



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

**EFEECTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL *PHASEOLUS VULGARIS L.*
SOBRE LA ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN PLAQUETARIA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORAS: ANA FLORES RÍOS
KAREN MUÑOZ VALENZUELA
PROFESOR GUIA: DR. TM. EDUARDO FUENTES QUINTEROS**

**TALCA-CHILE
2022**

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, 2023

DEDICATORIA

A nuestros padres, hermanos y pequeñas sobrinas, por apoyarnos incondicionalmente, creer en nosotras, además de ser el impulso para continuar y mejorar día a día.

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”. Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos por la confianza y oportunidad a nuestro profesor guía Eduardo Fuentes y el apoyo de los colaboradores del Centro de Investigación en Trombosis que nos acogieron y nos dieron un grato ambiente de trabajo, con especial mención a Lyanne Rodríguez y Diego Méndez, por su paciencia y disponibilidad para enseñarnos e instruirnos en el laboratorio durante nuestra investigación.

Agradecemos a nuestras familias por el amor, comprensión y apoyo que nos brindaron en cada momento, motivándonos a seguir a pesar de las adversidades, enseñándonos que la perseverancia y la paciencia son esenciales para cumplir nuestros objetivos.

Agradecemos a nuestros amigos Lucía Fuenzalida e Ignacio Espronceda quienes nos apoyaron incondicionalmente, impulsaron, alegraron y acompañaron en todo momento.

Agradecemos al Dr. Basilio Carrasco del Centro de Estudios en Alimentos Procesados-CEAP, ANID, Programa Regional R20F0001, Talca, Chile.

Agradecemos a FONDEQUIP N° EQM200049, ANID y FONDECYT REGULAR N°1220339, ANID, por el financiamiento

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 Enfermedades cardiovasculares.....	10
3.1.1 Prevalencia en Chile y el mundo	11
3.1.2. Trombosis.....	12
3.1.2.1 Fisiopatología trombosis venosa.....	12
3.1.2.2 Fisiopatología trombosis arterial	13
3.2 Plaquetas	16
3.2.1 Función plaquetaria	17
3.2.1.1 Adhesión plaquetaria	17
3.2.1.2 Activación plaquetaria	18
3.2.1.3 Agregación plaquetaria.....	18
3.2.2 Marcadores de activación plaquetaria	19
3.2.2.1 P-selectina (CD62P).....	20
3.2.2.2 Receptor IIb/IIIa	21
3.2.2.3 CD40L (CD154).....	22
3.3 Tratamientos antiagregantes plaquetarios	23
3.3.1 Ácido acetilsalicílico (AAS).....	24
3.3.2 Clopidogrel.....	25
3.3.3 Abciximab	25
3.4 Consumo frutas y hortalizas como estrategias de ECV	26
3.5 Compuestos bioactivos	27
3.5.1 Compuestos fenólicos (CF)	27
3.6 El poroto.....	28
3.6.1 Composición del poroto	29
3.6.2 Compuestos bioactivos del <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	30
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo general	33

5.2	Objetivos específicos	33
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1	Reactivos	34
6.2	Toma de muestra de sangre.....	34
6.3	Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)	35
6.4	Estudio <i>in vitro</i> de la agregación plaquetaria	36
6.5	Cálculo de inhibición de la agregación plaquetaria	37
6.6	Estudio de activación plaquetaria y expresión P-Selectina mediante citometría flujo ...	37
6.7	Análisis estadístico	39
7.	RESULTADOS.....	40
8.	DISCUSIÓN.....	44
9.	CONCLUSIONES.....	48
10.	REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Trombosis arterial y venosa	15
Figura 2. Activación plaquetaria	19
Tabla 1. Propiedades de fármacos antiplaquetarios	24
Figura 3. Compuestos químicos del frijol	29
Tabla 2. Mecanismos antiplaquetarios de compuestos bioactivos del poroto	31
Figura 4. Estudio de agregación plaquetaria en presencia de compuestos fenólicos	40
Figura 5. Estudio de agregación plaquetaria en presencia de Rutina a diferentes concentraciones.	41
Figura 6. Efecto dosis sobre la inhibición de agregación de Rutina en presencia de ADP.	42
Tabla 3. Concentración inhibitoria media máxima (IC ₅₀) de compuestos fenólicos sobre la agregación plaquetaria estimulada por ADP, colágeno y TRAP-6.	42
Figura 7. Estudio de expresión de P-selectina estimulada con ADP	43

1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo, siendo un problema de salud pública donde tienen especial relevancia los diversos factores de riesgo tales como obesidad, sedentarismo, tabaquismo entre otras, ya que predisponen al desarrollo de este tipo de patologías donde también se ha evidenciado que las plaquetas poseen una gran importancia. Para el control y/o disminución del riesgo de padecer ECV existen varios tipos de tratamientos antiagregantes, pero por su uso prolongado no están exentos de complicaciones y pueden resultar no ser tan efectivos en toda la población, por ello es necesario el apoyo de una dieta rica en frutas y hortalizas que posee un efecto cardioprotector gracias a que en su composición poseen compuestos bioactivos.

Phaseolus vulgaris L. más conocido como poroto es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano directo, que de igual manera presenta compleja composición química con un alto contenido de compuestos fenólicos los cuales no han sido completamente dilucidados, es por ello, que en esta investigación busca determinar el posible efecto antiplaquetario de tres flavonoides que se encuentran en mayor contenido en el poroto, siendo estos: Rutina, Kaempferol-3-O-glucósido (K-3-G) y Ácido cafeoil málico (ACM) y la mezcla de ellos, donde se pudo evidenciar que la Rutina posee un efecto antiplaquetario a concentraciones inferiores a 1 mg/ml, obteniendo IC₅₀: 0,54 ± 0,21 mg/ml al ser inducida la agregación con ADP a una concentración 4µM, además de que no se evidenció sinergia entre los tres compuestos fenólicos evaluados Rutina, K-3-G y ACM y se necesitan estudios adicionales respecto al posible efecto de ACM en la función plaquetaria.

Palabras claves: Agregación plaquetaria, flavonoides, compuestos fenólicos, enfermedades cardiovasculares.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad en Chile y el mundo, donde sus manifestaciones más comunes son las enfermedades isquémicas del corazón y accidentes cerebrovasculares (ACV). Existen factores de riesgo modificables y no modificables que predisponen a este tipo de enfermedades, el primero de estos factores son principalmente hábitos y/o conductas como el tabaquismo, sedentarismo, consumo de anticonceptivos, inmovilidad prolongada, obesidad, hipercolesterolemia, donde la dieta y el consumo de frutas y hortalizas es clave para la salud y prevención de ECV. En cuanto a los factores no modificables se encuentran la edad, sexo y antecedentes genéticos.

Se ha evidenciado la importancia de las plaquetas en el desarrollo de las ECV, ya que comúnmente en personas sanas existe un equilibrio homeostático entre fuerzas pro y anticoagulantes, cuando este equilibrio se pierde por acumulación de sustancias protrombóticas, disfunción del endotelio vascular y/o hiperreactividad plaquetaria, hay una mayor predisposición a la formación patológica de trombos dentro de la circulación sanguínea causando un daño importante en los órganos o incluso la muerte. Si el trombo se forma a nivel de las válvulas venosas, y se desprende un émbolo que viaja por la circulación aumenta el riesgo de que se produzca una embolia u obstrucción brusca del flujo sanguíneo de los pulmones, generando lo que se conoce como embolia pulmonar (EP).

En cuanto a la trombosis arterial, se desencadena debido la suma de factores predisponentes que genera que los vasos sanguíneos se vuelvan más gruesos y rígidos, en conjunto con la acumulación de depósitos de grasa y macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) en la pared arterial, conduce a la formación de una placa aterosclerótica, que

cuando se rompe desencadena un reclutamiento masivo de plaquetas quienes se adhieren activan generando una rápida formación y crecimiento del trombo, el cual puede reducir el flujo sanguíneo de manera parcial o total en distintos órganos, conduciendo a eventos isquémicos, infarto agudo al miocardio (IAM), ACV, entre otros.

Para este tipo de patologías existen tratamientos antiplaquetarios que impiden la formación de trombos, pero, por su uso prolongado no están exentos de complicaciones y pueden resultar no ser tan efectivos en toda la población, es por ello que se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas que potencialmente permitan una acción antitrombótica eficaz.

Estudios recientes han evidenciado que el consumo de frutas, verduras y legumbres como el poroto posee un efecto cardioprotector, ya que gracias a su composición nutricional influye directamente en los principales factores de riesgo de ECV regulando los niveles de glicemia, colesterol (LDL), presión arterial.

El *Phaseolus vulgaris L.* (llamado localmente poroto) es conocido por su alto contenido de fibra y proteína, sin embargo, se ha demostrado en múltiples estudios que tiene diversos compuestos bioactivos o fitoquímicos, como fenoles destacándose flavonoides y ácidos fenólicos, quienes poseen numerosas propiedades biológicas en la salud, pero particularmente se ha descrito que poseen efecto sobre la función plaquetaria humana, sin embargo, en la literatura no existe evidencia del efecto de determinados compuestos sobre la agregación y activación plaquetaria, por lo que, es de vital importancia el estudio específico de algunos de ellos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo (1). Este tipo de patologías constituyen un conjunto de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos, haciendo que este órgano trabaje con mayor esfuerzo. Las ECV poseen un desarrollo progresivo a través del tiempo, por esta razón en muchas ocasiones suelen presentarse sin dolor ni síntomas, y a consecuencia de esto a menudo no se tratan, lo que puede conducir a problemas de salud más serios (2, 3).

Este tipo de patologías se desencadenan por factores de riesgo modificables y no modificables. Los factores no modificables se caracterizan por ser propios del individuo como el sexo, perfil genético y la edad, esta última se ha evidenciado que a medida que envejecemos se genera un estado protrombótico donde aumentan los factores de coagulación aumentando el riesgo de padecer una ECV (4, 5).

En cambio, los factores modificables son un foco de intervención para la prevención de ECV como IAM, aterosclerosis, trombosis venosa profunda (TVP), entre otras, de modo que al controlarlos disminuye significativamente el riesgo de padecerlas, dentro de estos factores se encuentra hipertensión arterial (HTA), consumo de sal >5g al día, hipercolesterolemia, mala alimentación, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), sedentarismo y el

tabaquismo, este último al inhalar sustancias químicas del tabaco puede dañar corazón y vasos sanguíneos (6, 7).

3.1.1 Prevalencia en Chile y el mundo

Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que cada año fallecen 17,9 millones de personas por ECV, lo cual representa el 32% del total de las defunciones en el mundo, de las cuales el 85% se deben principalmente a cardiopatías coronarias y ACV que afectan en gran medida a los países de ingresos bajos y medios (3). Anualmente estas enfermedades causan alrededor de 3,9 millones de muertes en Europa (8), y 2 millones de muertes en América (9).

En Chile según el informe reportado por el Departamento de estadísticas e información de Salud (DEIS) el 2020, las ECV fueron la principal causa de muerte con un total de 27.272 defunciones, de las cuales el 28,1% correspondieron a enfermedades isquémicas del corazón y un 26,9% correspondieron a enfermedades cerebrovasculares (10). Estas cifras se correlacionan con la alta prevalencia nacional de los factores de riesgo reportados en la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017, donde el sedentarismo presentó una prevalencia de 86,7%, HTA de 27,6%, DMT2 12,3%, tabaquismo 33,4%, el consumo de sal 98,5% y obesidad 34,4% (11) .

