

# Evaluación de la actividad antiagregante en plaquetas humanas de la corteza de *Nectandra amazonum* Nees.

Jenaro Antonio Espitia Corredor, Luis Enrique Cuca Suárez, Mario Francisco Guerrero Pabón

## RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto antiagregante plaquetario y posibles mecanismos de acción de una fracción procedente del extracto etanólico de la corteza de *Nectandra amazonum* Nees. [N.V. “laurel amarillo”, *Lauraceae*] aplicando la metodología espectrofotométrica de Born en plaquetas humanas. El efecto se identificó probando la fracción (0,1 mg/mL) frente a los agonistas de la agregación plaquetaria: adenosindifosfato (ADP 2  $\mu$ M), epinefrina (EPI 2  $\mu$ M), colágeno (COL 1  $\mu$ g/mL) y ácido araquidónico (AA 0,2 mg/mL), utilizando ácido acetil salicílico (ASA 0,5 mM) como patrón de referencia y el vehículo, DMSO (0,1%) como control. Adicionalmente, se efectuaron curvas concentración – respuesta de la fracción (desde 1  $\mu$ g/mL hasta 0,6 mg/mL) para determinar su concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) y, consecuentemente, su potencia antiagregante (pCI<sub>50</sub>: -log [CI<sub>50</sub>]).

Los resultados mostraron que mientras las plaquetas expuestas al vehículo generan notorios porcentajes de agregación plaquetaria en presencia de todos estos inductores (AA 96%, EPI 89%, COL 85%, ADP 77%), la fracción de *N. amazonum* los reduce significativamente (AA 6%, EPI 45%, COL 10%, ADP 21%), con valores próximos a los obtenidos con ASA (AA 17%, EPI 21%, COL 10%, ADP 20%). Al examinar las curvas concentración – respuesta, se observa que la potencia antiagregante de la fracción de *N. amazonum* frente a estos agonistas arroja valores de pIC<sub>50</sub>: AA 4,90 > ADP 4,51 > COL 4,33 > EPI 3,85. Estos resultados sugieren que la corteza de *N. amazonum* posee metabolitos con efectos antiagregantes plaquetarios cuyos mecanismos de acción estarían vinculados principalmente con la inhibición de ácido araquidónico.

**Palabras Clave** - *Nectandra amazonum*, Inhibidores de agregación plaquetaria, ADP, Colágeno, Epinefrina, Ácido araquidónico.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (EC) tienen un impacto en salud pública tal que constituyen la primera causa de mortalidad en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2012 murieron, producto de estas enfermedades,

17,5 millones de personas (30% de la mortalidad total), de las cuales 7,4 millones se debieron a enfermedad coronaria (EC) y 6,7 millones a accidente cerebrovascular (ACV). Para el mismo año en Colombia se reportaron más de 50 mil muertes por enfermedades cardiovasculares de un total de 202.000 [1, 2, 3]. La EC es la primera causa de morbilidad, no solo en países altamente industrializados sino en países en vía de desarrollo y la progresión de este trastorno hacia complicaciones tales como angina inestable (AI), infarto del miocardio (IM) y muerte súbita, guarda una estrecha relación con el fenómeno de agregación plaquetaria [4, 5].

Pese a que cambios comportamentales como dejar de fumar, incrementar la actividad física y una dieta saludable, entre otros, constituyen un aspecto fundamental en la reducción del riesgo cardiovascular (prevención primaria), el ataque farmacológico a la formación de trombos sobre la placa ateromatosa es un objetivo central en la terapéutica cardiovascular (prevención secundaria), habida cuenta de la disminución en la morbilidad por enfermedad coronaria gracias al uso de fármacos antiagregantes plaquetarios, entre ellos y particularmente, el ácido acetil salicílico (ASA) [6, 7]. Fuentes de origen natural podrían proporcionar agentes antiagregantes novedosos que contribuyan en el manejo de estos trastornos, tal y como ocurrió en su momento precisamente con el ácido acetil salicílico.

