

La epigallocatequina-3-galato induce apoptosis en plaquetas.

Katherin Rosal¹, Aliana Useche¹, Luis Morán², Mercedes López² y Gustavo Bruges².

¹Universidad Católica Andrés Bello. Facultad de Humanidades y Educación.
Escuela de Biología y Química. Caracas, Venezuela.

²Laboratorio de Hemostasia y Genética Vascular, Centro de Biofísica y Bioquímica,
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: apoptosis; plaquetas; epigallocatequina-3-galato; potencial de membrana mitocondrial; caspasas; fosfatidilserina.

Resumen. La apoptosis, una forma de muerte celular característica de las células nucleadas, se presenta también en las plaquetas humanas, donde juega un importante papel en el control de la densidad plaquetaria. La desregulación de este proceso en plaquetas, podría contribuir en el desarrollo de trombocitopenia. La apoptosis plaquetaria puede ser activada por agentes agonistas plaquetarios y xenobióticos. De estos últimos, es importante destacar las biomoléculas derivadas de plantas, a las cuales se les atribuyen efectos benéficos sobre la salud. De aquí surge la importancia de evaluar el proceso de apoptosis plaquetaria en presencia de estas sustancias. En este trabajo se evalúa el efecto apoptótico de la epigallocatequina-3 galato (EGCG) sobre distintos marcadores apoptóticos en plaquetas humanas. La EGCG es el flavonoide más abundante presente en extractos derivados de hojas de té verde, del cual se han reportado diversos efectos benéficos relacionados con sus propiedades antioxidantes. Las plaquetas obtenidas de donantes sanos fueron sometidas a un procedimiento de lavado y luego se incubaron en presencia de EGCG por 45 minutos a 37°C para posteriormente evaluar diversos marcadores apoptóticos. La EGCG, disminuyó el potencial de membrana mitocondrial en una manera dependiente de la concentración; activó a las caspasas 3, 8 y 9; e indujo la exposición de fosfatidilserina. El efecto apoptótico *in vitro* de la EGCG sugiere su posible papel en la disminución del número de plaquetas circulantes en sangre.

Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis on human platelets.

Invest Clin 2018; 59 (2): 146 - 154

Key words: apoptosis; platelets; epigallocatechin-3-gallate; mitochondrial membrane potential; caspases; phosphatidylserine.

Abstract. Apoptosis, a form of cell death characteristic of nucleated cells, also occurs in human platelets. It plays an important role in platelet density control. A deregulation of this process could contribute to increase thrombocytopenia. Platelet apoptosis can be triggered by platelet agonists and xenobiotic agents. Important xenobiotics are plant-bioproducts (secondary metabolites) which have been recognized for having beneficial effects on health. However, it is important to evaluate platelet apoptosis in presence of these substances and thus to establish safety profiles. In this work, we evaluated the apoptotic effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on different apoptotic markers in human platelets. The EGCG is the most abundant flavonoid present in extracts derived from green tea leaves, which has various beneficial effects related to its antioxidant properties. Platelets obtained from healthy donors were washed and then incubated with EGCG, for 45 minutes at 37°C, to evaluate its influence in the mitochondrial membrane potential, caspases activity and phosphatidylserine exposure. The results showed that EGCG, decreases the mitochondrial membrane potential in a concentration-dependent manner. It also activates caspases 3, 8 and 9, and induces exposure to phosphatidylserine. The *in vitro* apoptotic effect of EGCG suggests its possible role in decreasing the number of circulating blood platelets.

Recibido: 16-11-2017 Aceptado: 22-03-2018

INTRODUCCIÓN

Las plaquetas humanas juegan un papel importante en los procesos de hemostasia y coagulación. Recientemente, se han descrito procesos de apoptosis en plaquetas, a pesar de ser estas, fragmentos celulares carentes de núcleo (1, 2). La muerte celular por apoptosis se lleva a cabo mediante la permeabilización mitocondrial y la activación de caspasas. La activación de estas proteasas se traduce en cambios morfológicos como la fragmentación del DNA, la modificación de la membrana plasmática y la posterior eliminación de la célula por fagocitosis. Existen dos rutas principales de activación de la apoptosis: 1) La vía extrínseca que se inicia en la

membrana con la activación de los receptores de muerte que al unirse a determinadas proteínas extracelulares, desencadenan la activación de la caspasa 8 iniciadora. 2) La vía intrínseca se inicia en respuesta al daño celular causado por radiación o por determinados compuestos tóxicos, esto desencadena una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo-c al citoplasma con la activación de la caspasa-9 y la formación de una estructura molecular conocida como apoptosoma (3-5).