3.1.2. Trombosis

La hemostasia vascular y la trombosis son reguladas por vías similares, donde comparten mediadores cruciales como las plaquetas, células endoteliales y las proteínas de coagulación circulantes que interaccionan entre sí (12, 13). En la trombosis se produce la formación de un trombo (coágulo) que según de su origen bloquea vasos sanguíneos arteriales o venosos, por lo que hay dos tipos de trombosis: arterial y venosa (14), las cuales tienen diferentes mecanismos fisiopatológicos que están vinculados con la triada de Virchow descrita en 1856, la cual incluye: daño al revestimiento endotelial de la pared del vaso; estado de hipercoagulabilidad, y estasis de sangre arterial o venosa, que son condiciones que predisponen a la formación de trombos (15).

En la trombosis venosa, los estados de hipercoagulación primaria reflejan defectos en las proteínas que rigen la coagulación o la fibrinólisis o los estados de hipercoagulabilidad secundaria que conllevan a anomalías de los vasos sanguíneos y del flujo sanguíneo o estasis desencadenando la trombosis. En cambio, la trombosis arterial depende en gran medida del estado de la pared vascular, las plaquetas y los factores relacionados con el flujo sanguíneo (16).

3.1.2.1 Fisiopatología trombosis venosa

Las condiciones clínicas que más están asociadas a la trombosis venosa se relacionan con elementos de la triada de Virchow, estos incluyen cirugía o trauma, malignidad, embarazo, insuficiencia cardíaca congestiva, venas varicosas, obesidad, edad avanzada, antecedentes de

TVP e inmovilidad prolongada (17). Esta última tiene relación con la estasis sanguínea (18), favoreciendo la acumulación de sustancias protrombóticas como la trombina (Figura 1.b), esto ocurre principalmente en áreas como en las válvulas de las venas de la pantorrilla y se puede extender hasta las venas proximales predisponiéndolos a padecer una enfermedad tromboembólica como la TVP (19-21).

Cuando los trombos venosos profundos se desprenden, embolizan, viajan a través del sistema venoso sistémico y se alojan en la circulación pulmonar, lo que se conoce como EP alterando el intercambio de gases, en donde los émbolos más grandes se incrustan en la arteria pulmonar principal, mientras que los émbolos más pequeños ocluyen las arterias periféricas, conduciendo a una insuficiencia ventricular con posterior isquemia miocárdica (22, 23).

3.1.2.2 Fisiopatología trombosis arterial

La trombosis arterial es una enfermedad que se produce cuando el coágulo sanguíneo bloquea una arteria, principalmente se debe a la aterosclerosis, que es un proceso metabólico e inflamatorio crónico que se caracteriza por la acumulación de colesterol, elementos inflamatorios, células espumosas (macrófagos cargados de lípidos) y células musculares lisas las cuales forman una capa fibrosa (esclerosis) alrededor de la pared arterial de vasos de gran y mediano calibre finalmente formando la placa aterosclerótica (24, 25).

En las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario como el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) depositado en la capa íntima de las

arterias, tabaquismo, diabetes, HTA y otros factores emergentes como especies reactivas del oxígeno (EROs), homocisteína, déficit estrogénico, etc. producen disfunción endotelial (26, 27).

Esta disfunción consiste en un desequilibrio de sustancias activas de origen endotelial, generando una disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), aumento de la permeabilidad de la capa endotelial, aumento en la expresión y secreción de compuestos quimiotácticos solubles (MCP-1, IL-8), la expresión moléculas de adhesión como integrinas y selectinas (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) (28, 29) favoreciendo el reclutamiento, adhesión y migración de leucocitos (24).

Cuando esta placa se rompe, expone material trombogénico como colágeno, factor von Willebrand (FvW), fibronectina, laminina y factor tisular (FT) producido por los macrófagos, pudiendo desencadenar la más temida complicación de la aterosclerosis, la trombosis (30, 31).

Las plaquetas pueden interactuar mediante sus receptores de membrana con los factores trombogénicos expuestos ante la ruptura de la placa, lo que permite su adhesión al endotelio, activación y agregación, esta última está mediada por la activación del receptor GPIIb/IIIa (conocida como integrina α IIb β 3) el cual se une a su principal ligando, el fibrinógeno, el cual forma puentes estables entre las plaquetas, desencadenando su reclutamiento masivo a la zona (32, 33). Consecuentemente se genera la formación y crecimiento del trombo rico en plaquetas, que en una última instancia se logra estabilizar mediante la acción de la trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina, formando un trombo sólido (Figura 1.A) (34, 35).

Si el crecimiento del trombo se localiza en la pared del vaso arterial que lleva sangre a un órgano, genera la disminución del aporte sanguíneo lo que se conoce como isquemia, si esto ocurre a nivel coronario o cerebral hasta obstruir totalmente el flujo sanguíneo puede producir un IAM o ACV respectivamente (36).

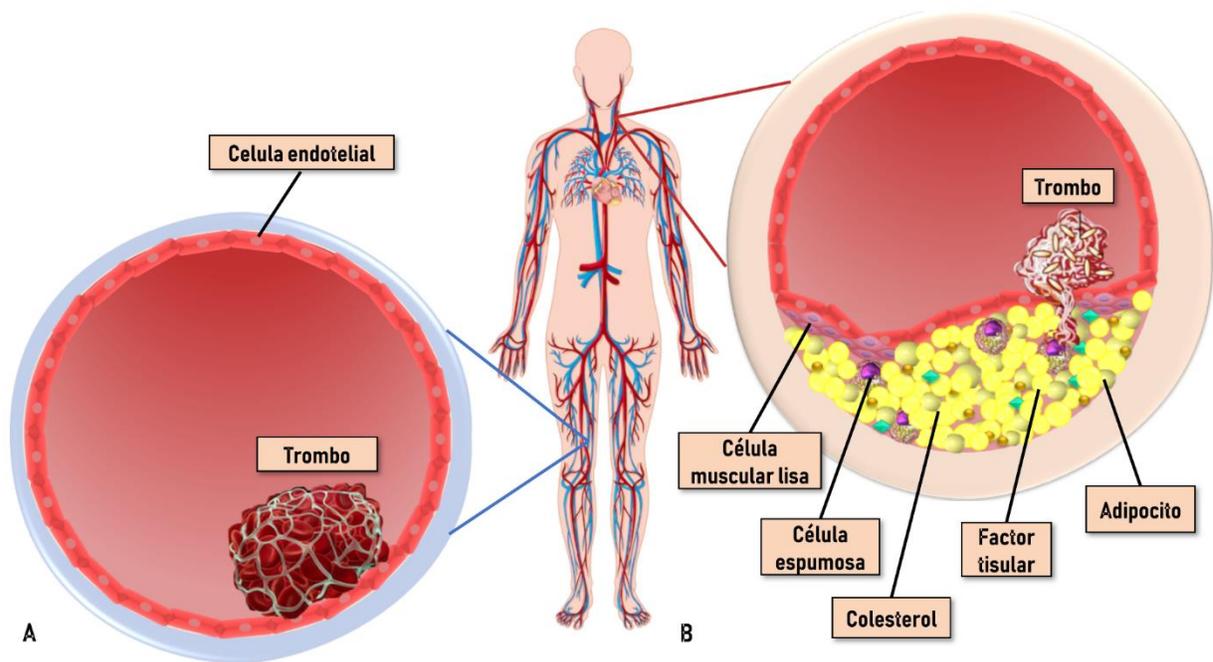


Figura 1: Trombosis arterial y venosa. A) **Vena.** En la trombosis venosa, el endotelio permanece intacto pero se tiende a acumular sustancias protrombóticas en áreas como válvulas de las extremidades inferiores, favoreciendo la formación de trombos a este nivel. B) **Arteria.** En la trombosis arterial su principal desencadenante es la ruptura de la placa aterosclerótica, perdiéndose la continuidad del endotelio exponiendo material trombogénico favoreciendo la llegada de plaquetas a la zona y la consecuente formación de trombo. Fuente: Elaboración propia Flores, A. Muñoz, K. (2022).

3.2 Plaquetas

Las plaquetas son células sanguíneas especializadas que poseen un rol importante en los procesos fisiológicos y patológicos de hemostasia, trombosis, inflamación, mantenimiento del tono vascular, defensa del huésped y metástasis tumoral (12).

Estas se originan en la médula ósea a partir de sus precursores nucleados conocidos como megacariocitos, los cuales a través de la megacariopoyesis que está controlada por la trombopoyetina, citoquinas e interleucinas (37) permite que estos maduren, se diferencien y sufran cambios estructurales en su citoplasma del cual se extienden proyecciones pseudópodos referidas a proplaquetas, las cuales atraviesan la capa endotelial sinusoidal, y desprenden pequeños fragmentos celulares anucleados que corresponden a plaquetas (38).

Las plaquetas son las células sanguíneas más pequeñas (1–2 μ m), discoideas, que revelan su dinamismo a través de su morfología (39). Su intervalo fisiológico va de 150–400 $\times 10^3$ plaquetas/ μ L, y su vida media es de 7 a 10 días (40). Además, dos tercios de ellas están presentes en la circulación general y el tercio restante se encuentra secuestrado reversiblemente en el bazo (41).

Además, son metabólicamente activas ya que poseen gránulos α , densos y lisosomas, cuyos componentes modulan las funciones de las plaquetas. Los gránulos α contienen moléculas como factor von Willebrand (FvW), PF4, P-selectina la cual es uno de los marcadores más predecibles de la activación plaquetaria, también poseen gránulos densos los cuales almacenan calcio, tromboxano A₂ (TXA₂), Adenosín difosfato (ADP) y Adenosin

trifosfato (ATP) (42) en cuanto a los lisosomas plaquetarios estos contienen elastasas y proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular. Este tipo celular posee en su exterior múltiples receptores de naturaleza glicoproteica y no glicoproteica, tales como GPIIb/IIIa, GPIb, GPIa/IIa y P2Y₁₂, P2Y₁, TXA₂R, PAR1, PAR4 respectivamente, los cuales son activados por diferentes agonistas como se muestra en la figura 1 (40, 43).

3.2.1 Función plaquetaria

3.2.1.1 Adhesión plaquetaria

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que no interactúan con la pared vascular intacta, sin embargo, ante una lesión se pierde la continuidad vascular provocando que la matriz extracelular subendotelial se esponga dando inicio a la adhesión plaquetaria (40, 44).

La GPIIb se expresa de forma constitutiva en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión plaquetaria uniéndose al colágeno expuesto mediante su interacción con el FvW, el cual es una glicoproteína adhesiva multimérica que es sintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos (45), que en condiciones de alto cizallamiento forma un puente entre el colágeno expuesto y el complejo GPIb-IX-V mediante la interacción de su dominio A1 con la GPIIb. (44). La GP Ia/IIa (integrina α 2 β 1) y GP VI se adhieren

directamente al colágeno expuesto, promoviendo una adhesión firme lo que induce la activación plaquetaria (46, 47).