Metabolitos aislados de las hojas de *Nectandra amazonum* Nees. (“laurel amarillo”), especie de la familia *Lauraceae*, han mostrado actividad antiagregante en el modelo *ex vivo* de plaquetas de conejo sin que hasta la fecha se haya estudiado el efecto de la corteza en plaquetas humanas [8]. En este trabajo se describen los efectos antiagregantes en plaquetas humanas de una fracción obtenida de la corteza de *N. amazonum* frente a agonistas centrales de la agregación plaquetaria: adenosindifosfato (ADP), epinefrina (EPI), colágeno (COL) y ácido araquidónico (AA).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Jenaro Antonio Espitia Corredor: [jaespitiac@unal.edu.co](mailto:jaespitiac@unal.edu.co), estudiante de Maestría en Ciencias - Farmacología, Universidad Nacional de Colombia.

Luis Enrique Cuca Suárez: [lecucas@unal.edu.co](mailto:lecucas@unal.edu.co), Profesor Titular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

Mario Francisco Guerrero Pabón: [mfguerrerop@unal.edu.co](mailto:mfguerrerop@unal.edu.co), Profesor Titular, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

#### A. Extracción y fraccionamiento

El material vegetal fresco de la corteza de *N. amazonum* se recolectó en proximidades de la estación biológica El Zafire de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Amazonía (S 4° 3' 7"; O 69° 59' 54", Ingeniera Adriana Aguilar). Un ejemplar fresco se envió para su clasificación botánica al Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, UNCSB, donde se le asignó el código COL 518189 (Botánico Adolfo Jara Muñoz). El material, una vez seco y molido, se sometió a extracción por percolación con etanol al 96% a temperatura ambiente, y posteriormente se fraccionó por cromatografía en columna con la mezcla tolueno - acetato de isopropilo en proporción 7:3.

#### B. Protocolo Experimental

Para estudiar el efecto antiagregante de la fracción de *N. amazonum*, se empleó la técnica descrita por Born [9], que utiliza un fotómetro modificado (agregómetro) en el que se registran cambios en la transmisión de luz ocurridos en plasma rico en plaquetas (PRP) tras la estimulación con un inductor de la agregación plaquetaria. Para ello, se obtuvo sangre (18 mL) de voluntarios sanos de entre 18 y 45 años que no hubieran recibido ningún tipo de medicamento durante las dos últimas semanas [10] y previo consentimiento informado. La sangre se recogió en tubos al vacío de citrato sódico al 3,2% en una proporción de 9/1 [11]. Las muestras se procesaron para obtener PRP por centrifugación durante 10 minutos a 1.500 rpm, y plasma pobre en plaquetas (PPP) por una centrifugación adicional durante 10 minutos a 3.500 rpm. El PPP se empleó para calibrar el equipo a 100% de transmitancia y 0% de absorbancia, manteniendo la temperatura en 37°C [12].

#### C. Primera Fase

Con el fin de identificar el efecto antiagregante, a 220 µL de PRP se le adicionaron cinco µL de la fracción de *N. amazonum*, de ASA (0,55 mM) o de DMSO (0,01%) permitiendo una incubación de 30 minutos, tras lo cual se adicionaron 25 µL del agonista. De tal manera, la concentración obtenida con la fracción fue de 0,1 mg/mL, la de ASA, 0,55 mM la de DMSO, 0,01% y la de los agonistas: ADP 2 µM, EPI 1 µM, COL 1 µg/mL y AA 0,2 mg/mL.

#### D. Segunda Fase

Con el fin de determinar la potencia antiagregante de la fracción, se efectuó el procedimiento anterior utilizando concentraciones sucesivas de la fracción, de 1, 3, 6, 10, 30, 60, 100, 300 y 600 µg/mL para obtener la CI<sub>50</sub> de la fracción frente

a cada uno de los agonistas ensayados y su respectivo valor de potencia, pCI<sub>50</sub> (-log CI<sub>50</sub>).

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá en Acta 02 del 10 de marzo de 2014 aprobó este trabajo como una investigación con riesgo mínimo (Literal b, Artículo 11, Resolución No. 008430 de 1993 – Ministerio de Salud, República de Colombia).

