la pared arterial, los monocitos atraídos se convierten en macrófagos que fagocitan lípidos convirtiéndose en células espumosas que se acumulan en la pared de la arteria, se secretan proteoglicanos, colágeno y fibras elásticas, lo que con lleva a la formación del fibroadenoma temprano (10-30 años de edad). Posterior a este, se produce una progresión de la lesión, se amplifica la respuesta inflamatoria, se forma un centro necrótico con tejido fibrótico, generando la formación de un ateroma avanzado (55 años o más) con el adelgazamiento de la capa fibrosa que se puede romper y generar trombos (38).

Las plaquetas favorecen el inicio y la formación de lesiones ateroscleróticas y sus posteriores complicaciones trombóticas, esto se presenta por diferentes causas, unas de ellas es el efecto de las lipoproteínas en la función plaquetaria mediante la unión a receptores específicos como CD36, SR-B1 y LOX-1, activación de señales de transducción o por intercambio lipídico, inducción de síntesis o traslocación de lípidos de la membrana plaquetaria, por medio de LDL oxidadas que inducen la activación, el cambio de forma y la agregación de las plaquetas, que contribuye a la formación de trombos, entre otras. También se presenta por las propiedades antitrombóticas del endotelio que actúan en la interacción de las plaquetas y el vaso, que con una disfunción endotelial se puede inducir una adhesión de las plaquetas a la pared vascular, entre otras (16).

Los mecanismos moleculares que la activación plaquetaria, que influye en la lesión aterosclerótica, son una reducción del mantenimiento de propiedades antitrombóticas, el aumento del número de plaquetas activas circulantes, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno y un aumento de mediadores protrombóticos y proinflamatorios (16).

Las plaquetas se unen al endotelio disfuncional mediante la unión entre GPIIb α plaquetaria y el FvW endotelial, así como con la molécula de adhesión endotelial P-selectina, considerándose este último como un importante marcador de enfermedad vascular. Se considera también que tras la activación plaquetaria estas sufren un cambio organizacional y reorganización con la liberación de Calcio intraplaquetario que origina procesos de

activación plaquetaria como la desgranulación, con la exocitosis de contenidos de gránulos alfa, densos y lisosomales, donde las partículas principales son ADP, serotonina y calcio de gránulos denso que son clave en la función plaquetaria y en el reclutamiento de nuevas plaquetas, la Síntesis de eicosanoides (Fosfolipasa A₂ y TxA₂), expresión de proteínas de adhesión de gránulos alfa (p-selectina, GPIIb/IIIa, FvW, tromboespondina, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina) y exposición de una superficie plaquetaria procoagulante (cambio de morfología de membrana). Con todo lo anterior se produce una amplificación de la vía de señalización, activación y reclutamiento plaquetario que desencadena en generar un microambiente protrombótico, además de potenciar la agregación plaquetaria y por consiguiente la formación de un trombo (16).

Actualmente se sugiere de una secreción de microvesículas plaquetarias formadas durante el proceso de activación plaquetaria (MPp) que se han descrito elevadas concentraciones circulantes en pacientes con aterosclerosis, síndromes vasculares agudos y/o diabetes mellitus que indicaría correlación con la severidad clínica de la enfermedad aterosclerótica (16).

3.6. Antiagregantes plaquetarios

Los antiagregantes plaquetarios (AP), actualmente tienen un amplio uso en el área clínica. Se destaca que su uso esta derivado mayoritariamente para la prevención de la trombosis arterial, que es causada principalmente por una activación plaquetaria. Esta generación de trombos se debe fundamentalmente por la afectación de una enfermedad aterosclerótica, la cual produce una rotura espontanea de la placa, que inicio la formación del trombo, que puede llegar a realizar un evento trombo oclusivo, bloqueando el flujo sanguíneo vascular o, tras su desprendimiento, generar una embolia (39).

Fundamentalmente los antiagregantes plaquetarios se reflejan su uso en diferentes patologías, tales como, cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular isquémica y enfermedad arterial periférica. Dentro de los fármacos más clásicos están el ácido acetilsalicílico, dipiridamol, ticlodidona, clopidogrel, etc. (39).

Cabe destacar que los AP tienen diferentes tipos, donde su principal clasificación, deriva de la función en las fases de la agregación que actúan, por ejemplo, el dipiridamol actúa inhibiendo la producción de ADP; ácido acetilsalicílico y triflusal inhiben la producción de tromboxanos, abciximab y ticlopidina bloquean los receptores de la glucoproteína IIa/IIIb, epoprotenol e iloprost son análogos de los inhibidores naturales de la agregación (40).

Los fármacos antiagregantes plaquetarios pueden presentar contraindicaciones asociadas donde las más comunes son: varices esofágicas grandes, accidente cerebrovascular reciente dentro de dos años, historia de hemorragia intracraneal, trombocitopenia significativa, cirugía mayor a las 72 horas, hipersensibilidad a la medicación, sangrado agudo clínicamente significativo, enfermedad renal terminal en hemodiálisis, cirrosis hepática descompensada, hipertensión severa con una PA > 200/110, la insuficiencia cardíaca congestiva es una contraindicación para el uso de cilostazol, entre otros (40).

Los Efectos adversos más comunes asociados a medicamentos antiplaquetarios, Asma inducida por la aspirina, Pólipo nasal, Hemorragia digestiva alta por gastritis crónica, Equimosis, Hematuria, Epistaxis, Disnea relacionada con el ticagrelor, Hemorragia, Trombocitopenia (41). El dolor de cabeza, las náuseas, la diarrea, el dolor, la infección, los síntomas respiratorios superiores, las palpitaciones, las arritmias y el edema periférico son los efectos secundarios más comunes asociados con el cilostazol (42). Cabe destacar que el Clopidogrel es un fármaco que tiene menor efectos adversos, en comparación a la ticlopidina que es similar en su estructura bioquímica pero el clopidogrel aporta mayor actividad antiagregante (43).

3.7. Mecanismos de prevención de ECV de frutas y hortalizas.

Se ha estudiado que el consumo de frutas y verduras posee un efecto de prevención de trastornos cardiovasculares prematuros, debido a que se asocian con la reducción de factores de riesgo cardiovasculares mediante la reducción de la presión arterial, el colesterol, el triacilglicerol y la fibra soluble (44). Se han descrito efectos antitrombóticos (antiagregante plaquetario, anticoagulante y antifibrinolítico) en diversas frutas y verduras, tales como, Uva negra, frutilla, piña, entre otras (9). Además, existen compuestos fenólicos (polifenoles) presentes en alimentos de origen vegetales que se ha demostrado que pueden mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares(45).

Los polifenoles poseen capacidad de modulación de actividad de diferentes enzimas mediante características fisicoquímicas propias de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de oxido reducción, dentro de sus propiedades más importante se encuentran que son antioxidantes. La estructura molecular de estos compuestos se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, los cuales se originan principalmente en plantas, producto de su metabolismo secundario. Los principales polifenoles son: ácido fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (figura 3) (45).

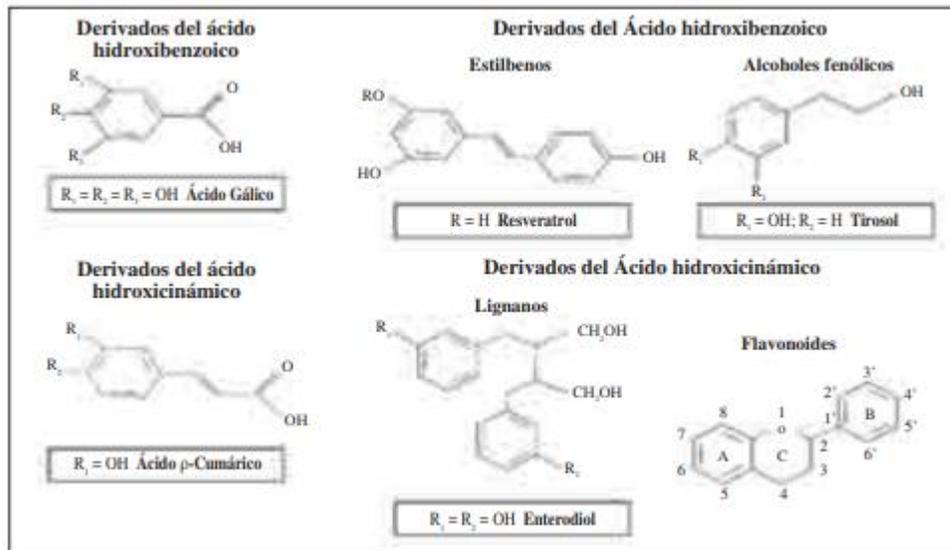


Figura 3. NÚCLEO ESTRUCTURAL DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE POLIFENOLES. Se señalan los sustituyentes que corresponden a la estructura concreta de algunos compuestos. Se numeran los átomos de carbono del núcleo estructural de los flavonoides (Quiñones, et al., 2012) (45).