3.2.1.2 Activación plaquetaria

Cuando las plaquetas se activan experimentan cambios conformacionales, con la consecuente liberación del contenido de sus gránulos α y densos hacia el sistema canalicular abierto, a partir de los gránulos α se libera GPIIb/IIIa y P-selectina la cual se expresa en la membrana superficial tras la activación plaquetaria (48), por otro lado, los gránulos densos liberan ADP, que luego actúa sobre los receptores plaquetarios acoplados a proteína G, P2Y1 y P2Y12, manteniendo la activación de otras plaquetas y la liberación de ADP y TXA₂ este último se une a su receptor en plaquetario de TXA₂ (Figura 2) (38). A su vez la señalización de receptores acoplados a proteína G conduce a la activación de fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂) a IP₃, lo que induce la movilización de Ca⁺² desde el sistema tubular denso (STD) (47).

3.2.1.3 Agregación plaquetaria

Una vez activadas por los diferentes agonistas, se inicia un proceso de señalización denominado "de adentro hacia afuera" generando cambios conformacionales en el receptor GPIIb/IIIa, aumentando su afinidad por su ligando principal, el fibrinógeno, el cual una vez unido actúa como molécula puente que permite una rápida agregación con las plaquetas adyacentes para evitar el exceso de sangrado (49, 50), esto se logra mediante la formación del tapón plaquetario el cual es frágil inicialmente, y posteriormente debido a la formación y

entrecruzamiento de fibrina logra consolidarse como un coágulo estable logrando la detención del sangrado (47).

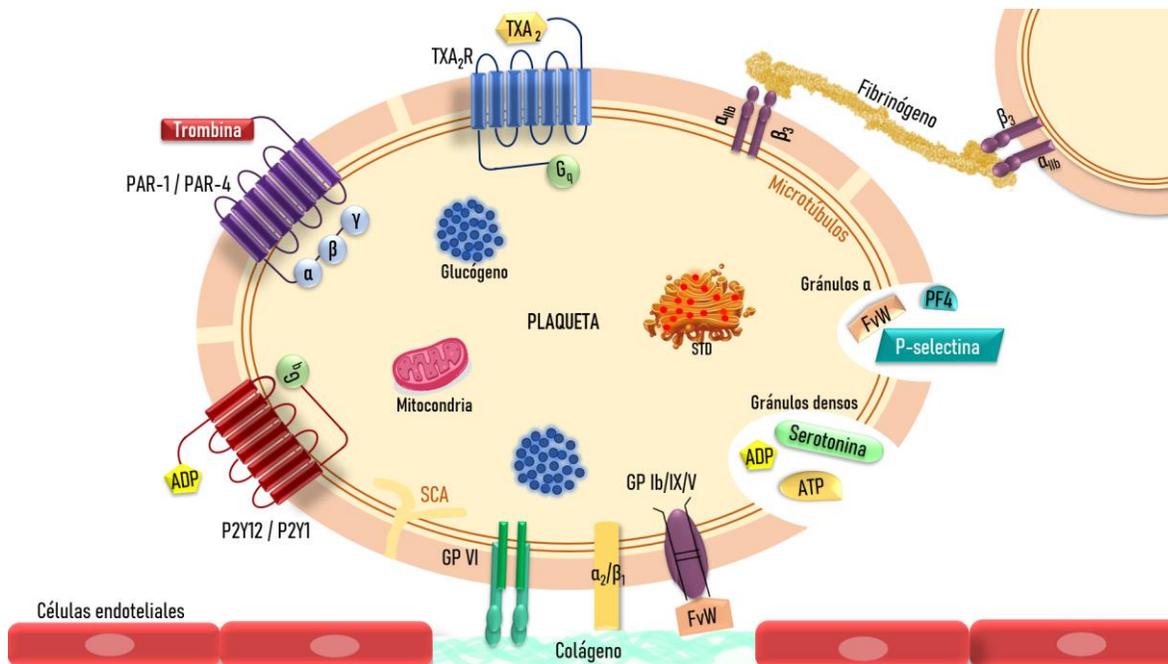


Figura 2. Activación plaquetaria. Ante la discontinuidad del endotelio se expone colágeno el cual interactúa con los diferentes receptores plaquetarios, permitiendo la adhesión a la pared de vasos sanguíneos, activación y agregación entre sí. Se muestran los ligandos para varios receptores como receptor de tromboxano A₂ (TXA₂R), receptor 1 y 4 activado por proteasa (PAR1 y PAR4), receptor de ADP, P2Y₁₂, P2Y₁ y receptor de fibrinógeno (integrina α_{IIb}β₃). Secreción del contenido de los gránulos α y densos. SCA: sistema canalicular abierto, STD: Sistema tubular denso. Fuente: Elaboración propia Flores, A. Muñoz, K. (2022).

3.2.2 Marcadores de activación plaquetaria

Las plaquetas poseen un rol importante en varias enfermedades debido a que, se activan en varias condiciones clínicas participando en la formación de trombos, por lo tanto, se han realizado intensas investigaciones durante las últimas décadas con el objetivo de identificar biomarcadores de activación y posibles dianas terapéuticas para varias enfermedades (51).

Cuando plaquetas se activan expresan moléculas y/o proteínas que en estado de reposo no están presentes, estas sirven como marcadores de activación plaquetaria que al detectarse y cuantificarse son herramientas útiles para evaluar: el estado de activación de las plaquetas circulantes (activación *in vivo*), la reactividad alterada, el seguimiento del curso de enfermedades, la respuesta a tratamiento y los factores de riesgo de trombosis en varios entornos clínicos, proporcionando factores de riesgo predictivos en las disfunciones hemostáticas y sus terapias (51, 52).

3.2.2.1 P-selectina (CD62P)

Es una proteína de adhesión que se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales y al interior de los gránulos α de las plaquetas (53), que al activarse expresan esta molécula en su superficie celular, donde se pueden encontrar alrededor de 10.000 de ellas (54). Una vez expresada promueve las interacciones plaquetas-plaquetas o plaquetas-leucocitos a través de su ligando, P-selectina glicoproteína ligando-1 (PSGL-1) el cual posee un rol esencial en estas interacciones mencionadas, ya que conduce a la formación de agregados plaquetarios grandes y estables contribuyendo en la patogénesis de ECV (55, 56). Debido que la expresión de la P-selectina es irreversible tras la estimulación, la cuantificación de esta es el marcador estándar de oro para detectar la activación plaquetaria. (52, 57).

La detección de CD62P puede realizarse a través de diferentes técnicas (52), pero la citometría de flujo parece ser la herramienta más confiable para monitorear la función plaquetaria en estímulos agudos pero no crónicos de plaquetas (57).

3.2.2.2 Receptor IIb/IIIa

La integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) es el receptor heterodimérico plaquetario más abundante con aproximadamente 50.000–80.000 unidades en la superficie de cada plaqueta (40, 58). Cuando las plaquetas están en reposo, esta integrina adopta una conformación inactiva. Tras la estimulación con un agonista, la transducción de señales de adentro hacia afuera lleva a esta integrina a experimentar un cambio conformacional pasando de un estado de baja a alta afinidad por el fibrinógeno y otros ligandos, lo que permite amplificar el fenómeno de agregación plaquetaria, permitiendo la interacción y llegada de otras plaquetas favoreciendo la formación del trombo (59, 60).

La integrina activada $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ se pueden medir mediante citometría de flujo ya que con la activación plaquetaria, la conformación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ cambia, y un anticuerpo monoclonal específico, PAC-1, solo se une a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ cuando está en esta conformación activada (61, 62).

3.2.2.3 CD40L (CD154)

Es una proteína transmembrana también conocida como CD154 perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (63). Tras la activación plaquetaria inducida por diversos agonistas, desde los gránulos α se exportan moléculas hacia la membrana como el ligando CD40 (CD40L), que posteriormente se corta y se libera hacia la circulación en su forma activa como molécula soluble (sCD40L) donde parte de este último es reabsorbido por las mismas plaquetas uniéndose a la proteína de membrana CD40. La activación plaquetaria se produce mediante la interacción sCD40/CD40 y sCD40/ α IIB β 3, que desencadenan diferentes vías de señalización las cuales convergen en la reorganización del citoesqueleto plaquetario lo que produce la desgranulación, generando un bucle de autoamplificación que favorece la formación de trombos (57, 64).

A su vez el CD40L plaquetario puede interactuar con el CD40 que está presente en los leucocitos (preferiblemente monocitos) y formar agregados de plaquetas-leucocitos (PLA). En humanos con aterosclerosis profunda, se ha encontrado elevadas cantidades de PLA en la sangre (65).

La determinación de CD40L en la superficie plaquetaria se ha realizado en varios estudios mediante citometría de flujo a través de utilización anticuerpos específicos medido a por intensidad de fluorescencia media (66-68)

3.3 Tratamientos antiagregantes plaquetarios

La terapia antiplaquetaria consiste en un conjunto de medicamentos que actúan a nivel de la hemostasia primaria donde radica su principal importancia, ya que evitan que las plaquetas se activen, agreguen y formen trombos al interior de venas y arterias, en situaciones de riesgo de episodios obstructivos coronarios, cerebrales, cirugía vascular y TVP (69).

Por años se conoce el efecto beneficioso del ácido acetilsalicílico (AAS), que es el antiagregante más empleado en las enfermedades vasculares arteriales, por lo que, los buenos resultados que se han obtenidos hacen que este en conjunto con el clopidogrel sean los antiagregantes de referencia utilizado en la clínica (70). Sin embargo, estos fármacos como los que se muestran en la tabla 1, no están exentos de complicaciones y no resultan ser tan efectivos en toda la población, por lo que se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas que potencialmente permitan una acción antitrombótica eficaz, es por esto que, en los últimos años han surgido una gran variedad de antiplaquetarios y anticoagulantes, los cuales actúan en las diferentes etapas de la coagulación sanguínea (71, 72). Por ello, es de suma importancia realizar vigilancia y control del efecto de estos antiagregantes en los pacientes con riesgo trombótico de manera periódica para lograr tener un equilibrio entre el riesgo de sangrado y el riesgo trombótico a través del ajuste de la intensidad del tratamiento antiplaquetario (número y potencia de los agentes antiagregantes), así como la duración del tratamiento (73, 74).

Tabla 1: Propiedades de fármacos antiplaquetarios

Fármaco	Clase	Mecanismo	Vía de administración
Aspirina	Salicilato	Inhibidor de la enzima ciclooxigenasa	Oral
Clopidogrel	Tienopiridina	Bloqueador del receptor P2Y ₁₂	Oral
Prasugrel	Tienopiridina	Bloqueador del receptor P2Y ₁₂	Oral
Cangrelor	Análogo de ADP	Bloqueador del receptor P2Y ₁₂	Intravenosa

Fuente: Tomado y adaptado de Hall y Mazer (2011) (75) .