#### E. Expresión y Análisis Estadístico de los Resultados

Los resultados se expresaron como el promedio de los datos ± el error estándar de la media (e.s.m.), con un tamaño de muestra por cada grupo igual o mayor a ocho. El valor de agregación máxima (100%) se obtuvo del valor de transmitancia generado al adicionar únicamente el agonista respectivo al PRP. A partir de este valor se obtuvieron los respectivos porcentajes de agregación plaquetaria en presencia de las diferentes concentraciones de la fracción, el patrón y el control.

La CI<sub>50</sub>, con sus respectivos intervalos de confianza, se obtuvo del análisis de regresión semilogarítmica de las concentraciones de la fracción versus el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria. Para identificar diferencias significativas entre los tratamientos empleados se aplicó la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* seguida de la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn*, habiendo previamente examinado los supuestos paramétricos de distribución normal y homogeneidad de varianzas (pruebas de *D'Agostino* y *Barlett*) y asumiendo un nivel de significancia de 95% (p<0,05). Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico *GraphPad PRISM*® versión 5.01. A partir de los datos de CI<sub>50</sub> se obtuvieron los valores de potencia antiagregante, expresados como pCI<sub>50</sub> (-log CI<sub>50</sub>).

### III. RESULTADOS

La fracción de *N. amazonum* redujo significativamente la agregación plaquetaria inducida por los cuatro agonistas ensayados, arrojando valores de: AA 6%, EPI 45%, COL 10% y ADP 21%. El grupo control (vehículo DMSO 0,01%) alcanzó altos valores de agregación: AA 96%, EPI 89%, COL 85%, ADP 77%, mientras que el agente de referencia utilizado, ASA, también redujo notoriamente la agregación plaquetaria: AA 17%, EPI 21%, COL 10%, ADP 20 (Fig. 1). Al examinar las curvas concentración – respuesta, las CI<sub>50</sub> y los valores de pIC<sub>50</sub>, se observó que la potencia antiagregante de la fracción de *N. amazonum* frente a estos agonistas se estableció en el siguiente orden: AA 4,90 > ADP 4,51 > COL 4,33 > EPI 3,85. (Tabla 1, Fig. 2).