Los polifenoles poseen acción antioxidante y en consecuencia poseen efectos vasodilatadores, mediante la modulación de la producción de NO en células endoteliales, a través, de un mecanismo dependiente del calcio extracelular, antilipémicas, por medio de la atenuación de la oxidación de las LDL, antitrombóticas, debido a la inhibición de enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides, antiinflamatoria, inhibiendo ciclooxigenasa o lipooxigenasa, entre otros efectos (45).

En la agregación plaquetaria, los polifenoles se han descrito con efectos antitrombóticos (Figura 4) asociado a la reducción de la susceptibilidad de la activación y agregación plaquetaria, la reducción de la síntesis de mediadores protrombóticos (síntesis de eicosanoides) y la disminución de la expresión génica del factor tisular. De diferentes extractos se han estudiado los efectos de la agregación plaquetaria, dando como resultado que se redujo la respuesta plaquetaria y una inhibición de la vía basada en el ácido araquidónico. También se han informado varias reducciones: reducción de la activación de la membrana de la glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), la expresión de membrana de p-

selectina, la actividad fosfolipasa A2 (PLA2) y ciclooxigenasa, entre otros efectos señalados en la tabla 4 (46).

Tabla 4. EXTRACTO DE MECANISMOS DE LOS POLIFENOLES PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE ATEROSCLEROSIS. (TRADUCCIÓN DE AUTORIA PROPIA, 2020) (46).

Patología de la aterosclerosis	Polifenoles / alimentos ricos en polifenoles	Mecanismo de prevención
Agregación plaquetaria	Zumo de granada o extracto rico en polifenoles de la granada	⊖ agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico y colágeno ↓ Movilización de calcio inducida por colágeno y ácido ↓ producción tromboxano A2 ↓ formación de H ₂ O ₂
	Cacao y chocolate negro	↓ Activación de la membrana de GPIIb / IIIa inducida por ADP, adrenalina y epinefrina ↓ Expresión de membrana de P-selectina inducida por ADP ↓ Actividad de PLA2 y COX ↓ Activación de ROS, 8-iso-PGF2 α y NOX2
↓: disminución; ⊖: inhibir; ROS: especies reactivas de oxígeno; H ₂ O ₂ : peróxido de hidrógeno; ADP Difosfato de adenosina; GPIIb / IIIa: glicoproteína IIb / IIIa; PLA2: fosfolipasa A2; COX: ciclooxigenasa; 8-iso-PGF2 α : 8-isoprostano-prostaglandina F2 α ; NOX2: NADPH oxidasa 2.		

Las Bayas Doradas posee propiedades antioxidantes, antitumorales, hepatoprotectoras, inmunomoduladora y antibacteriales. Se reconoce también que su consumo frecuente tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de células cancerígenas en el pulmón (49) y además, un potente hipoglucémico postprandial, que se le ha sido atribuido a su alto contenido de antioxidantes como tocoferoles y betacarotenos (50, 51).

Tiene la capacidad de que su jugo de bayas doradas o Golden Berries en pacientes con hipercolesterolemia, reduce significativamente los niveles de colesterol total y cLDL; y no varía significativamente los niveles de HDL ni triglicéridos. La fibra dietética de las bayas doradas posee efectos hipocolesterolemiantes, teniendo como mecanismo de acción el secuestro de los ácidos biliares, la disminución de la absorción de colesterol y la inhibición de la síntesis de colesterol (50).

Los extractos etanólicos de hojas poseen actividad antimicrobiana *in vitro* usando el test de difusión en agar contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Sarcinia lutea*, *Neisseria sp.*, *Mycobacterium phlei*. El extracto etanólico de las hojas posee además actividad contra *Escherechia coli* y *Candida albicans* (52).

Dentro de la composición química de las bayas doradas se ha encontrado con una pulpa nutritiva, con niveles particulares de altos carotenoides, vitamina C y minerales. Respecto a las cantidades de fenólicos es de altas cantidades alrededor de 6,3 mg/100 g de jugo como ácido cafeico equivalente (53). El aceite de los frutos de *P. peruviana* contiene también vitaminas solubles en grasa como la vitamina E (tocoferoles), así como vitaminas A y C y carotenos (provitamina A), todos ellos le confieren una mejor estabilidad (54). La composición nutricional se señala en la Tabla 5.

Tabla 5. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA UCHUVA O BAYA DORADA (55).

Factor nutricional	Factor nutricional por 100g fruta
Calorías	54,00
Agua	79,60
Proteína (g)	1,10
Grasa (g)	0,40
Carbohidratos (g)	13,10
Fibra (g)	4,80
Ceniza (g)	1,00
Calcio (mg)	7,00
Fósforo (mg)	38,00
Hierro (mg)	1,20
Vitamina A (U.I)	648,00
Tiamina (mg)	0,18
Riboflavina (mg)	0,03

Las bayas doradas, presentan diversos beneficios, considerando lo anterior se establece que esta no presenta niveles de toxicidad evidente en su consumo, que realizó mediante administración intragástrica de extracto de *Physalis peruviana* en ratones (56).



Figura 5. RAMA DE UCHUVA CON FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN SUBSIGUIENTE. (Honicke, Flores, et al., 2000) (57)

Las hojas de *Physalis peruviana L.* (Figura 5) se reconocen como ricas en withanólidos los cuales son un grupo de esteroides naturales con esqueleto de ergostano, donde los carbonos 22 y 26 están oxidados en forma de anillo de lactona, formando las lactonas esteroidales. En su análisis químico, corresponde a ergosta-22,26-olido, y posee en su sistema un grupo esteroidal 11 β -1-ona. Los withanólidos derivan de la modificación del esqueleto ciclo y/o cadena lateral que ocurre en la Familia Solanaceae. Cabe destacar que en este grupo taxonómico es donde se encuentran principalmente las hojas de *P. peruviana* las cuales son ricas en varios compuestos withanólidos. Dentro de los flavonoides se han aislado de las hojas los 3-rutinósido-, 3-robinobiosido-, 3-rutinósido-7-glucósido-, y 3-robinobiosido-7-glucósido-, tanto de kaemferol como de quercetina (58). Adicionalmente se mencionan las marcha fitoquímica de las hojas de *Physalis peruviana L.* en la Tabla 6.

Tabla 6. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* (59)

Metabolito Secundario	Ensayo	Resultado
Esteroides	Liebermann-Burchard	+
Flavonoides	Shinoda	+
Taninos	Gelatina	+
Alcaloides	Dragendorff	+

Hasta el momento no se ha realizado algún estudio de la influencia de componentes de las hojas de Bayas doradas sobre las plaquetas, ni su potencial antiagregante plaquetario, por lo que, según las características químicas mencionadas con anterioridad, se postula que estas hojas son un importante agente antitrombótico y anti-aterogénico, considerándose como una posible vía suplementaria de tratamiento preventivo de ECV y sus complicaciones.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

1. Determinar la actividad antiagregante plaquetaria de los extractos de hoja de la planta productora de bayas doradas *Physalis peruviana L.*

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antiagregante plaquetaria *in vitro* de las hojas de la planta *Physalis peruviana L.*
2. Determinar acción antiagregante plaquetaria de las hojas de la planta *Physalis peruviana L.* frente a diferentes agonistas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

- Suero fisiológico (0,9 %)
- ADP (4 μ M)
- TRAP-6 (10 μ M)
- Etanol Merck.

5.2. Equipos

- RotaVapor Eyela Modelo N-1001
- Refrigerador Whirpool, USA
- Liofilizador Freezone 6, Kansas City, Missouri, Labconco, EE. UU.
- Picadora (Sindelen, 1, 2, 3 silhouette, Chile)
- Sonicador Transsonic 700/H, Elma-Hans Schmidbauer, Alemania
- Lumiaggregometer (Chrono-Log, Havertown, PA, EEUU)
- Contador hematológico (Valtek, Universidad de Talca.)