3.3.1 Ácido acetilsalicílico (AAS)

El AAS actúa como un agente antiplaquetario que bloquea acetilando irreversiblemente la enzima ciclooxigenasa-1 (COX-1) dentro de las plaquetas. Esta enzima es necesaria para generar TXA₂, un potente activador de plaquetas a partir del ácido araquidónico (76). En células nucleadas la COX-1 se puede regenerar, en cambio en células anucleadas como las plaquetas, la COX-1 no lo puede hacer y se inhibe permanentemente lo que conduce a un efecto antitrombótico prolongado que dura entre 7-10 días, tiempo en que la población plaquetaria es renovada (77).

Su efecto antitrombótico máximo se logra con una dosis diaria de 75 a 100 mg sin mayores beneficios al aumentar la dosis, sin embargo, el aumento de dosis incrementa el riesgo de padecer hemorragias especialmente de tipo gastrointestinales (70).

3.3.2 Clopidogrel

El clopidogrel es un profármaco de tienopiridina inactivo, se hidroliza *in vivo* en un 85% mediante esterasas a un derivado inactivo, el fármaco restante sufre biotransformación oxidativa a nivel hepático por parte de las enzimas del citocromo (CYP) P450 quienes lo convierten en su metabolito activo, el cual se une de manera covalente al residuo cisteína de uno de los receptores del ADP (P2Y₁₂), lo que conduce a una modificación irreversible del receptor durante toda la vida de la plaqueta, inhibiendo que el ADP se una a sus receptores plaquetarios, por ende impide la activación y agregación de esta célula (78-80).

3.3.3 Abciximab

Es un anticuerpo monoclonal quimérico con una alta afinidad de unión al receptor GP IIb/IIIa expresado en la superficie de las plaquetas activadas (81), generando un bloqueo irreversible aproximadamente del 80% de estos receptores lo que impedirá la unión con sus ligandos como el fibrinógeno y FvW logrando la inhibición de la agregación plaquetaria evitando la formación de trombos (82), por esta razón es utilizado en la prevención de complicaciones trombóticas secundarias a una intervención coronaria percutánea (ICP) (83).

3.4 Consumo frutas y hortalizas como estrategias de ECV

Existe evidencia de que una dieta equilibrada posee un rol importante sobre principales factores de riesgo de ECV como la obesidad, HTA, DMT2 e hipercolesterolemia (84), ya que tanto las frutas, verduras y legumbres pueden retrasar y ayudar a controlar eventos protrombóticos, es por ello que las guías actuales recomiendan un consumo de 400 g al día o al menos cinco porciones de frutas y verduras (85).

Se ha descrito que este tipo de alimentación posee múltiples beneficios como efectos cardioprotectores dado por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorios, antiplaquetarios, disminución de la presión arterial, modificación del metabolismo de los lípidos, regulación de la glucosa en sangre, mejora de la función endotelial, atenúan el daño miocárdico, modulan las actividades enzimáticas relacionadas, expresiones génicas y vías de señalización, así como algunos otros biomarcadores asociados con el riesgo de ECV (86).

Estudios recientes han evidenciado que el consumo de legumbres posee una asociación inversa con el riesgo de ECV, ya que contienen una reducida cantidad de grasas y abundante cantidad de fibras, proteínas vegetales, diversos compuestos bioactivos que le otorgan un rol protector ya que contribuye en la reducción de la mortalidad total (87, 88).

3.5 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos conocidos también como fitoquímicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos como frutas, hortalizas, legumbres, nueces, aceites, cereales integrales, otorgándoles caracteres distintivos como color, aroma y sabor (89). Estos compuestos se pueden clasificar en amplias categorías como fenoles, alcaloides, compuestos que contienen nitrógeno, compuestos organosulfurados, fitoesteroles y carotenoides. De estos grupos, los compuestos fenólicos son los más estudiados encontrándose aproximadamente 8.000 tipos (90-92).

3.5.1 Compuestos fenólicos (CF)

Las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios, a diferencia de los primarios que están directamente relacionados con las funciones vitales de las plantas (93), los metabolitos secundarios como los CF desempeñan un papel importante en la reproducción, crecimiento y metabolismo de estas, ya que actúan como mecanismo de defensa contra la radiación ultravioleta y contrarrestan infecciones patológicas, por virus, hongos, parásitos y depredadores (94).

Para comprender la estructura química de los CF es importante comenzar con el fenol, que es la molécula básica. Los fenoles son un grupo de compuestos que poseen uno o más anillos aromáticos (fenil), con al menos un grupo hidroxilo (OH) en su estructura y podrían

contener un grupo adicional distintivo como ésteres, ésteres metílicos y glucósidos (95). Estos compuestos son un grupo heterogéneo de productos donde las clases más importantes que se encuentran en la dieta humana son los ácidos fenólicos, las cumarinas y flavonoides (96), estos últimos predominan en diferentes frutas y hortalizas presentes en la naturaleza, como cebollas, col rizada, lechuga, tomates, manzanas, uvas, las bayas (97, 98).

3.6 El poroto

El poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano directo, principalmente como semillas secas (frijoles secos), vainas verdes (habichuelas) y semillas verdes sin cáscaras (99), representando el 50% del rango de leguminosas consumido en el mundo ya que posee una considerable fuente de proteínas, fibra dietética y compuestos bioactivos (100, 101). Este cultivo se produce en diversos sistemas, regiones y ambientes donde los tres principales productores mundiales son India, Myanmar y Brasil, que en conjunto dan cuenta de más de 45% de la producción total, seguidos por China, Estados Unidos y México, en cuanto a Chile se ubica en la posición 60, con una participación de 0,1% (102).

En Chile, según el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), la producción de esta leguminosa (llamada localmente poroto) se concentra geográficamente en las regiones del Maule, Ñuble y Biobío alcanzando más del 89,1% de la superficie cultivada (103). Además, en base a las estadísticas productivas de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) se obtuvo un pico de producción durante 1981-1982 de 162.461 toneladas, pero en los últimos años a nivel nacional hubo una disminución abrupta, llegando a una producción de 9.177 toneladas entre 2019-2020 (104).

3.6.1 Composición del poroto

Los porotos presentan una compleja composición química como muestra la figura 3, en el cual un 60-70% son carbohidratos principalmente almidón, seguido de fibra dietética la cual se encuentra dos a tres veces más por cada 100g de porción comestible que otros alimentos básicos. También está compuesto en un 15-30% de proteínas, dentro de las mayoritarias están las globulinas (54-79%) y albúminas (12-30%) y en una menor cantidad glutelinas y prolaminas, en cuanto lípidos estos se encuentran en un 0,7 a 2% y se componen de triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres (AGL), esteroides y ésteres de esterilo. También es reconocido como una buena fuente de vitaminas B como tiamina, riboflavina, niacina, vitamina y ácido fólico (105-108).

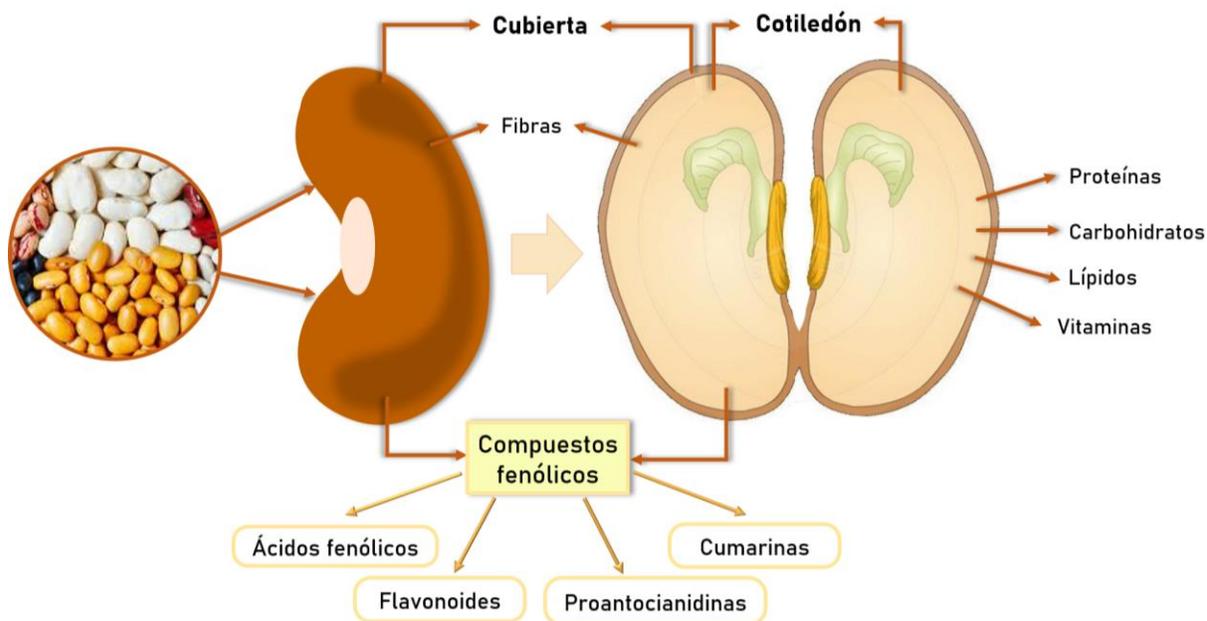


Figura 3: Compuestos químicos del frijol. *Phaseolus vulgaris L.* en su exterior presenta una cubierta que rodea al cotiledón, el cual está conformado por proteínas, carbohidratos, lípidos, fibras y vitaminas. Los distintos compuestos fenólicos están presentes tanto en el exterior como interior de esta leguminosa. Tomado y adaptado de Gomes F. (2018) (106).

3.6.2 Compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris* L.

Los porotos son reconocidos por su alto contenido de nutrientes, proteínas, sin embargo, estos tienen diversos compuestos bioactivos tales como saponinas, polisacáridos, lectinas, ácido fítico, pero principalmente compuestos fenólicos que en las últimas décadas han sido estudiados en múltiples investigaciones, donde se han identificado ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas y cumarinas que se distribuyen de manera diferencial (109, 110) (figura 3) en sus dos partes estructurales principales: el cotiledón el cual posee altos niveles de ácidos fenólicos, como el ácido hidroxibenzoico y el ácido hidroxicinámico, en cambio, la cubierta (testa) de la semilla contiene elevadas concentraciones de flavonoides tales como flavonas, monómeros y oligómeros de flavonoides, flavanonas, isoflavonoides, antocianinas, calconas y dihidrocalconas que influyen en su sabor y color (111, 112).

Estos compuestos tienen distintas actividades biológicas sobre la salud humana, ya que otorgan un valor único como protector de endotelio, inflamación, aterosclerosis, síndrome metabólico, obesidad de igual manera poseen propiedades antioxidantes, antidiabéticas y anticancerígenas (113-116). Particularmente se ha demostrado que los compuestos fenólicos tienen efecto sobre la función plaquetaria humana *in vitro* e *in vivo* (Tabla 2) (114).