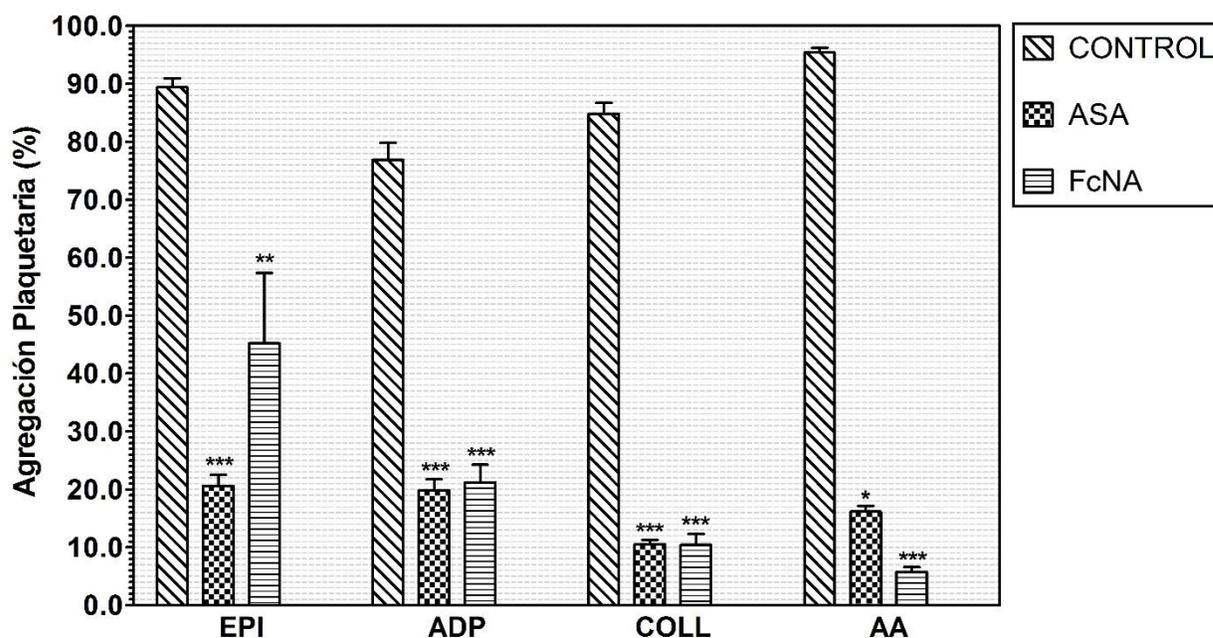


Fig. 1. Porcentaje de agregación plaquetaria inducido por la fracción de *N. amazonum* (FcNA, 0,1mg/mL), ácido acetil salicílico (ASA 0,5 mM) y DMSO (control, 0,01%) en presencia de epinefrina (EPI 1  $\mu$ M), colágeno (COLL 1  $\mu$ g/mL), adenosin-difosfato (ADP 2  $\mu$ M) y ácido araquidónico (AA (0,2 mg/mL). Cada barra representa el promedio  $\pm$  e.s.m., de  $n \geq 8$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto al control.

Tabla 1. Concentración inhibitoria 50 y logaritmo negativo de la  $CI_{50}$  ( $pCI_{50}$ ) generado por la fracción de *N. amazonum* (FcNA) en presencia de epinefrina (EPI 1  $\mu$ M), colágeno (COLL 1  $\mu$ g/mL), adenosin-difosfato (ADP 2  $\mu$ M) y ácido araquidónico (AA 0,2 mg/mL).

Agonista	$pCI_{50}$ [Intervalo de confianza (95%)]	$CI_{50}$ [Intervalo de confianza (95%)] ( $\mu$ g/mL)
EPI (1 $\mu$ M)	3,85 [3,77 - 3,93]	14,2 [11,8 - 17,1]
COLL (1 $\mu$ g/mL)	4,33 [4,29 - 4,36]	47,0 [43,5 - 50,8]
ADP (2 $\mu$ M)	4,51 [4,43 - 4,58]	31,2 [26,1 - 37,4]
AA (0,2 mg/mL)	4,90 [4,85 - 4,95]	12,6 [11,3 - 14,1]

#### IV. DISCUSIÓN

Estos resultados muestran que la fracción de corteza de *N. amazonum* posee efectos antiagregantes plaquetarios frente a los inductores de la agregación EPI, COLL, ADP y AA lo que sugiere un amplio espectro de actividad antiplaquetaria. No obstante, dado el diferente perfil arrojado por los valores de potencia antiagregante los datos apuntan a que los metabolitos activos de esta especie se dirigen especialmente a inhibir los mecanismos vinculados con la agregación inducida por ácido araquidónico. Esto permite plantear que tales metabolitos bloquearían eventualmente los receptores plaquetarios de tromboxano A2 (TXA2), mediador del que AA es precursor; o bien que, de modo similar a como ocurre con el ácido acetil salicílico, tales metabolitos estarían inhibiendo la síntesis misma del AA [13, 14]. Estudios posteriores tendrán que despejar este interrogante. En todo caso, mecanismos

inhibitorios de la vía de agregación del ácido araquidónico tendrían repercusión en clínica si se tiene en cuenta que a través de la inhibición de esta vía metabólica, el efecto antiagregante del ácido acetilsalicílico se ha traducido en la disminución de la morbimortalidad de fenómenos aterotrombóticos como el infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular. Este es un elemento adicional que da soporte para estudios posteriores tendientes a identificar los metabolitos de *N. amazonum* responsables de la actividad farmacológica y su mecanismo de acción.

Por otro lado, cabe considerar que, si bien la potencia antiagregante de esta fracción es discreta, el fraccionamiento fitoquímico bioguiado de esta fracción puede conducir eventualmente al aislamiento de principios activos más potentes. No obstante, una marcada potencia antiagregante podría estar ligada a eventos hemorrágicos asociados a una

notoria inhibición de la actividad plaquetaria por lo que, tampoco es deseable una marcada inhibición plaquetaria. Además, mecanismos adicionales de inhibición plaquetaria,

tales como los ligados a la vía de la adhesión plaquetaria mediada por ADP tendrían también que considerarse [15, 16, 17, 18].