5.3. Obtención de Reactivos

El cloruro de sodio (p.a.) se obtuvo de Arquimed (Santiago, Chile). La adenosina 5'-difosfato (ADP) y el péptido activador del receptor de trombina 6 (TRAP-6) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

5.4. Preparación de Extracto

Las hojas de la planta *Physalis peruviana L.* productora de bayas doradas se recolectaron desde el Centro Regional de Abastecimiento (CREA) de la ciudad de Talca, Chile, el extracto de hojas se obtuvo de acuerdo a Fuentes et al, las cuales fueron lavadas y molidas en una picadora (60). Posterior a eso se le añadió etanol (proporción de 1mL de etanol /1gr de hoja). El extracto obtenido fue sometido a rotavapor a 56°C a 90-180 rpm para la eliminación de etanol y concentración del extracto. Posterior a eso, la muestra fue congelada a -20°C y luego liofilizada, de lo anterior, se dispensaron en tubos de microcentrífuga de 200 µL y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

5.5. Preparación de suspensiones de plaquetas humanas

El protocolo fue autorizado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Talca, se obtuvo un consentimiento informado por escrito de seis jóvenes voluntarios sanos, que cumplieron con los requisitos de exclusión de no haber consumido ningún antiagregante plaquetario, medicamento anti esteroideo o inflamatorio en periodo mínimo de 15 días previos a la obtención de la muestra sanguínea, no ser fumador, entre otros, que aceptaron participar en el estudio.

Se obtuvieron muestras de sangre Venosa en tubos de citrato al 3,2% (9:1 v / v) mediante flebotomía con sistema de tubos de vacío (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) y una aguja de 21 G (indicada para pacientes adultos). Las muestras de cada voluntario se procesaron de forma independiente, con una homogenización suave mediante inversión de 5 veces, dejando reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó centrifugación de los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Se extrajo 2/3 del plasma de PRP de cada tubo para su uso posterior y se extrajo de este 1 alícuota de 1 mL de plasma en un tubo plástico, al

cual se le realizo un recuento de plaquetas en PRP, en un contador hematológico (Valtek, laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad de Talca). Los tubos iniciales se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 3500 rpm para la obtención del plasma pobre en plaquetas (PPP). Posteriormente, el PRP se ajustó a rango de recuento de plaquetas de entre 200.000 – 300.000 plaquetas/ μL con PPP.

5.6. Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se monitorizo utilizando un lumi-agregómetro (Chrono-Log, Havertown, PA, EE. UU.). En primer lugar, se realiza una calibración del equipo con PPP (blanco). Se dispensa el PRP de la muestra de 392 μL o 398 μL (Recuento de 200.000-300.000 plaquetas/ μL) dependiendo del Agonista a utilizar, se le añadió 16 μL de muestra de extracto de hoja de *Physalis peruviana* L (Concentración de 1mg/mL), de suero fisiológico (0,9%) para la medición del control negativo o de *S. lycopersicum* L. (Concentración de 1 mg/mL) del control positivo, luego de 5 minutos de incubación en la cubeta de reacción, la cual contiene en su interior una barra magnética que permite que el PRP se mantenga en constante movimiento, se agregaron, según el protocolo de la tabla 6, 9 μL de agonista ADP (Concentración de 4 μM) o 2,7 μL de agonista TRAP-6 (Concentración de 10 μM), para iniciar la agregación plaquetaria, la cual se midió durante 5 minutos en el agregómetro del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis de la Universidad de Talca (61). Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Se registraron los resultados de agregación plaquetaria que se determinaron por el software del agregómetro mediante una gráfica de porcentaje de agregación versus tiempo.

Tabla 7. ESQUEMA DE TRABAJO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE FASE EXPERIMENTAL. (AUTORÍA PROPIA, 2020).

Tipo de Agonista	Cantidad de PRP de la muestra	Cantidad de Extracto, suero fisiológico o <i>S. lycopersicum L.</i>	Cantidad de Agonista
ADP (4 μM)	392 μL	16 μL	9 μL
TRAP-6 (10 μM)	398 μL	16 μL	2,7 μL

La inhibición relativa de la cantidad máxima de agregación plaquetaria fue calculada según la siguiente fórmula: $100 - ((\% \text{ AgX} * 100) / \% \text{ AgC})$ (% Ag X: agregación relativa del componente en estudio, % Ag C: agregación relativa de control)(60).

5.7. Análisis estadístico

Los datos arrojados de las muestras de agregación plaquetaria fueron analizados según la media de los seis participantes del estudio, para el análisis estadístico se utilizó el test t de Student, desde el programa computacional GraphPad Prism 5®, cuyos valores $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio de la actividad antiagregante plaquetaria inducida por ADP

Para la técnica de agregación plaquetaria inducida por ADP ($4 \mu\text{M}$) se realizó control positivo y negativo, para lo cual, se utilizó en el control negativo suero fisiológico a una concentración del 0,9% y en el control positivo se usó de referente un extracto que tiene actividad antiagregante plaquetaria, el cual, es proveniente del fruto de *Solarium Lycopersicum* (tomate) (60). El procesamiento se realizó con muestra de PRP con los componentes de cada control, con una incubación de 5 minutos, posterior a eso se realiza la medición de agregación plaquetaria inducida por ADP ($4 \mu\text{M}$). La actividad antiagregante plaquetaria del tomate se evidencia en la figura 6 la cual se obtuvo alrededor de un 90% de porcentaje de inhibición y la funcionalidad plaquetaria se observa en el control negativo con la obtención de aproximadamente del 85% de agregación plaquetaria.

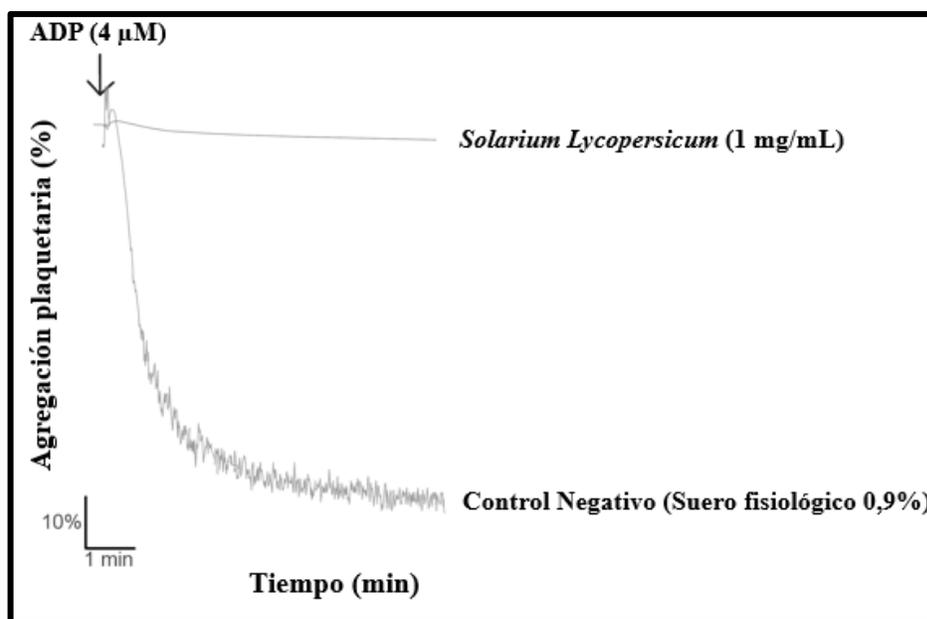


Figura 6. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE *SOLARIUM LYCOPERSICUM* INDUCIDA POR ADP ($4 \mu\text{M}$).

Obtenido de la incubación de PRP con el extracto de tomate o suero fisiológico al 0,9%, con una incubación de 5 min y una realización de agregación plaquetaria por inducción de ADP (4 μ M).

El extracto de *Solarium lycopersicum* (tomate) presento un porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria alrededor de 98% y el porcentaje de agregación plaquetaria del control negativo fue de 85%, los cuales se establecen como estadísticamente significativos como controles de la técnica de agregación plaquetaria inducida por ADP (4 μ M), representado en la figura 7.