CB	Clasif	Mecanismo	Ref
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	Inhibición de la agregación plaquetaria inducida con colágeno (2 µg/ml), AA (2 mM), trombina (0,5 U/ml), ADP (10 µM) o U46619 (2 µM). Mecanismo: Inhibición de la fosforilación de p38 y ERK2 y activación de PKA y PKG a través de la inhibición de PDE , lo que conduce a la inhibición del calcio intracelular y finalmente a la inhibición de la agregación plaquetaria.	(117, 118)
Ácido Gálico	Ácido fenólico	Inhibición de la agregación de plaquetas estimulada por ADP (2,5 µM) o U46619 (1,5 µM). Mecanismo: Disminución en la fosforilación de PKCα/p38 MAPK y Akt/GSK3 β, lleva a inhibir la agregación plaquetaria, activación y agregación plaquetas-leucocitos y reducir la movilización de Ca ²⁺ .	(119, 120)
Kaempferol	Flavonol	Inhibe la activación plaquetaria inducida por trombina (40mU) y FXa 20(mU). Inhibe la activación plaquetaria inducida por colágeno/epinefrina. Mecanismo: Inhibición de la activación de ERK, p38, JNK y AKT. Inhibe la agregación plaquetaria in vitro inducida por AA 100µM y colágeno 10µg/mL a 100µg/mL.	(121) (122)
Quercetina	Flavonol	Inhibe la activación plaquetaria estimulada por colágeno (5 µg/mL) a IC ₅₀ 8,69 ± 1,05 Mecanismo: Inhibe tanto la fosforilación de tirosina cadena γ de FcR como la inhibición directa actividad quinasa de SyK y de la misma manera para Fyn y Lyn dependiente de concentración	(123)
Rutina	Flavonol	Inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno (1µg/mL), trombina (0,1 U/ml) y AA (60µM) a 250 y 290 µM. Mecanismo: inhibición de la fosforilación de P47 y la movilización Ca ²⁺ intracelular.	(124)

Tabla 2: Mecanismos antiplaquetarios de compuestos bioactivos del poroto. **CB:** compuesto bioactivo. **Clasif:** Clasificación, **Ref:** Referencia. **AA:**Ácido araquidónico. **ADP:** Adenosín difosfato. **U46619:** Análogo de TxA₂. **ERK:** Quinasas reguladoras de señales extracelulares. **PKA:** proteína quinasa A. **PKG:**Proteína quinasa G. **PDE:** Fosfodiesterasa, **MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos. **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico. **AKT:** Proteína quinasa B. **IC₅₀:** Concentración inhibitoria media máxima. **FcR:** Receptor Fc

4. HIPÓTESIS

Compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris L.* inhiben la función plaquetaria disminuyendo el porcentaje de agregación y la expresión del marcador de activación P-selectina plaquetaria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto antiplaquetario de compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris* L.: Rutina, Kaempferol-3-O-glucósido y Ácido cafeoil málico sobre la agregación y activación plaquetaria.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris* L. sobre la agregación y activación plaquetaria.
2. Evaluar la sinergia de compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris* L. sobre la agregación y activación plaquetaria.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Los compuestos bioactivos puros de Rutina, Kaempferol-3-O-glucósido y Ácido Cafeoil málico fueron entregados por el Centro de Estudios en Alimentos Procesados (CEAP), Universidad de Talca.

Los siguientes reactivos: ADP, TRAP-6, colágeno, dimetilsulfóxido (DMSO), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri/MO, EE. UU.). Los anticuerpos anti-CD62P-PE, anti-CD61-FITC se compraron de la empresa BD Pharmingen (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.) y los tubos al vacío de citrato de sodio se adquirieron de Genética y Tecnología spa (GENYTEC).

6.2 Toma de muestra de sangre

La obtención de plaquetas fue mediante flebotomía de donantes humanos voluntarios quienes cumplieron los siguientes prerequisites: sin consumo de AINES durante la última semana, sin consumo de alcohol o drogas durante las últimas 48 horas, sin antecedentes de enfermedades crónicas, haber dormido al menos 6 horas la noche anterior, quienes además firmaron el consentimiento informado, según el protocolo aprobado por el Comité de Ética Científica (CEC) de la Universidad de Talca (Protocolo No. 19/2018). La sangre venosa

obtuvo mediante flebotomía utilizando sistema vacutainer, utilizando una aguja mariposa de calibre 21 G, que fue depositada en tubos de citrato al 3.2% cuya proporción sangre:anticoagulante fue de 9:1 v/v (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) posteriormente las muestras se homogenizaron y se almacenaron en hielo y se utilizaron dentro de 3 horas (125).

La información fue manejada por las tesis y tutores para garantizar la confidencialidad en el procesamiento de las muestras. A la sangre tomada no se le realizó ningún experimento adicional que no estuviese relacionado con la funcionalidad plaquetaria. Las muestras fueron eliminadas una vez concluido el estudio según lo dispuesto en la resolución del citado CEC.

6.3 Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)

Las muestras de sangre se centrifugaron sin freno ni acelerador durante 12 minutos a 1.200 revoluciones por minuto (r.p.m) obteniendo plasma rico en plaquetas (PRP), este fue reservado en un tubo falcon de 15 ml. Se centrifugaron nuevamente tubos de citrato durante 10 minutos a 3.000 r.p.m para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP), posteriormente se ajustó la concentración de plaquetas añadiendo PPP al PRP, hasta obtener 250.000-300.000 plaquetas/uL aproximadamente, mediante un Contador Hematológico (Bayer Advia 60 Hematology System, Tarrytown, NY, EE.UU.).

6.4 Estudio *in vitro* de la agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se evaluó mediante agregometría de transmisión de luz según Born y Cross (126), utilizando un lumi-agregómetro (AggRAM, Helena Laboratories, Australia). La agregación plaquetaria se evaluó mediante agregometría de transmisión de luz según Born y Cross (126), utilizando un lumi-agregómetro (AggRAM, Helena Laboratories, Australia). Para realizar la agregación plaquetaria se utilizaron las plaquetas obtenidas en el procedimiento 6.3 en presencia de los compuestos bioactivos: Rutina, Kaempferol-3-glucósido y ácido cafeoil málico a diferentes concentraciones: 1 mg/ml, 0,75 mg/ml y 0,5 mg/ml, luego fueron estimuladas con los agonistas ADP (4 μ M), TRAP-6 (5 μ M) y Colágeno (1 μ g/ml). La mezcla estaba compuesta por tres compuestos bioactivos, como control se utilizó DMSO y como blanco PPP.

1. **Control ADP:** 240 μ l PRP + 2,5 μ l DMSO + 5,4 μ l ADP.
2. **Control TRAP:** 240 μ l PRP + 2,5 μ l DMSO + 3,4 μ l TRAP-6
3. **Control Colágeno:** 240 μ l PRP + 2,5 μ l DMSO + 5 μ l Colágeno
4. **Agregado:** 240 μ l PRP + Compuesto bioactivo + ADP; TRAP-6; Colágeno.
5. **Mezcla:** 240 μ l PRP + 3,8 μ l Mezcla + ADP; TRAP-6; Colágeno.

Para el desarrollo del ensayo, inicialmente a los controles se adicionaron 240 μ l de las suspensiones plaquetarias a su respectivo tubo khan luego se añadió 2,5 μ l de DMSO, que se preincubaron durante 4 min a 37°C, para luego iniciar la reacción con los agonistas ADP, TRAP-6 y colágeno. Posteriormente tanto el agregado como la mezcla se evaluaron las mismas condiciones a excepción que en el agregado se estudiaron los tres compuestos bioactivos a distintas concentraciones: 1 mg/ml (3,8 μ l); 0,75 mg/ml (2,9 μ l) y 0,5 mg/ml (1,9 μ l); complementariamente en el caso de Rutina se estudiaron a concentraciones 0,25

mg/ml (1 µl) y 0,1 mg/ml (0,4 µl). En el caso de la mezcla de los tres compuestos bioactivos se estudió a una concentración de 1 mg/ml (3,8 µl), finalmente se incubaron por 4 min a 37°C.

6.5 Cálculo de inhibición de la agregación plaquetaria

La inhibición de la agregación plaquetaria producida por los diferentes compuestos bioactivos en los ensayos realizados fue calculado a través:

$$100 - \frac{(\% \text{ Agregación plaquetaria compuestos} \times 100)}{\% \text{ agregación plaquetaria control}}$$

6.6 Estudio de activación plaquetaria y expresión P-Selectina mediante citometría flujo

Se utilizaron las plaquetas obtenidas en el procedimiento 6.3 para estimular la activación plaquetaria en presencia de compuestos bioactivos. Inicialmente las plaquetas en estado basal se utilizaron como control, por lo que se estudiaron las siguientes condiciones:

- 1) **Basal:** 120 µL suspensión plaquetaria + 1,9 µL de DMSO
- 2) **Activado:** 120 µl suspensión plaquetaria + 1,9 µL DMSO + Agonista deseado (ADP).
- 3) **Compuesto bioactivo:** 120 µL suspensión plaquetaria + 1,9 µL compuesto en la concentración deseada + Agonista deseado (ADP).
- 4) **Mezcla:** 120 µL suspensión plaquetaria + 1,9 µL mezcla de compuestos + Agonista deseado (ADP).

Para el desarrollo del ensayo, inicialmente se adicionaron las suspensiones plaquetarias su respectivo tubo eppendorf, luego se añadió 1,9 μ L de DMSO en las condiciones 1 y 2, 1,9 μ L del compuesto bioactivo en estudio en la condición 3, posteriormente estas se preincubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se inició la reacción de activación plaquetaria en las condiciones 2, 3 y 4 adicionando el respectivo agonista 2,6 μ L ADP (4 μ M). Finalmente se procedió a incubar todas las condiciones durante 5 minutos a 37°C.

Para determinar la presencia de P-selectina se utilizaron anticuerpos específicos en concentraciones saturantes marcados con fluorocromos como Ficoeritrina (PE) o FITC (isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato). Para el marcaje de la suspensión plaquetaria se trabajó en ambiente de oscuridad relativa, donde se mezclaron una alícuota de 30 μ L de cada condición con 2 μ L de anti-CD62P-PE y de anti-CD61-PE, posteriormente se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, para luego diluir el tubo marcado con 300 μ L de PBS filtrado. Las muestras fueron analizadas por el citómetro de flujo BD FACSLytic™ (BD Life Sciences, San José, CA, EE.UU).

Las poblaciones de plaquetas se seleccionaron según el tamaño de las células utilizando la dispersión directa (FSC) frente a la dispersión lateral (SSC) y la positividad de CD61 para distinguir alteraciones como ruido electrónico o posible contaminación. Se analizaron 10.000 eventos por condiciones. Las intensidades de fluorescencia de las poblaciones teñidas diferencialmente se expresaron como valor medio del canal utilizando el software BD FACSLytic (BD Life Sciences, San José, CA, EE.UU).

6.7 Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron a partir de voluntarios independientes (cada donante ejecutado como triplicado único). Los resultados fueron analizados utilizando *GraphPad Prism* Software versión 8 (San Diego, CA, EE. UU.) y se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar (DE). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria. IC₅₀ se calculó a partir de curvas de respuesta a diferentes concentraciones.