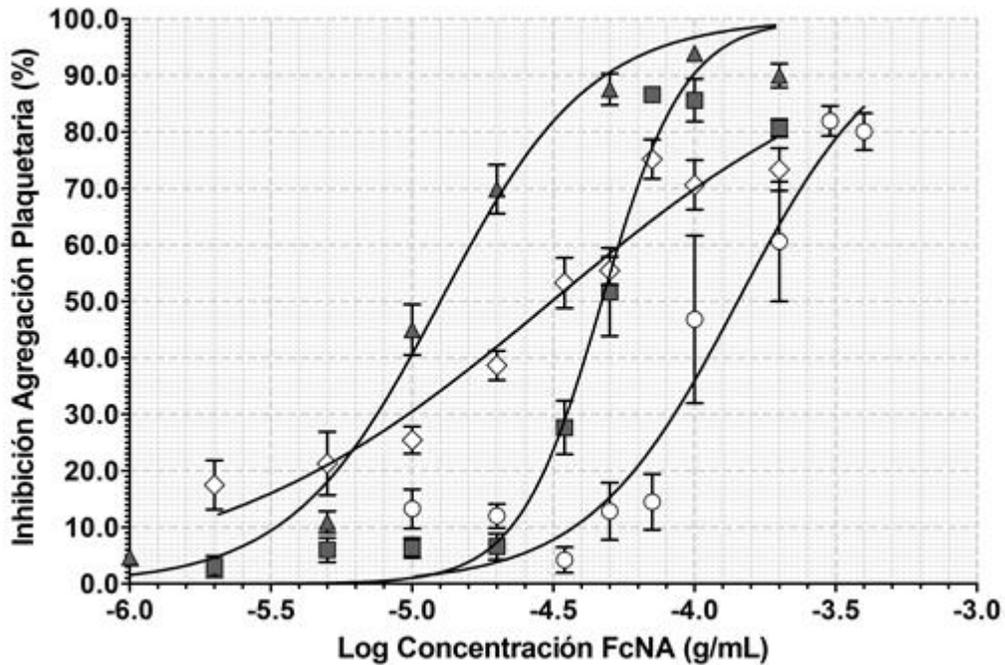


Fig. 2. Porcentaje de inhibición de la agregación de plaquetas humanas inducidos por la fracción de *N. amazonum* en función de la dosis (FcNA 1 – 600 µg/mL) en presencia de epinefrina (EPI: ◯ 1 µM), colágeno (COLL: ■ 1 µg/mL), adenosin-difosfato (ADP ◊ 2 µM) y ácido araquidónico (AA ▲ 0,2 mg/mL). Cada punto representa el promedio ± e.s.m., n=8.

Análisis fitoquímicos previos de extractos de hojas, madera y corteza de *N. amazonum* muestran la presencia de taninos, esteroides, triterpenoides, cumarinas, flavonoides, lactonas terpénicas y neolignan, algunos de ellos con efectos antiagregantes desde el orden nanomolar, comparables a los descritos en la literatura para el ácido acetilsalicílico, lo que permiten augurar un potencial antiagregante promisorio para estos compuestos [8, 19, 20].

Los resultados obtenidos en este estudio permiten plantear que la corteza de *N. amazonum* posee también metabolitos activos con actividad antiagregante plaquetaria por lo que es necesario avanzar en la el aislamiento e identificación de los metabolitos responsables de la actividad y determinar su mecanismo de acción para establecer su perfil como fuente natural potencial de nuevos agentes antiplaquetarios.

#### V. CONCLUSIONES

La fracción de corteza de *N. amazonum* ejerce efectos antiagregantes en plaquetas humanas a través de mecanismos especialmente vinculados a acciones inhibitorias sobre la vía del ácido araquidónico. Se requieren estudios adicionales para

identificar sus metabolitos activos y precisar su mecanismo de acción.