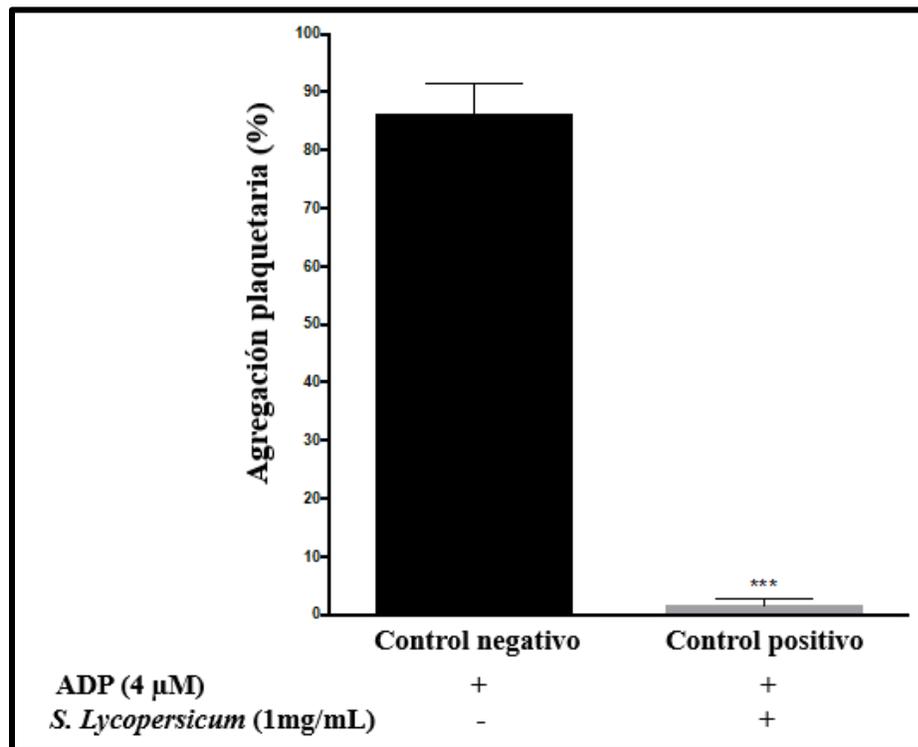


Figura 7. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE *SOLARIUM LYCOPERSICUM* INDUCIDA POR ADP (4 μ M). Se representa en la gráfica la media más el Error estándar de la media (SEM) de las determinaciones por duplicado en seis pacientes, los valores obtenidos en los 6 ensayos fueron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,001$.

6.2. Estudio de la actividad antiagregante plaquetaria inducida por TRAP-6

Los controles realizados para la agregación plaquetaria inducida por el agonista TRAP-6 (10 μ M) presentan un porcentaje de agregación alrededor del 85% para el control negativo y para aproximadamente de 2% para el control positivo, como se evidencia en la figura 8.

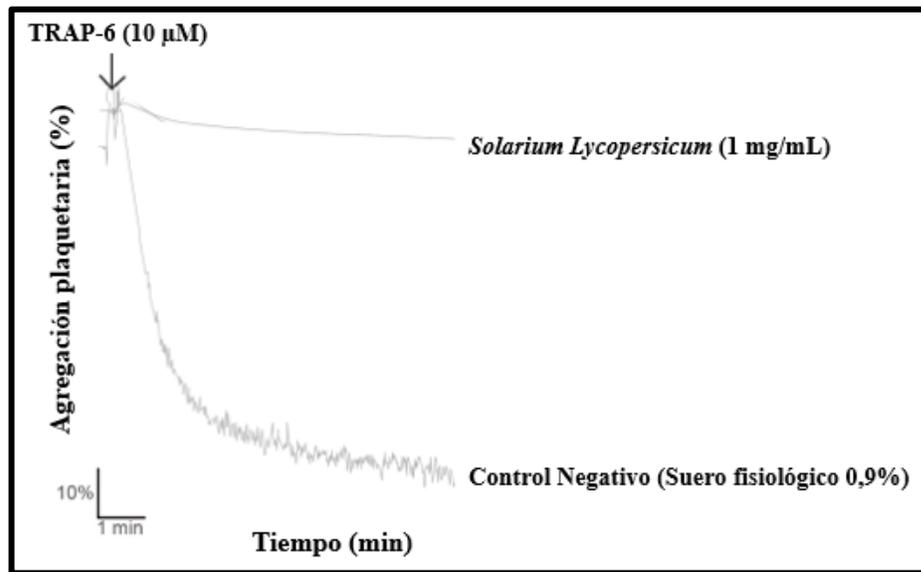


Figura 8. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE *SOLARIUM LYCOPERSICUM* INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μ M). Se realiza la incubación de PRP con el extracto de tomate (1mg/mL) o suero fisiológico (0,9%), con una incubación de 5 min y una realización de agregación plaquetaria por inducción de TRAP-6 (10 μ M).

Se representa en la figura 9 la valoración de los porcentajes de agregación plaquetaria estadísticamente significativas, donde el control positivo se representa con un porcentaje menor respecto al control negativo, siendo este un referente para la técnica y su posterior uso en el cálculo de porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria.

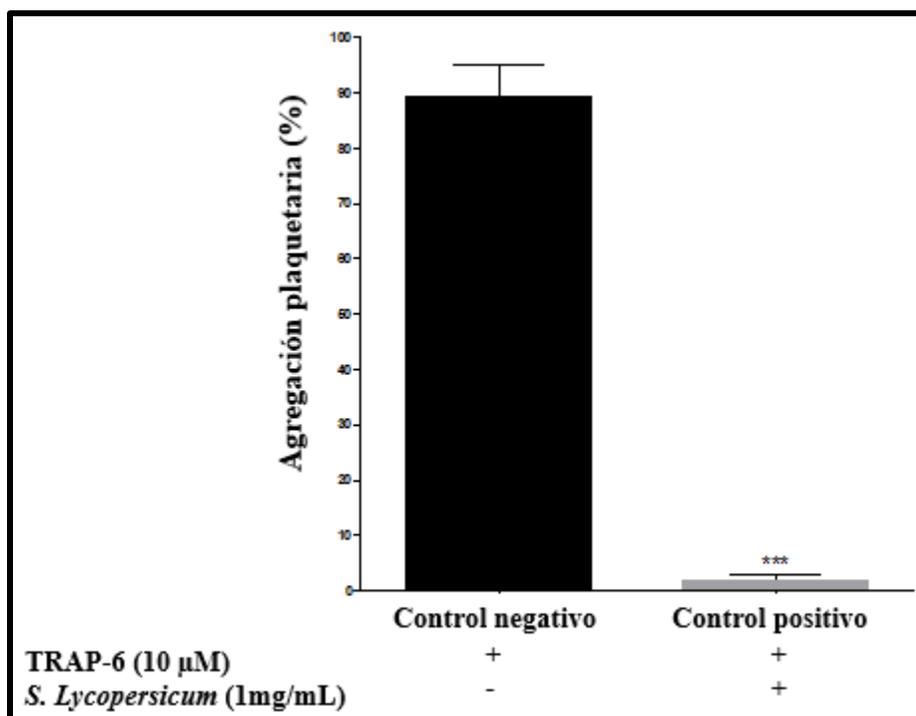


Figura 9. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE *SOLARIUM LYCOPERSICUM* INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μM). Se representa en la gráfica la media más el Error estándar de la media (SEM) de las determinaciones por duplicado en seis pacientes, los valores obtenidos fueron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,001$.

6.3. Estudio de la Actividad antiagregante plaquetaria del extracto de hojas de *Physalis peruviana L.* inducida por ADP

Se realizó el estudio de actividad antiagregante plaquetaria del extracto de *Physalis peruviana L.* por el método de agregación plaquetaria por ADP (4 μM), se utilizó el agregómetro del laboratorio de trombosis y hemostasia de la Universidad de Talca. El extracto se añadió a la muestra de PRP y se incubó, posterior a eso se evidenció el porcentaje de agregación plaquetaria de aproximadamente un 11% con una pendiente y área bajo la curva similar a la obtenida con el control positivo, observándose esto en la figura 10.