Las diferencias entre tres o más condiciones se analizaron mediante ANOVA no paramétrico utilizando la prueba post-hoc de prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre las muestras. Se graficó y analizó datos considerando estadísticamente significativos con los valores de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

1. Efecto de los compuestos fenólicos sobre la agregación plaquetaria

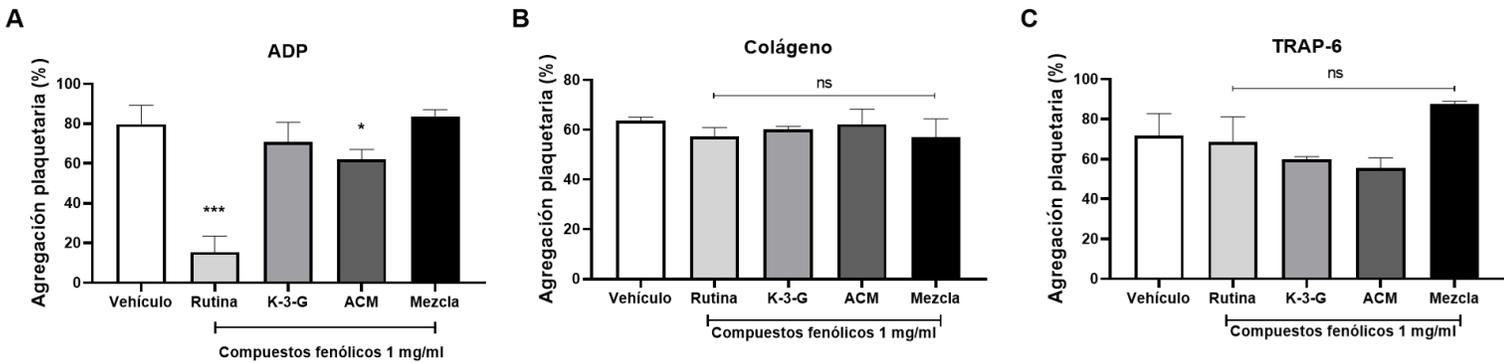


Figura 4: Estudio de agregación plaquetaria en presencia de compuestos fenólicos.

Porcentaje de agregación plaquetaria inducida por (A) ADP (4 μM), (B) Colágeno (1 μg/ml) y (C) TRAP-6 (5 μM). El PRP se preincubó durante 5 minutos con compuestos fenólicos y luego se estimuló con el agonista indicado. Los resultados se expresaron como media ± SEM, n = 3. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (prueba de Tukey). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 frente al vehículo DMSO 0,4% (control). **K-3-G:** Kaempferol 3-O-glucósido; **ACM:** Ácido Cafeoil málico

2. Efecto de Rutina sobre la agregación plaquetaria

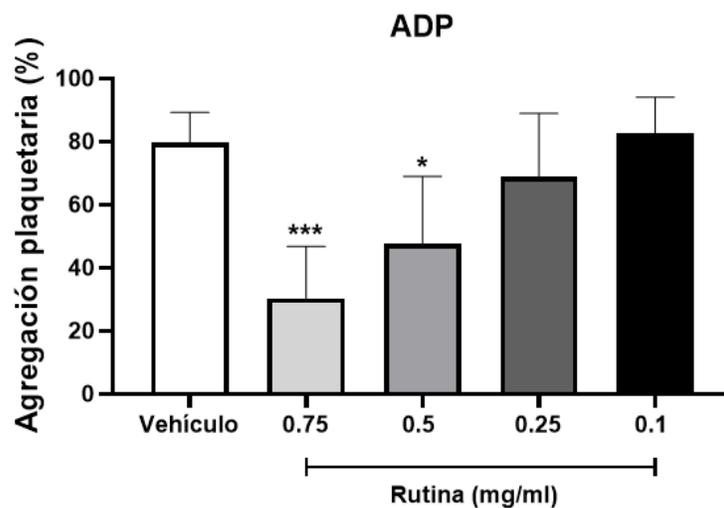


Figura 5: Estudio de agregación plaquetaria en presencia de Rutina a diferentes concentraciones. Porcentaje de agregación plaquetaria inducida por ADP en presencia de Rutina. Los resultados se expresaron como media \pm SEM, n = 6. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (prueba de Tukey). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ frente al vehículo DMSO 0,4% (control).

3. Efecto de Rutina sobre la inhibición plaquetaria por rutina

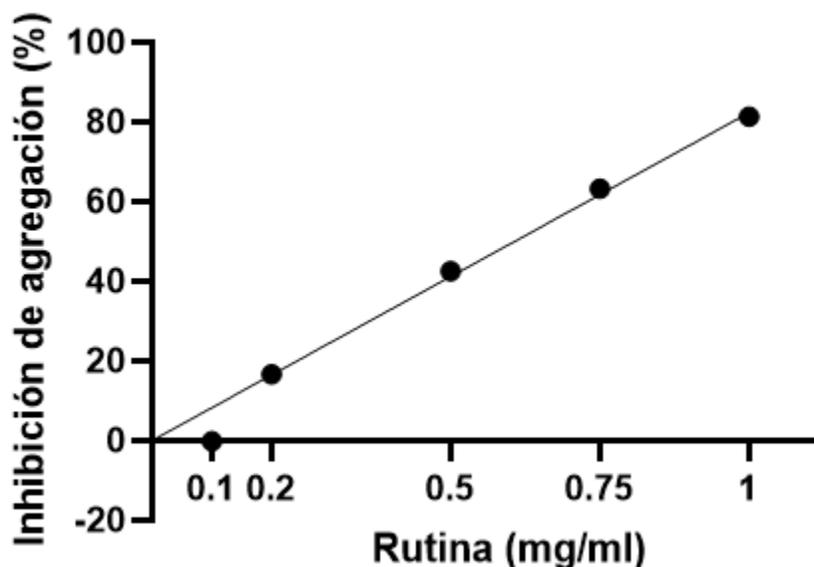


Figura 6: Efecto dosis sobre la inhibición de agregación de Rutina en presencia de ADP. Porcentaje de inhibición plaquetaria por rutina a distintas concentraciones.

4. IC₅₀ de compuestos fenólicos del *Phaseolus vulgaris* L.

Compuestos fenólicos	ADP 4 μM Valor IC ₅₀	Colágeno 1 μg/mL Valor IC ₅₀	TRAP-6 10 μM Valor IC ₅₀
Rutina	0,54 ± 0,21 mg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
Kaempferol 3-O-glucósido	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL	> 1 mg/mL
Ácido cafeoil malico	> 1 mg/ml	> 1 mg/ml	> 1 mg/ml

Tabla 3: Concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de compuestos fenólicos sobre la agregación plaquetaria estimulada por ADP, Colágeno y TRAP-6.

5. Efecto de los compuestos fenólicos en la expresión de P-selectina

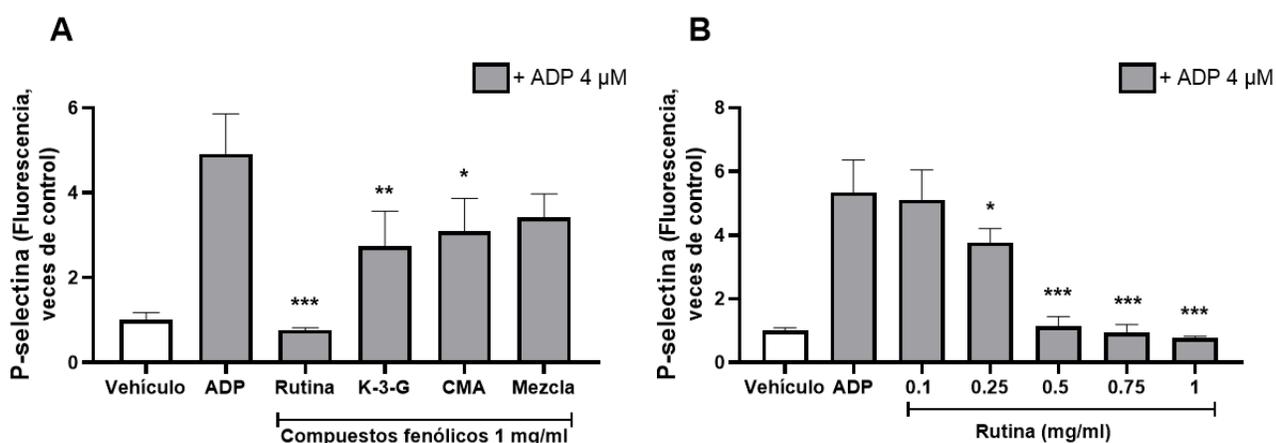


Figura 7: Estudio de expresión de P-selectina estimulada con ADP. (A) Compuestos fenólicos bioactivos (B) Rutina a diferentes concentraciones. Los resultados se expresaron como media \pm SEM, n = 3. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (prueba de Tukey). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ frente al vehículo DMSO 0,4% (control). ADP se utilizó como control positivo.

8. DISCUSIÓN

En Chile en el año 2020 las ECV fueron la principal causa de muerte, por lo que son consideradas un gran problema de salud pública (10). Su desarrollo se ve favorecido por diversos factores de riesgo los cuales deben ser controlados y complementados con una dieta equilibrada que incluya un consumo de frutas y hortalizas (6), ya que se ha evidenciado que estas reducen el riesgo de padecer ECV, dado que además de aportar macro y microcomponentes contienen sustancias bioactivas las cuales son beneficiosas para la salud humana (127).

Phaseolus vulgaris L. conocido como poroto es una leguminosa alimenticia con gran valor nutritivo, pero a su vez se ha demostrado que existe una correlación positiva entre su consumo y la prevención de eventos cardiovasculares (128), dado que en su composición presenta numerosos compuestos bioactivos, principalmente compuestos fenólicos (129). En esta leguminosa se encuentran predominantemente Quercetina, Rutina (quercetina 3-O-rutinósido) y el K-3-G, que pertenecen a una subcategoría de flavonoides denominados flavonoles, que presentan una potencial actividad antioxidante, antiinflamatoria (98, 130) y particularmente actividad antiplaquetaria (131, 132).

Con el objetivo de determinar el efecto de determinados compuestos fenólicos se evidenció que Rutina, ACM, K-3-G y la mezcla de estos no presentó efecto sobre la agregación plaquetaria al ser estimulada por los agonistas colágeno y TRAP-6 (Figura 4 B, C) difiriendo con investigaciones anteriores en las cuales si han demostrado efecto antiplaquetario, esto se puede deber a que los compuestos utilizados provenían directamente de la matriz natural del poroto, sin embargo, en los diferentes estudios se emplearon

compuestos comerciales con un mayor grado de pureza (124, 131, 133, 134), por lo que su efecto antiplaquetario no fue interferido.

Por otro lado, en nuestra investigación Rutina y ACM en presencia de ADP lograron inhibir significativamente la agregación plaquetaria (Figura 4.A), concordando con reportes anteriores, donde demuestran que el efecto antiplaquetario de Rutina es través del bloqueo reversible del receptor plaquetario GPIIb/IIIa (135) además de la inhibición de la COX-1 (Ciclooxigenasa 1) (136).

Ante los resultados obtenidos en los ensayos de agregometría se evaluó el efecto antiplaquetario de Rutina a diferentes concentraciones desde 1 a 0,1 mg/ml, en este estudio a las concentraciones más altas ensayadas logró disminuir significativamente la agregación plaquetaria (Figura 5), presentando una correlación positiva con el porcentaje de inhibición (Figura 6) por lo que, Rutina en nuestros ensayos presentó efecto-dosis al igual que otros investigadores, sin embargo estos evaluaron un mayor número de concentraciones decrecientes las cuales demostraron ser biológicamente relevantes ante agentes protrombóticos (137).