#### AGRADECIMIENTOS

A los grupos de investigación *Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas* (COL0004522) y *FARMOL* (COL 0064459). A la Dirección Curricular del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, UNCSB. Al programa de becas de asistente docente de la Facultad de Ciencias y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

#### REFERENCIAS

- [1] WHO (2011). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. Technical report, World Health Organization.
- [2] WHO (2014). *Global status report on noncommunicable diseases 2012*. Technical report, World Health Organization.
- [3] WHO (2014). *Noncommunicable Diseases (NCD)*

- Country Profiles, Colombia*. Technical report, World Health Organization.
- [4] Verdier, F. & Fourcade, L. (2007). Changes in cardiovascular risk factors in developing countries. *Med Trop*, 67(6), 552-558.
- [5] Pothula, A., Serebruany, V. L., Gurbel, P., McKenzie, M. E., Atar, D. (2000). Pathophysiology and therapeutic modification of thrombin generation in patients with coronary artery disease. *Eur J Pharmacol*, 402(1-2), 1-10.
- [6] Trujillo, T. C. & Dobesh, P. P. (2007). Traditional management of chronic stable angina. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 27(12), 1677-1691.
- [7] WHO (2005). Part Three - What works: the evidence for action, in: *Preventing chronic diseases a vital investment* pp. 105-108.
- [8] Coy Barrera, E. D. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en especies de la familia lauraceae (Pleurothyrium cinereum, Ocotea macrophylla y Nectandra amazonum), su actividad in vitro y síntesis de neolignanos biciclo [3.2.1] octánicos*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia.
- [9] Born, G. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, (4832), 927-929.
- [10] Harrison P., Mackie I., Mumford A., Briggs C., Liesner R., Winter M., Machin S. (2011). British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*, 155(1), 30-44.
- [11] Zucker, M. B. (1989). Platelet aggregation measured by the photometric method. *Meth. Enzymol*, 169, 117-133.
- [12] Corrons, J. & Bascompte, J. (1997). *Manual de técnicas de laboratorio en hematología*. Manuales espiral. Masson, 2da edición.
- [13] Awtry, E. H. & Loscalzo, J. (2000). Aspirin. *Circulation*, 101(10), 1206-1218.
- [14] Catella-Lawson, F., Reilly, M. P., Kapoor, S. C., Cucchiara, A. J., DeMarco, S., Tournier, B., Vyas, S. N., FitzGerald, G. A. (2001). Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. *N Engl J Med*, 345(25), 1809-1817.
- [15] Pérez Ruíz, A. O., Castillo Herrera, J. A., Gortazar González, T., Alvarez Fornari, M., Douglas Pedroso, R., Díaz Rondón, B. (1997). Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. *Rev Cubana Invest Biom*, 16, 150-155.
- [16] García, M. & Coma, C. (2000). Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*, 1(2), 132-141.
- [17] Sharathkumar, A. A. & Shapiro, A. D. (2008). *Trastornos de la función plaquetaria*. Federación Internacional de Hemofilia, 2da edición.
- [18] Gresele, P., Born, G., Patrono, C., & Page, C. (2012). *Antiplatelet Agents*. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer.
- [19] Cuca Suárez, L. E., Mendoza-Meza, D. L., Álvarez Caballero, J. M., Macías-Villamizar, V. E., & Coy Barrera, E. D. (2012). Actividad acaricida de extractos de lauráceas sobre los ácaros intradomiciliarios *Dermatophagoides farinae* y *Blomia tropicalis*. *Rev Cubana Plantas Med*, 17, 308-319.
- [20] de la Cruz, J. P., Bellido, I., Camara, S., Martos, F., & Sanchez de la Cuesta, F. (1986). Effects of acetylsalicylic acid on platelet aggregation in male and female whole blood: an in vitro study. *Scand J Haematol*, 36(4), 394-397.
- [21] Pyo, M. K., Yun-Choi, H. S., & Hong, Y. J. (2003). Antiplatelet activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *Magnolia obovata*. *Planta Med*, 69(3), 267-269.