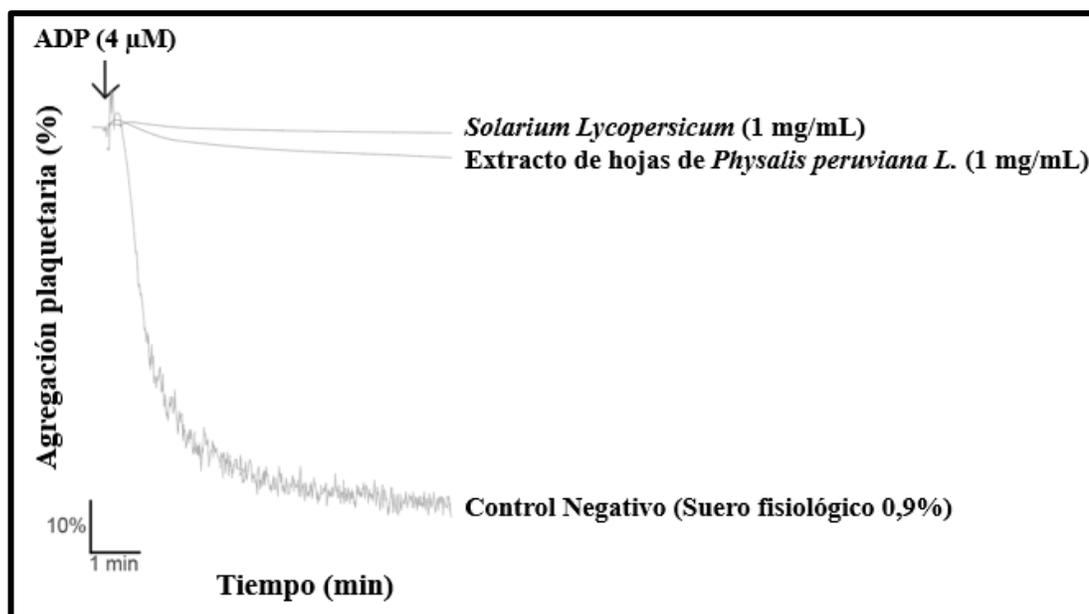


Figura 10. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* INDUCIDA POR ADP (4 μM). Se realizó la incubación de PRP con suero fisiológico (0,9%), extracto de *Solarium lycopersicum* (1mg/ml) y extracto en estudio de Hoja de *Physalis peruviana L.* (1mg/mL) por 5 minutos y posterior a eso se efectuó la medición de agregación plaquetaria inducida por ADP (4 μM), se obtuvo una inhibición de la agregación plaquetaria de aproximadamente 90%, respecto del control, por parte del extracto en estudio.

Del estudio de agregación plaquetaria se obtuvieron diversas mediciones, posterior a una incubación de las plaquetas con el extracto de hoja de *Physalis peruviana L.*, de las cuales se obtuvo un 90,2% de porcentaje de inhibición de la agregación plaquetario, estos fueron estadísticamente significativos en relación con el control (Figura 11).

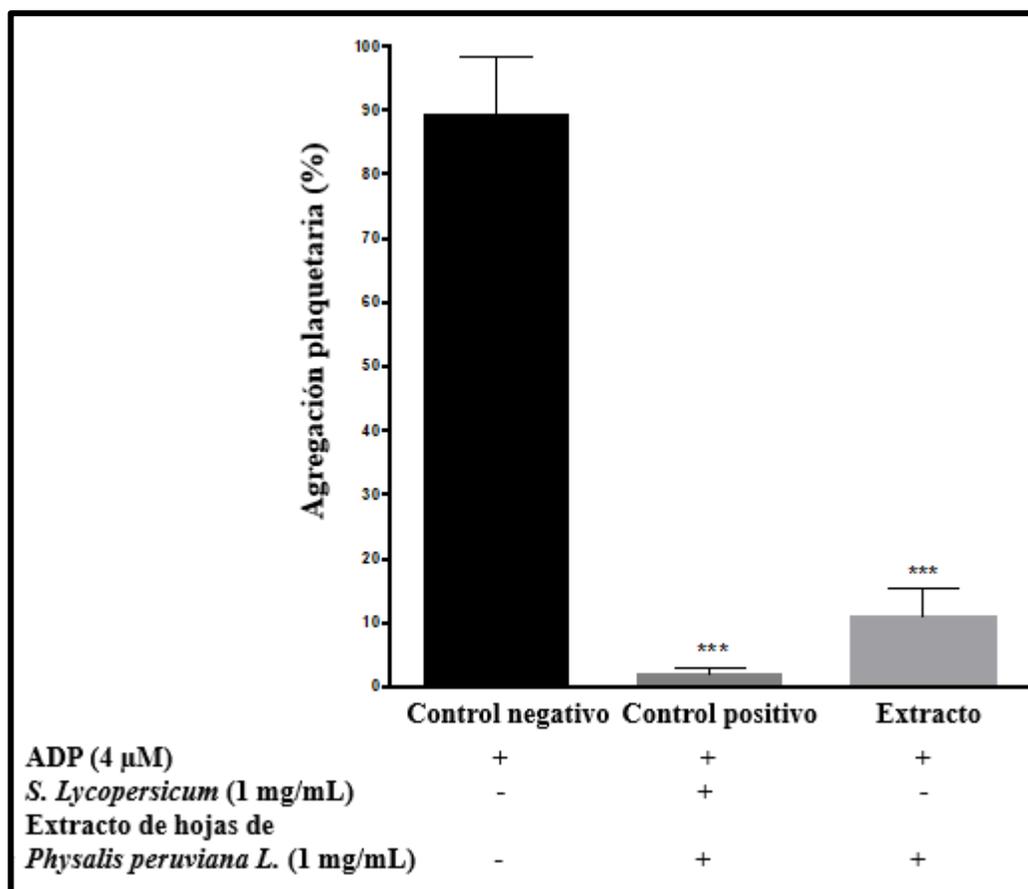


Figura 11. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* INDUCIDA POR ADP (4 μ M). La representación de esta grafica de la media más el Error estándar de la media (SEM) de las determinaciones por duplicado en seis pacientes, los valores obtenidos fueron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,001$.

6.4. Estudio de la Actividad antiagregante plaquetaria del extracto de hojas de *Physalis peruviana L.* inducida por TRAP-6

Se determino la actividad antiagregante plaquetaria del extracto en estudio con el agonista de TRAP-6 (10 μ M). En este se observó una actividad aproximada a la del extracto de *Solarium lycopersicum*, técnica de referencia para control positivo, con una agregación plaquetaria de aproximadamente 9% que se detalla en la figura 12.

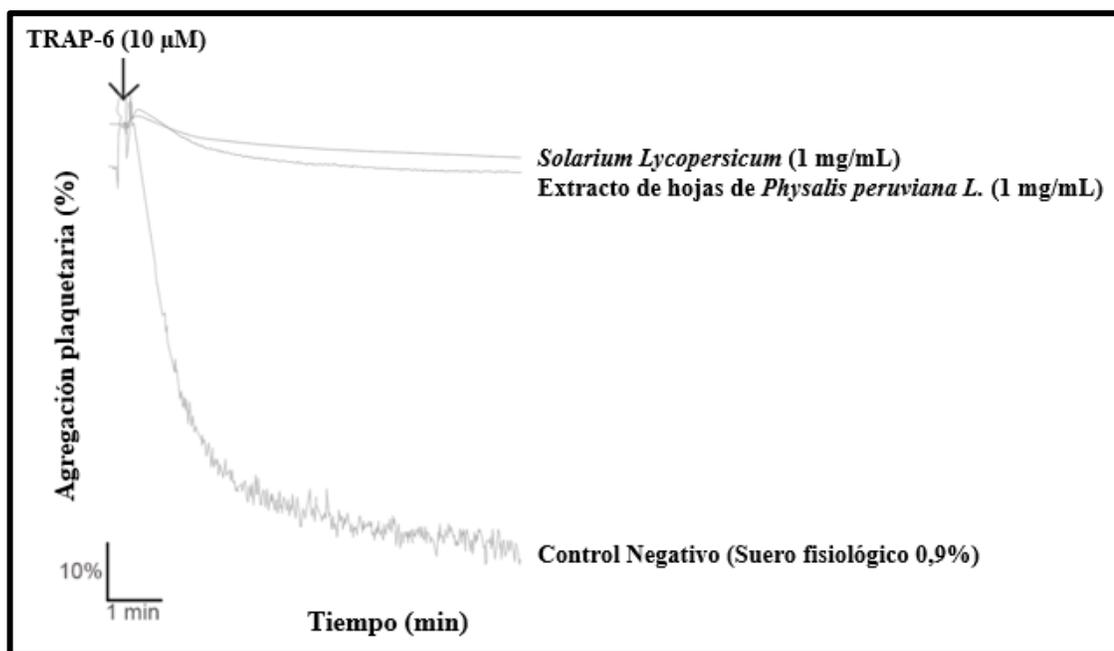


Figura 12. EFECTO INHIBITORIO DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μM). Se realizó la incubación de PRP con suero fisiológico (0,9%), extracto de *Solarium lycopersicum* (1mg/ml) y extracto en estudio de Hoja de *Physalis peruviana L.* (1mg/mL) por 5 minutos y posterior a eso se efectuó la medición de agregación plaquetaria inducida por TRAP (10 μM), se obtuvo una inhibición de la agregación plaquetaria de aproximadamente 92%, respecto al control, por parte del extracto en estudio.