Los resultados de la concentración inhibitoria media máxima de los diferentes compuestos ante diferentes agonistas (Tabla 3), demostraron que solo la Rutina al ser estimulada con ADP tuvo efecto a concentraciones inferiores a 1 mg/ml, obteniendo IC_{50} : $0,54 \pm 0,21$ mg/ml, concentraciones superiores a las reportadas en otros estudios.

Sin embargo, no se observó una relación positiva para ACM y K-3-G cuando la agregación fue estimulada por ADP, colágeno y TRAP-6 (tabla 3), difiriendo con antecedentes de otros investigadores, en los cuales el Kaempferol ante colágeno y ADP obtuvo un IC_{50} de $0,024 \pm 0,01$ mg/ml y $0,06 \pm 0,017$ mg/ml respectivamente, pequeñas concentraciones en la cual en su forma aglicona ha logrado un fuerte efecto dosis inhibiendo la agregación plaquetaria a concentraciones inferiores a las que se evaluaron en esta investigación lo que sugieren que este bioflavonoide tiene el potencial de servir como agente terapéutico para pacientes con enfermedades cardiovasculares (121, 138).

Para complementar los resultados obtenidos se utilizó una técnica más específica como la citometría de flujo, en la cual se evaluó la expresión superficial de P-selectina ya que se considera un marcador sensible de la activación plaquetaria, permitiendo determinar *in vitro* el grado de reactividad de las plaquetas (57, 139). Se evidenció que la Rutina, K-3-G y ACM disminuyeron significativamente la expresión de P-selectina en la superficie plaquetaria estimulada por ADP (Figura 7.A), al igual que en otras investigaciones donde el Kaempferol logra disminuir fuertemente dependiente de la dosis la expresión de P-selectina (130), lo que puede deberse a que gracias a la mayor sensibilidad que posee la citometría de flujo mejora los resultados en comparación a los de agregometría (140). En cuanto a Rutina en todas sus concentraciones ensayadas inhibió la activación plaquetaria disminuyendo significativamente la expresión de P-selectina plaquetaria (Figura 7.B), por lo que su efecto dosis se evidenció con mayor claridad mediante citometría de flujo, al igual que antecedentes de otros flavonoides como la quercetina que tiene una tendencia hacia la disminución de la expresión de selectina P en la superficie de las plaquetas (141).

En esta investigación los resultados obtenidos de las mediciones de citometría de flujo mejoraron nuestros hallazgos previos sobre la inhibición de la agregación plaquetaria, respaldando el concepto de que los compuestos bioactivos del *Phaseolus vulgaris* L. poseen

efecto sobre la función plaquetaria. En cuanto a ACM y la mezcla de estos compuestos no se encontraron antecedentes en la literatura de su efecto o sinergia sobre la agregación plaquetaria, por lo que es necesario que se estudie en investigaciones futuras.

9. CONCLUSIONES

En esta investigación se logró demostrar que rutina posee un efecto antiplaquetario a concentraciones inferiores a 1 mg/ml, obteniendo IC₅₀: 0,54 ± 0,21 mg/ml al ser inducida la agregación con ADP a una concentración 4μM. A su vez demostró efecto dosis ante inhibición de la agregación plaquetaria y la expresión de P-selectina plaquetaria.

No se evidenció sinergia entre los tres compuestos fenólicos evaluados: Rutina, Kaempferol-3-O-glucósido y Ácido cafeoil málico mediante su análisis de agregometría y citometría de flujo.

Se necesitan estudios adicionales respecto al posible efecto de ACM y la mezcla de los compuestos sobre la función plaquetaria.

10. REFERENCIAS

1. Brunier A, Muchnik A. La OMS revela las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo: 2000 - 2019 Organización Mundial de la Salud (OMS)2020 [Available from: <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>].
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades cardiovasculares. [internet]. 2017 [citado 23 mayo de 2021]. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades Cardiovasculares [internet].2021 [cited 2021 23 mayo]. : [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
4. Torrades S, Pérez-Sust P. Enfermedades cardiovasculares. *Offarm*. 2006;25(2):92-5.
5. Favalaro EJ, Franchini M, Lippi G. Aging Hemostasis: Changes to Laboratory Markers of Hemostasis As We Age—A Narrative Review. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(06):621-33.
6. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*. 2004;364(9438):937-52.
7. How Smoking Affects the Heart and Blood Vessels: National Heart, Lung and Blood Institute (NIH); 2022 [Available from: .
8. Piko P, Kosa Z, Sandor J, Adany R. Comparative risk assessment for the development of cardiovascular diseases in the Hungarian general and Roma population. *Scientific reports*. 2021;11(1):3085.
9. Campbell NRC, Paccot Burnens M, Whelton PK, Angell SY, Jaffe MG, Cohn J, et al. Directrices de la Organización Mundial de la Salud del 2021 sobre el tratamiento farmacológico de la hipertensión: implicaciones de política para la Región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2022;46:1.
10. Departamento de Estadística e Información en Salud (DEIS) M.
11. Margozzini P, Passi-Solar A. Encuesta Nacional de Salud, ENS 2016-2017: un aporte a la planificación sanitaria y políticas públicas en Chile. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*. 2018;43(1):30-1.
12. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *European Heart Journal*. 2016;ehw550.
13. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005;19(2):111-23.
14. Ashorobi D, Ameer MA, Fernandez R. Thrombosis. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls; 2021.
15. Chung I, Lip GYH. Virchow's Triad Revisited: Blood Constituents. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003;33(5-6):449-54.
16. Freedman JE, Loscalzo J. Trombosis arterial y venosa. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison Principios de Medicina Interna*, 19e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2019.
17. Mammen EF. Pathogenesis of Venous Thrombosis. *CHEST*. 1992;102(6):640S-4S.

18. Valdés F, Mertens R. Factores predisponentes y manejo de trombosis venosa profunda. *ARS MEDICA* 2018;27(3).
19. López JA, Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thrombosis Research*. 2009;123:S30-S4.
20. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *The Lancet*. 2005;365(9465):1163-74.
21. Tovey C. Diagnosis, investigation, and management of deep vein thrombosis. *BMJ*. 2003;326(7400):1180-4.
22. Turetz M, Sideris AT, Friedman OA, Tripathi N, Horowitz JM. Epidemiology, Pathophysiology, and Natural History of Pulmonary Embolism. *Seminars in interventional radiology*. 2018;35(2):92-8.
23. Tarbox AK, Swaroop M. Pulmonary embolism. *International journal of critical illness and injury science*. 2013;3(1):69-72.
24. Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox biology*. 2017;12:18-34.
25. Florenzano F. Fisiopatología de la placa aterosclerótica. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2000;11(2):1-11.
26. Badimón L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Revista Española de Cardiología*. 2002;55:17-26.
27. Custodio-Chablé SJ, Lezama RA, Reyes-Maldonado E. Platelet activation as a trigger factor for inflammation and atherosclerosis. *Cir Cir*. 2020;88(2):233-43.
28. Horstman LL. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Frontiers in Bioscience*. 2004;9(1-3):1118.
29. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Current Opinion in Lipidology*. 2001;12(4).
30. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):56.
31. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research*. 2007;100(12):1673-85.
32. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Revista Española de Cardiología*. 2009;62(10):1161-78.
33. Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European heart journal Acute cardiovascular care*. 2012;1(1):60-74.
34. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451(7181):914-8.
35. Chernysh IN, Nagaswami C, Kosolapova S, Peshkova AD, Cuker A, Cines DB, et al. The distinctive structure and composition of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-12.
36. Giménez Serrano S. Trombosis. *Clínica y farmacoterapia. Farmacia Profesional*. 2003;17(5):54-65.
37. George JN. Platelets. *The Lancet*. 2000;355(9214):1531-9.
38. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Research International*. 2016;2016:1-5.
39. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:781857.
40. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol*. 2013;13:2-7.

41. Thon JN, Italiano JE. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. In: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, editors. *Antiplatelet Agents*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 3-22.
42. Frelinger A, Michelson A, Gremmel T. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):191-204.
43. Saad J, Asuka E, Schoenberger L. Physiology, Platelet Activation. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
44. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011;25(4):155-67.
45. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thrombosis Research*. 2007;120:S5-S9.
46. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015;114(09):449-58.
47. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(04):381-92.
48. Weyrich AS. Platelets: more than a sack of glue. *Hematology*. 2014;2014(1):400-3.
49. Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas TA, Plow EF, et al. A Structural Mechanism of Integrin α IIb β 3 “Inside-Out” Activation as Regulated by Its Cytoplasmic Face. *Cell*. 2002;110(5):587-97.
50. Fullard FJ. The Role of the Platelet Glycoprotein IIb / IIIa in Thrombosis and Haemostasis. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10(14):1567-76.
51. Gianazza E, Brioschi M, Baetta R, Mallia A, Banfi C, Tremoli E. Platelets in Healthy and Disease States: From Biomarkers Discovery to Drug Targets Identification by Proteomics. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4541.
52. Kannan M, Ahmad F, Saxena R. Platelet activation markers in evaluation of thrombotic risk factors in various clinical settings. *Blood Reviews*. 2019;37:100583.
53. Panés J. Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol*. 1999;22(10):514-24.
54. Blann A. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 2003;24(24):2166-79.
55. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed research international*. 2016;2016:9060143.
56. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(8):1280-6.
57. Nagy B, Jr., Debreceni IB, Kappelmayer J. Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers. *EJIFCC*. 2013;23(4):124-34.
58. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa Receptor Number by Quantification of 7E3 Binding to Human Platelets. *Blood*. 1996;88(3):907-14.
59. Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S, et al. Platelet integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(26):1-22.
60. Reddy KB, Smith DM, Plow EF. Analysis of Fyn function in hemostasis and α IIb β 3-integrin signaling. *Journal of Cell Science*. 2008;121(10):1641-8.

61. Michelson AD. Methods for the Measurement of Platelet Function. *The American Journal of Cardiology*. 2009;103(3, Supplement):20A-6A.
62. Frojmovic M, Wong T. Dynamic measurements of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa receptor for fibrinogen by flow cytometry. II. Platelet size-dependent subpopulations. *Biophysical Journal*. 1991;59(4):828-37.
63. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-Derived CD40L. *Circulation*. 2002;106(8):896-9.
64. Aloui C, Prigent A, Sut C, Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, et al. The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(12):22342-64.
65. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009;102(08):206-14.
66. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):2319-25.
67. Danese S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M, et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut*. 2003;52(10):1435-41.
68. Mobarrez F, Sjövik C, Soop A, Hållström L, Frostell C, Pisetsky DS, et al. CD40L expression in plasma of volunteers following LPS administration: A comparison between assay of CD40L on platelet microvesicles and soluble CD40L. *Platelets*. 2015;26(5):486-90.
69. Gómez Ayala A-E. El paciente en tratamiento con antiagregantes plaquetarios. *Farmacia Profesional*. 2007;21(11):36-42.
70. Carles Reverter J. Antiagregantes plaquetarios. *Medicina Clínica*. 2000;115(6):214-5.
71. Gresele P. Antiplatelet agents in clinical practice and their haemorrhagic risk. *Blood transfusion = Trásfusione del sangue*. 2013;11(3):349-56.
72. Chaves Brenes L. Antiplaquetarios. *Revista Costarricense de Cardiología*. 2012;14:21-5.
73. Llau JV, Ferrandis R, López Forte C. Antiagregantes y anticoagulantes: manejo del paciente quirúrgico anticoagulado. *Cirugía Española*. 2009;85:7-14.
74. Laine M, Frère C, Bonello L. Principales medicamentos antiagregantes: manejo, vigilancia y gestión de las complicaciones. *EMC - Tratado de Medicina*. 2020;24(3):1-7.
75. Hall R, Mazer CD. Antiplatelet Drugs: A Review of Their Pharmacology and Management in the Perioperative Period. *Anesthesia & Analgesia*. 2011;112(2):292-318.
76. Patrono C. Aspirin as an Antiplatelet Drug. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(18):1287-94.
77. Gaziano JM, Greenland P. When Should Aspirin Be Used for Prevention of Cardiovascular Events? *JAMA*. 2014;312(23):2503-4.
78. Bates ER, Lau WC, Angiolillo DJ. Clopidogrel-Drug Interactions. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(11):1251-63.
79. Patti G, Micieli G, Cimminiello C, Bolognese L. The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovascular Therapeutics*. 2020;2020:1-12.
80. Badimon L, Vilahur G. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. *Revista Española de Cardiología* 2013;13:8-15.

81. Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, Gershlick AH. Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by c7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis. *Cardiovascular Research*. 2000;48(3):464-72.
82. Stoffer K, Bistas KG, Reddy V, Shah S. Abciximab. *StatPearls*. 2021;48(3):464-72.
83. Valgimigli M, Campo G, Tebaldi M, Carletti R, Arcozzi C, Ferrari R, et al. Abciximab: a reappraisal of its use in coronary care. *Biologics : targets & therapy*. 2008;2(1):29-39.
84. Alissa EM, Ferns GA. Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017;57(9):1950-62.
85. Alimentación sana. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2018.
86. Tang G-Y, Meng X, Li Y, Zhao C-N, Liu Q, Li H-B. Effects of Vegetables on Cardiovascular Diseases and Related Mechanisms. *Nutrients*. 2017;9(8):857.
87. Vigiuliouk E, Glenn AJ, Nishi SK, Chiavaroli L, Seider M, Khan T, et al. Associations between Dietary Pulses Alone or with Other Legumes and Cardiometabolic Disease Outcomes: An Umbrella Review and Updated Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Advances in Nutrition*. 2019;10(Supplement_4):S308-S19.
88. Guerrero Wyss L, Durán-Agüero S. Consumo de legumbres y su relación con enfermedades crónicas no transmisibles. *Revista chilena de nutrición*. 2020;47(5):865-9.
89. Rashmi HB, Negi PS. Health Benefits of Bioactive Compounds from Vegetables. In: Swamy MK, editor. *Plant-derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 115-66.
90. Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(12):3479S-85S.
91. Khezerlou A, Jafari SM. 13 - Nanoencapsulated bioactive components for active food packaging. In: Jafari SM, editor. *Handbook of Food Nanotechnology*: Academic Press; 2020. p. 493-532.
92. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(14):1818-92.
93. Martín Gordo DA. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2018;9(1):81-104.
94. Abarca-Vargas R, Petricevich V. Importancia biológica de los compuestos fenólicos. *Inventio*. 2019;14.
95. Sharifi-Rad J, Quispe C, Zam W, Kumar M, Cardoso SM, Pereira OR, et al. Phenolic Bioactives as Antiplatelet Aggregation Factors: The Pivotal Ingredients in Maintaining Cardiovascular Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:2195902.
96. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41(5):1523-42.
97. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5.
98. Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*. 2012;31(3):176-89.

99. Lin L-Z, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 2008;107(1):399-410.
100. Martirena-Ramírez A, Veitía N, García LR, Collado R, Torres D, Rivero Quintana L, et al. Caracterización morfológica de líneas de *Phaseolus vulgaris* L. en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*. 2017;17(3):191-201.
101. Granito M, Guinand J, Pérez D, Suhey P. Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus Vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia*. 2009;34:64-70.
102. Banfi S. Cultivo de porotos en perspectiva. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) [Internet]. 2014 [cited 2021 16 de Julio].
103. Tay K. ZORZAL INIA: Características de la variedad de poroto para grano seco más demanda en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) [Internet]. 2020 [cited 2021 16 de julio].
104. ODEPA. Información de superficie sembrada, producción y rendimientos anuales. Ministerio de Agricultura [Internet]. 2021 [cited 2021 16 de julio].
105. Martino HSD, Bigonha SM, Cardoso LdM, Rosa CdOB, Costa NMB, Cárdenas LdLÁR, et al. Nutritional and Bioactive Compounds of Bean: Benefits to Human Health. *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*. ACS Symposium Series. 1109: American Chemical Society; 2012. p. 233-58.
106. Gomes F, Ferreira A, Wojeicchowski J, Nogueira A, Demiate IM. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*. 2018;19:63-71.
107. Chen Y, McGee R, Vandemark G, Brick M, Thompson H. Dietary Fiber Analysis of Four Pulses Using AOAC 2011.25: Implications for Human Health. *Nutrients*. 2016;8(12):829.
108. Hall C, Hillen C, Garden Robinson J. Composition, Nutritional Value, and Health Benefits of Pulses. *Cereal Chemistry*. 2017;94(1):11-31.
109. Yang Q-Q, Gan R-Y, Ge Y-Y, Zhang D, Corke H. Polyphenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Chemistry, Analysis, and Factors Affecting Composition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(6):1518-39.
110. Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Phytochemical Characterisation of Green Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by Using High-performance Liquid Chromatography Coupled with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2013;24(2):105-16.
111. López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, et al. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 2013;138(1):547-55.
112. Chávez-Mendoza C, Sánchez E. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules*. 2017;22(8):1360.
113. Alcázar-Valle M, Lugo-Cervantes E, Mojica L, Morales-Hernández N, Reyes-Ramírez H, Enríquez-Vara JN, et al. Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Antinutritional Content of Legumes: A Comparison between Four *Phaseolus* Species. *Molecules*. 2020;25(15):3528.
114. Ganesan K, Xu B. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(11):2331.

115. Celleno L, Tolaini MV, D'Amore A, Perricone NV, Preuss HG. A Dietary Supplement Containing Standardized Phaseolus vulgaris Extract Influences Body Composition of Overweight Men and Women. *International Journal of Medical Sciences*. *International Journal of Medical Sciences*; 2007;45–52.
116. Rodríguez L, Mendez D, Montecino H, Carrasco B, Arevalo B, Palomo I, et al. Role of Phaseolus vulgaris L. in the Prevention of Cardiovascular Diseases—Cardioprotective Potential of Bioactive Compounds. *Plants*. 2022;11(2):186.
117. Hong Q, Ma Z-C, Huang H, Wang Y-G, Tan H-L, Xiao C-R, et al. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. *European Journal of Pharmacology*. 2016;777:1-8.
118. Li D, Rui Y-x, Guo S-d, Luan F, Liu R, Zeng N. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sciences*. 2021;284:119921.
119. Chang S-S, Lee VSY, Tseng Y-L, Chang K-C, Chen K-B, Chen Y-L, et al. Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3 β . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:1-8.
120. Alfei S, Signorello MG, Schito A, Catena S, Turrini F. Reshaped as polyester-based nanoparticles, gallic acid inhibits platelet aggregation, reactive oxygen species production and multi-resistant Gram-positive bacteria with an efficiency never obtained. *Nanoscale Advances*. 2019;1(10):4148-57.
121. Choi J-H, Park S-E, Kim S-J, Kim S. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie*. 2015;115:177-86.
122. Chung M-I, Gan K-H, Lin C-N, Ko F-N, Teng C-M. Antiplatelet Effects and Vasorelaxing Action of Some Constituents of Formosan Plants. *Journal of Natural Products*. 1993;56(6):929-34.
123. Hubbard G, Stevens J, Cicmil M, Sage T, Jordan P, Williams C, et al. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(5):1079-88.
124. Sheu J-R, Hsiao G, Chou P-H, Shen M-Y, Chou D-S. Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Rutin, a Glycoside of the Flavonol Quercetin, in Human Platelets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(14):4414-8.
125. Fuentes E, Caballero J, Alarcón M, Rojas A, Palomo I. Chlorogenic Acid Inhibits Human Platelet Activation and Thrombus Formation. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90699.
126. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *The Journal of Physiology*. 1963;168(1):178-95.
127. Martínez-Navarrete N, Camacho Vidal MdM, Martínez Lahuerta JJ. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 2008;12(2):64-8.
128. Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, et al. Legume Consumption and Risk of Coronary Heart Disease in US Men and Women. *Archives of Internal Medicine*. 2001;161(21):2573.
129. Bedoya RA, Maldonado ME. Características nutricionales y antioxidantes de la especie de frijol petaco (Phaseolus coccineus). *Revista chilena de nutrición*. 2022;49(1):34-42.

130. Kyriakidis KD, Vartholomatos EG, Markopoulos GS. Evaluation of Antiplatelet Activity of Phenolic Compounds by Flow Cytometry. *European Journal of Medical and Health Sciences*. 2021;3(1):165-70.
131. Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(2):369-76.
132. Madrera RR, Valles BS. Development and validation of ultrasound assisted extraction (UAE) and HPLC-DAD method for determination of polyphenols in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2020;85:103334.
133. Tzeng S-H, Ko W-C, Ko F-N, Teng C-M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*. 1991;64(1):91-100.
134. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology*. 1984;33(9):1525-30.
135. Lin L, Gopal S, Sharda A, Passam F, Bowley SR, Stopa J, et al. Quercetin-3-rutinoside Inhibits Protein Disulfide Isomerase by Binding to Its b' x Domain *. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(39):23543-52.
136. Zaragoza C, Álvarez-Mon MÁ, Zaragoza F, Villaescusa L. Flavonoids: Antiplatelet Effect as Inhibitors of COX-1. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2022;27(3):1146.
137. Zaragoza C, Monserrat J, Mantecón C, Villaescusa L, Álvarez-Mon MÁ, Zaragoza F, et al. Binding and antiplatelet activity of quercetin, rutin, diosmetin, and diosmin flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;141:111867.
138. Beretz A, Cazenave J-P, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: Structure-activity relationships. *Agents and Actions*. 1982;12(3):382-7.
139. Rodríguez-Azúa R, Quinteros EF, Olate-Briones A, Moore-Carrasco R. *Phaseolus vulgaris* Exerts an Inhibitory Effect on Platelet Aggregation through AKT Dependent Way. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2018;23(2):102-7.
140. Sbrana S, Della Pina F, Rizza A, Buffa M, De Filippis R, Gianetti J, et al. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2008;74B(1):30-9.
141. Lizarralde MA, Merriweather B, Conrey A, Saxena A, Shet AS. Effects of Flavonoid Quercetin on Thrombo-Inflammatory Processes in Patients with Sickle Cell Disease. *Blood*. 2021;138:2020.