Los resultados promedio de porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria fueron estadísticamente significativos respecto al control y estos correspondieron en promedio a un 92%, como se observa en la figura 13.

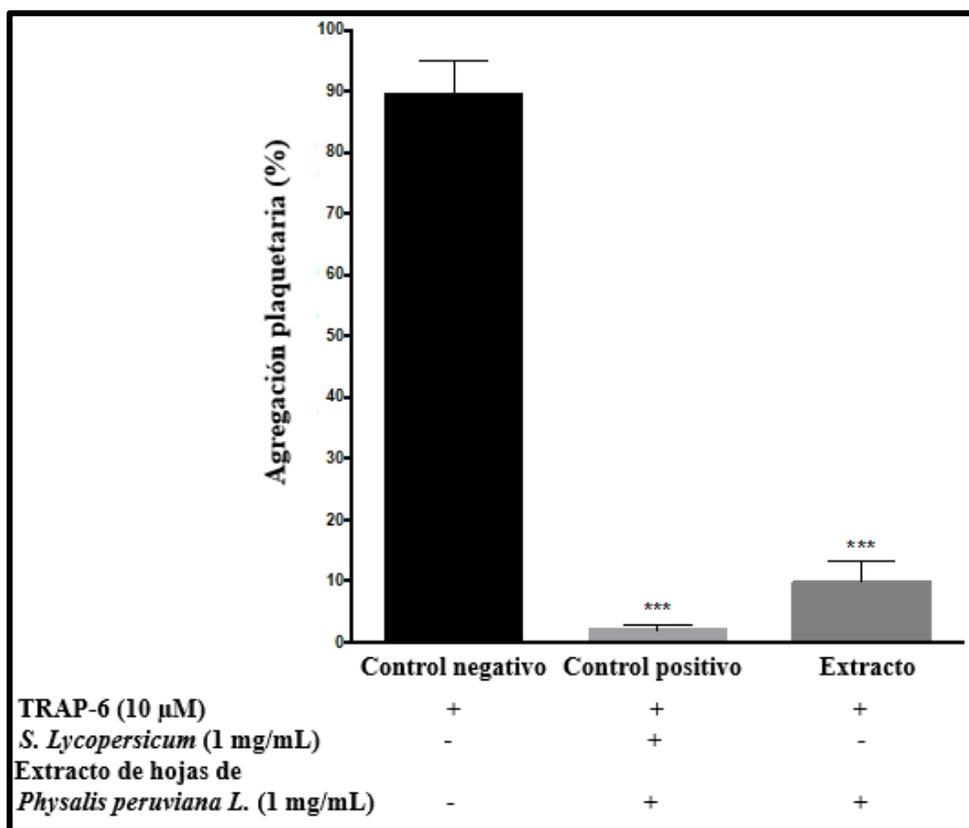


Figura 13. INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA CON EXTRACTO DE HOJA DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* INDUCIDA POR TRAP-6 (10 μM). La representación de esta grafica de la media más el Error estándar de la media (SEM) de las determinaciones por duplicado en seis pacientes, los valores obtenidos fueron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,001$.

En la tabla 8 se detallan los valores de la Media de porcentaje de agregación plaquetaria y de inhibición de esta, con los diferentes agonistas utilizados y su significancia estadística. Se determina que los datos reportados fueron estadísticamente significativo respecto a los controles.

Tabla 8. DATOS ESTADÍSTICOS DEL ESTUDIO DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DEL EXTRACTO DE HOJAS DE *PHYSALIS PERUVIANA L.* (AUTORIA PROPIA, 2020).

Tipo de Agonista	Media de Porcentaje de Agregación plaquetaria	Porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria	Significancia estadística
ADP (4 μ M)	11,37%	90,3%	p < 0,001
TRAP-6 (10 μ M)	9,19%	92,9%	p < 0,001

7. DISCUSION

Las Enfermedades Cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial y nacional (62). En estas patologías la actividad plaquetaria cumple un rol importante en la presentación del desbalance entre factores proagregantes y antiagregantes, que como consecuencia, desencadenan en el rompimiento de la placa aterosclerótica, la generación de un trombo y el episodio de obstrucción aguda o isquemia de una vaso sanguíneo (63).

Se han descrito los factores de riesgo asociados al origen de ECV, donde se presentan los siguientes: tabaquismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus, entre otros, los cuales deben ser el enfoque preventivo de estas enfermedades, a través, del control o disminución de estos factores (64).

En la actualidad la prevención se enfoca en una disminución de los factores de riesgo modificables, por medio de la promoción de alternativas beneficiosas que disminuyan la incidencia de casos que causen estas enfermedades, mediante intervenciones relativas al modo de vida, así como farmacológicas, que les ayuden a abandonar el consumo de tabaco, seguir un régimen alimentario saludable, aumentar la actividad física y controlar el peso, la presión arterial, la lipidemia y la glucemia (65). Esta nueva perspectiva de prevención se ha ido enfocando en el estudio de los efectos de diversos componentes de frutas y verduras, ya que estas, se han estudiado por sus diversas propiedades beneficiosas para la salud.

En la últimas décadas, existe evidencia que la prevención de enfermedades se deriva a un control de la alimentación de las personas, es por ello, que incluir frutas y verduras a una dieta diaria, benefician el prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares por medio de los componentes protectores, tales como, el poseer una cantidad importante de antioxidantes y nutrientes que tienen la función de protección de las lipoproteínas, de la

oxidación de las células vasculares y de otros mecanismos, como la disminución de los niveles de lípidos en el plasma (colesterol LDL, triglicéridos) y la respuesta a la agregación plaquetaria (66, 67).

En los últimos tiempos ha incrementado la incidencia de enfermedades cardiovasculares en los países desarrollados, y con ello ha aumentado la necesidad de encontrar compuestos antiplaquetarios eficaces que tengan menores contraindicaciones, es por ello, que buscar una solución alternativa o suplementaria como el uso de bayas frescas o de extractos de bayas se presenta como una solución para la prevención del desarrollo de estas enfermedades, debido a que, poseen altas concentraciones de compuestos fenólicos, es decir, ácido fenólico, estilbenoides, flavonoides y lignanos, que tienen efectos en la actividad plaquetaria y con ello en sistema cardiovascular (66, 68).

La planta *Physalis peruviana L.*, se distribuye en varios lugares del mundo, donde a nivel nacional se ubica en la zona sur (69). Esta especie se la han atribuido diferentes propiedades beneficiosas para la salud, donde se destaca, propiedad hipoglicemiante, antiinflamatoria, antihepatotóxica, antioxidante, entre otras. El fruto de bayas doradas se han descrito la presencia de varios compuestos bioactivos como polifenoles, provitamina A, Vitamina C, Vitamina E, etc. Cabe destacar que se ha estudiado la concentración de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, donde este fruto presenta mayor cantidad de estos compuestos (70).

Para este estudio se utilizaron las hojas de la planta *Physalis peruviana L.*, debido a que extractos de esta especie han demostrado importantes actividades antibióticas, antioxidantes y antiinflamatorias. Se describe la composición de las hojas con alta cantidad compuestos activos como flavonoides, alcaloides, triterpenoides, ceramidas, diferentes esteroides, entre otros (59). En otra investigación se pudo constatar que las hojas estaban compuestas mayoritariamente por ácidos de cadena larga, siendo el ácido hexadecanoico el más

prevalente, cabe destacar que se han reportado que los ácidos grasos de cadena larga presentan actividad antibacteriana y antiinflamatoria (71).

Estudios han revelado que compuestos fenólicos como los flavonoides poseen efecto vasorrelajante e hipotensor, capacidad antioxidante y antiagregante plaquetario, lo cual productos naturales que contengan estos componentes, como las hojas de *Physalis peruviana L.*, se les puede atribuir un efecto protector en la prevención de las ECV (72, 73).

El estudio del efecto antiagregante plaquetario se ha realizado en varias frutas, tales como, uva negra (*Vitis vinifera*), piña (*Ananas sativus*), frutilla (*Fresalfragaria vesca*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*) y en hortalizas, como por ejemplo, ajo (*Allium sativum*), la cebolla (*Allium cepa*), el cebollín (*Allium schoeno rasum*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y el melón (*Cucurbitacea cucumis melo*) (9). Pero no existen registros de estudios de actividad antiagregante plaquetaria de las hojas de *Physalis peruviana L.*

El planteamiento inicial de que las hojas *Physalis peruviana L.* podrían tener actividad antiagregante plaquetaria, debido a su alta cantidad de polifenoles, tales como, los flavonoides, se confirma con este estudio su propiedad antiagregante plaquetaria en el extracto de prueba frente a dos diferentes agonistas, por lo que, el consumo de las hojas podría tener efectos beneficioso para la prevención de ECV.

La actividad antiagregante de los extractos etanólicos de las hojas de *Physalis peruviana L.* fue de 11,37% inducida por ADP (4 μ M) y de un 9,19% inducida por TRAP-6 (10 μ M), ambos valores estadísticamente significativos. Adicionalmente se calculó el porcentaje de inhibición de agregación plaquetaria, donde se obtuvo un 90,3% inducida por ADP (4 μ M) y un 92,9% inducida por TRAP-6 (10 μ M) con un $p < 0,001$, considerando las dos mediciones como estadísticamente significativas.

Se puede tener en evidencia que los resultados obtenidos por las hojas de *Physalis peruviana L.* se complementan con otros estudios de actividad antiagregante plaquetaria de como lo es el extracto de lúpulo gastado, que inhibió la agregación plaquetaria inducida por ADP en un 11% para 7,5 uM/mL (74). Además de estudios *in vitro* de extracto de la hoja de Carica papaya encontrándose que actúan directamente en las plaquetas, previenen la agregación plaquetaria y posee propiedades estabilizadoras de membrana (75). Estudio de inhibición de la agregación de plaquetas en sangre total por compuestos en extractos de diente de ajo donde se encontró que la mayor parte de la actividad antiagregante de los homogeneizados de dientes de ajo se debió a la adenosina, entre otros estudios (76).

Se reconoce también el efecto antiplaquetario de la fruta Granada la cual posee extractos ricos en compuestos fenólicos, que tiene la capacidad de reducir la agregación plaquetaria a bajas concentraciones de fenoles, presento una marcada actividad inhibitoria del ciclo oxigenasa 1 (COX-1) presentando un efecto antiplaquetario (77).

Se demostró la actividad antiplaquetaria de las hojas de *Physalis peruviana L.*, donde su consumo se podría realizar, a través, de infusiones, aceites, extracción de derivados, entre otros, como un tratamiento suplementario de prevención de ECV, cabe destacar, que se necesitan mas estudios respecto a la funcionalidad *in vivo* de estos extractos, debido a que se han descrito diferencias de activación de los flavonoides, específicamente la quercetina, en sus estudios de efectos *in vivo* versus los estudios *in vitro* (73).

8. CONCLUSIÓN

Los extractos de hojas de *Physalis peruviana L.* provenientes del Centro Regional de Abastecimiento (CREA) de la ciudad de Talca, inhibieron la agregación plaquetaria inducida por ADP (4 μ M) y TRAP-6 (10 μ M).

Se coloca en evidencia que los estudios realizados a esta planta han sido enfocados a la composición y efectos de sus frutos, por lo que falta evidencia científica de los efectos de los derivados de las hojas, a pesar de lo anterior, la descripción fisicoquímica de las hojas es de un alto contenido de polifenoles, entre ellos los flavonoides, lo que pueden estar relacionados a la actividad antiagregante.

La utilización de hojas constituye una alternativa adicional de materia prima para el consumo de esta planta y sus derivados.

Las hojas se proyectan como una importante alternativa de tratamiento suplementario en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Enfermedades no transmisibles 2020 [Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles#:~:text=Las%20enfermedades%20cr%C3%B3nicas%2C%20no%20transmisibles,y%20discapacidad%20en%20el%20mundo>].
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades no transmisibles 2018 [Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases#:~:text=Datos%20y%20cifras&text=Las%20enfermedades%20cardiovasculares%20constituyen%20la,\(1%2C6%20millones\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases#:~:text=Datos%20y%20cifras&text=Las%20enfermedades%20cardiovasculares%20constituyen%20la,(1%2C6%20millones))].
3. Diprece. Guía de Práctica Clínica - Problema de Salud AUGE N ° 05 2018 [Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/garantias-explicitas-en-salud-auge-o-ges/guias-de-practica-clinica/infarto-agudo-del-miocardio/descripcion-y-epidemiologia/>].
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades cardiovasculares [Disponible en: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/].
5. Bejarano JM, Cuixart CB. [Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención. Aten Primaria. 2011;43(12):668-77].
6. Ministerio de Salud. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 [Internet]. 2017. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf.
7. Socarrás Suárez MM, Bolet Astoviza M. Alimentación saludable y nutrición en las enfermedades cardiovasculares. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2010;29:353-63.
8. Organización Mundial de la Salud (OMS). Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles 2019 [Disponible en: https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/es/].

9. Torres-Urrutia C, J L, Moore-Carrasco R, Palomo I. Efecto antitrombótico, una característica poco conocida de las frutas y hortalizas. *Revista Chilena de Nutrición*. 2008;35.
10. Páramo Fernández JA. Sistema hemostático: fisiopatología y aproximación clínica y diagnóstica. *Medicine*. 2012;11(22):1327-36.
11. Tapia J. Enfermedad cerebrovascular y trombofilia. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. 2002;40:37-45.
12. González Vidal E, Leyva Diviú A, Rosquete López G, Londres Frómeta D. Factores De Riesgo De Las Trombosis En La Hemostasia. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2007;11:0-.
13. Flores O, Ramírez K, Meza J, Nava J. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2014.
14. González-Villalva A, Bizarro-Nevarés P, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, Barbosa-Barrón F, et al. El megacariocito: una célula muy original. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. 2019;62:6-18.
15. White JG. Estructuras opacas de electrones en plaquetas humanas: ¿Cuáles son o no cuerpos densos? *Plaquetas*. 2008;19(6):455-66.
16. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Revista Española de Cardiología*. 2009;62(10):1161-78.
17. Dalmau A. *Fisiología De La Hemostasia* 2005.
18. Marchi R. Fibrinógeno y fibrina: estructura y aspectos funcionales. *Trombina: función y fisiopatología*. Editores de ciencia Nova. 2012.
19. Martinuzzo M. Sistema de coagulación *Hematología* 2017;21 31-42
20. Osorioz JH, Quenán YE, Borja Gómez W. Evolución y cambios en el sistema de la coagulación sanguínea. Una reflexión. *Universidad y Salud*. 2013;15:225-37.

21. Guerrero B, López M. Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Investigación Clínica*. 2015;56:432-54.
22. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Descripción general de la fisiología plaquetaria: su papel hemostático y no hemostático en la patogenia de la enfermedad. *Revista del mundo científico*. 2014;2014:781857.
23. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Disfunción plaquetaria en diabetes tipo 2. *Cuidado de la diabetes*. 2001;24(8):1476-85.
24. Pérez Ruíz AO, Castillo Herrera JA, Gortazar González T, Alvarez Fornari M, Douglas Pedroso R, Díaz Rondón B. Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1997;16:150-5.
25. RE R, P. T. *Interacciones en la hemostasia y la trombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2010.
26. Hanson SR, Slichter SJ. Cinética plaquetaria en pacientes con hipoplasia de médula ósea: evidencia de un requerimiento fijo de plaquetas. *Sangre*. 1985;66(5):1105-9.
27. Slichter SJ. Relación entre el recuento de plaquetas y el riesgo de hemorragia en pacientes trombocitopénicos. *Reseñas de Medicina de Transfusión*. 2004;18(3):153-67.
28. Bermejo E. Plaquetas. *Hematología*. 2017; 21.
29. Pérez Ruiz AO, Cartaya Padrón L, Valencia Fernández V, Sanjurjo Gámez V, Ilisástigui Ortueta T. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*. 1998;35:56-61.
30. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*. 2013;13:2-7.
31. MF A. Rol de la agregometría por método óptico en el estudio de función plaquetaria. *Hematología*. 2016.

32. Lumley P, Humphrey PPA. Un método para cuantificar la agregación plaquetaria y analizar las interacciones fármaco-receptor en plaquetas en sangre completa in vitro. *Revista de métodos farmacológicos*.1981;6(2):153-66.
33. Gómez-Gómez B, Rodríguez-Weber FL, Díaz-Greene EJ. Fisiología plaquetaria, agregometría plaquetaria y su utilidad clínica. *Medicina interna de México*. 2018;34:244-63.
34. Fourcade M. *El Endotelio Vascular*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina 2008.
35. Carvajal Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2017;34:90-100.
36. Dubosq C. *Endotelio vascular*. Hematología. 2017.
37. Zárate A, Manuel-Apolinar L, Basurto L, De la Chesnaye E, Saldívar I. Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*. 2016;86(2):163-9.
38. Sarre-Álvarez D, Cabrera-Jardines R, Rodríguez-Weber F, Díaz-Greene E. Enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Medicina interna de México*. 2018;34:910-23.
39. García Pérez AA, Tahoces Romero ML, Alonso García I, Giménez Samper M, Alvado Pérez U. los fármacos antiagregantes plaquetarios. *Medicina Integral*. 2003;31(4):320-9.
40. Casamitjana i Cucurella N. Antiagregantes plaquetarios .Aplicaciones clínicas. *Farmacia Profesional*. 2003;31(4):62-5.
41. Kalyanasundaram A, Lincoff AM, Medscape. Manejo de los efectos adversos y las interacciones farmacológicas de los agentes antiplaquetarios. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(10):592-600.
42. Iqbal AM HO. Medicamentos antiplaquetarios. En: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 ene-.2019.

43. Blasco Valle M, Lucía Cuesta JF. Revisión de los antiagregantes plaquetarios y sus indicaciones en atención primaria. Ocho años después. *Atención Primaria*. 2003;31(4):252-63.
44. Adebawo O, Salau B, Ezima E, Oyefuga O, Ajani E, Idowu G, et al. Frutas y verduras factores de riesgo cardiovascular lipídicos moderados en pacientes hipertensos. *Lípidos en la salud y la enfermedad*. 2006;5(1):14.
45. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 2012;27:76-89.
46. Cheng Y-C, Sheen J-M, Hu WL, Hung Y-C. Polifenoles y estrés oxidativo en la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular relacionados con la aterosclerosis. *Medicina oxidativa y longevidad celular*. 2017;2017:8526438-.
47. El-Gengaihi SE, Hamed MA, Khalaf-Allah Al-R, Mohammed MA. El jugo de bayas de oro atenúa la gravedad de la lesión hepatorenal. *J Diet Suppl*. 2013;10(4):357-69.
48. Perk BO, Ilgin S, Atli O, Duymus HG, Sirmagul B. Efectos tóxicos agudos y subcrónicos de los frutos de *Physalis peruviana L*. Complemento basado en Evid Alternat Med. 2013;2013:707285.
49. Yen C-Y, Chiu C-C, Chang F-R, Chen JY-F, Hwang C-C, Hseu Y-C, et al. El 4 β -hidroxiwittanolide E de *Physalis peruviana* (baya dorada) inhibe el crecimiento de las células cancerosas de pulmón humano a través del daño del ADN, la apoptosis y la detención de G2 / M. *BMC Cancer*. 2010;10(1):46.
50. Reyes-Beltrán MED, Guanilo-Reyes CK, Ibáñez-Cárdenas MW, García-Collao CE, Idrogo-Alfaro JJ, Huamán-Saavedra JJ. Efecto del consumo de *Physalis peruviana L*. (aguaymanto) sobre el perfil lipídico de pacientes con hipercolesterolemia. *Acta Médica Peruana*. 2015;32:195-201.
51. Muñoz Jáuregui AM, Ramos-Escudero DF, Alvarado-Ortiz Ureta C, Castañeda Castañeda B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2007;73:142-9.

52. Zaki A, EI-Aify, El Gohary, . Egipto. /. FarmacéuticoSci.1987. p. 235-45. .
53. Hassanien M. Baya de oro: fruto dorado del futuro dorado 2008.
54. Aristizábal Montoya Am. Uchuva (*Physalis peruviana L*): estudio de su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos con características funcionales.
55. Mendoza Ch Jh, Rodríguez De S A, Millán C P. Caracterización Físico Química De La Uchuva (*Physalis Peruviana*) En La Región De Silvia Cauca. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2012;10:188-96.
56. Llumiguano LF. "Evaluación Del Efecto Hipoglicemiante Del Extracto De Hojas De Chapuca O Uvilla Silvestre" (*Physalis Peruviana*). En Ratas (*Rattus Norvegicus*) Con Hiperglicemia Inducida ". Riobamba - Ecuador Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2014
57. Honicke, Flores v, Gerhard, Sora A, Almanaza p, Angulo r, Campos a, et al. Producción, Poscosecha Y Exportación De La Uchuva (*Physalis peruviana L*). Gerhard Fv, sora Ad, editors. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía 2000.
58. Locka O, Rojas R. Química y Farmacología de *Physalis peruviana L*. ("Aguaymanto"). Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima 32, Perú
- Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú
59. Hernández M. Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana L*. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquímica Unidad De Posgrado, Lima, Perú 2015.
60. Fuentes E, Castro R, Astudillo L, Carrasco G, Alarcón M, Gutiérrez M, et al. Aislamiento guiado por bioensayo y determinación por HPLC del compuesto bioactivo relacionado con la actividad antiplaquetaria (adhesión, secreción y agregación) de *Solanum Lycopersicum*. Complemento basado en Evid Alternat Med. 2012;2012:147031.

61. Alarcón M, Fuentes E, Olate N, Navarrete S, Carrasco G, Palomo I. El extracto de fresa presenta actividad antiplaquetaria por inhibición del mediador inflamatorio de la aterosclerosis (sP-selectina, sCD40L, RANTES e IL-1 β) y formación de trombos. *Plaquetas*. 2015;26(3):224-9.
62. Medina E, Kaempffer A. Enfermedades cardiovasculares en Chile. Aspectos epidemiológicos. Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile 2007.
63. Andrade-Talavera Y, Martín I, C V-P. Activación plaquetaria: Aspectos básicos, participación en la Enfermedad Cerebrovascular y proyecciones terapéuticas. *Revista Ecuatoriana de Neurología*. 2007;16:127-32.
64. Baena Díez JM, del Val García JL, Tomàs Pelegrina J, Martínez Martínez JL, Martín Peñacoba R, González Tejón I, et al. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(4):367-73.
65. (OMS) OMDIS. Prevención de las enfermedades cardiovasculares, Directrices para la evaluación y el manejo del riesgo cardiovascular. 2007.
66. Olas B. La multifuncionalidad de las bayas hacia las plaquetas sanguíneas y el papel de los fenólicos de las bayas en los trastornos cardiovasculares. *Plaquetas*. 2017;28(6):540-9.
67. Gimeno Creus E. Papel de la dieta en la enfermedad cardiovascular. *Offarm*. 2002;21(5):100-4.
68. Dutta-Roy AK, Crosbie L, Gordon MJ. Efectos del extracto de tomate sobre la agregación plaquetaria humana in vitro. *Plaquetas*. 2001;12(4):218-27.
69. Crosley L, Henríquez JM, Parra F, Pacheco P, Escobar H, Parra C. Rescate del cultivo de Goldenberry (*Physalis peruviana*) en los Andes del norte de Chile. *Idesia (Arica)*. 2019;37:115-8.

70. Jurado Teixeira B, Aparcana Aaturima IM, Villarreal Inca LS, Ramos Llica E, Calixto Cotos MR, Hurtado Manrique PE, et al. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2016;82:272-9.
71. Morillo, Marielba, Marquina, Virginia, Rojas Fermín, Luis, Aparicio, Rosa, Carmona, Juan, Usubillaga A. Estudio de la Composición Química del Aceite Esencial de Hojas y Tallos de *Physalis Peruviana L.* 2018. 2018;16(38):9.
72. Tenorio López FA, del Valle Mondragón L, Pastelín Hernández G. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Archivos de cardiología de México*. 2006;76:33-45.
73. Duarte J, Pérez-Vizcaíno F. Protección cardiovascular con flavonoides: enigma farmacocinético. *Ars Pharmaceutica (Internet)*. 2015;56:193-200.
74. Luzak B, Golanski J, Przygodzki T, Boncler M, Sosnowska D, Oszmiański J, et al. El extracto de lúpulo gastado (*Humulus lupulus L.*) reduce la agregación de plaquetas sanguíneas y mejora la actividad anticoagulante de las células endoteliales humanas in vitro 2016. 257-69 p.
75. Chinnappan S, Ramachandrappa VS, Tamilarasu K, Krishnan UM, Pillai AK, Rajendiran S. Inhibición de la agregación plaquetaria por el extracto de hoja de *Carica papaya* durante la infección por dengue: un estudio in vitro. *Immunol viral*. 2016;29(3):164-8.
76. Lawson LD, Ransom DK, Hughes BG. Inhibición de la agregación de plaquetas en sangre total por compuestos en extractos de diente de ajo y productos comerciales de ajo. *Thromb Res*. 1992;65(2):141-56.
77. Lutz M, Fuentes E, Ávila F, Alarcón M, Palomo I. Papel de los compuestos fenólicos en la reducción de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. *Moléculas*. 2019;24(2).