Tanto la vía extrínseca como la intrínseca, tienen una vía de activación final común a nivel de la caspasa-3 ejecutora, que inicia las vías de señalización que producen la fragmentación del DNA y la exposición

de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. La consecuencia final es un cambio morfológico donde la célula apoptótica es eliminada por un proceso de fagocitosis. En las plaquetas humanas, se ha evidenciado la presencia de los marcadores apoptóticos antes mencionados, a excepción de los relacionados con la degradación del DNA debido a la carencia de núcleo. Se ha sugerido que uno de los papeles fisiológicos de la apoptosis en plaquetas, es el relacionado con el control de la densidad plaquetaria (2, 6). El mantenimiento del número adecuado de plaquetas en sangre, garantiza que los procesos hemostáticos funcionen de manera adecuada. En este sentido, algunas evidencias sugieren que diversos factores químicos exógenos alteran la densidad plaquetaria en sangre e inducen trombocitopenia. Así, fármacos como la aspirina, anestésicos locales, la trombina y algunos bioproductos derivados de plantas, incrementan la apoptosis en plaquetas. Adicionalmente, la apoptosis plaquetaria contribuye a la liberación de micropartículas derivadas de plaquetas, las cuales son microvesículas implicadas en enfermedades cardiovasculares, alteración de la hemostasia y otras funciones patológicas (7-9).

La literatura describe ampliamente el efecto protector de los antioxidantes sobre la acción de los radicales libres (10-14). Es de esperar que una inhibición de la producción de radicales libres contribuya en la disminución de la apoptosis plaquetaria, ya que las especies reactivas de oxígeno se encuentran implicadas en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. En este sentido, se ha sugerido el uso de antioxidantes derivados de plantas por su efecto antioxidante. No obstante, se ha observado un efecto dual de estas moléculas, debido a que altas concentraciones de las mismas contribuyen con efectos pro-oxidantes que inducen eventos apoptóticos. La epigallocatequina-3-gálato (EGCG), es una molécula que se encuentra presente en grandes cantidades en el té verde. Desde el punto de vista estructural, la

EGCG es un polifenol del grupo de los flavonoides, que contiene en su estructura, mayor cantidad de potenciales grupos funcionales que se encuentran implicados en procesos de autooxidación, cuando se compara con una molécula como el pirogalol, un agente con capacidad de generar radicales libres y producir efectos apoptóticos (15-19). A la EGCG se le adjudican los efectos benéficos del té verde en diversos modelos experimentales (14, 20). Sin embargo, se desconoce a qué concentraciones la EGCG puede inducir apoptosis en plaquetas, lo que permitiría sugerir un posible efecto tóxico sobre estos fragmentos celulares. En este estudio se caracterizó el efecto apoptótico de la EGCG en plaquetas humanas, utilizándose como marcadores apoptóticos, el descenso del potencial mitocondrial, la activación de las caspasas 3, 8 y 9 y la exposición de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Pirogalol, EGCG, CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona) y JC-1 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). El kit FAM FLICA usado para la detección de caspasa 3, 8 y 9 fue obtenido en Immunochemistry Technology (MN, USA) y la anexina V-FITC fue adquirida de Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA).

Procesamiento y obtención de plaquetas lavadas

Las muestras de sangre utilizadas fueron obtenidas, en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, de donantes aparentemente sanos (30 individuos), del sexo femenino o masculino, de edades comprendidas entre 20 y 30 años, en ayunas y como condición no haber tomado medicamentos durante dos semanas antes de la toma de la muestra, ni ningún tipo de bebida alcohólica 24 horas antes. Este estudio siguió los li-

neamientos de la Declaración de Helsinki de 1975 y revisada en 2008 (21) y fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas con el número DIR-0997/1569/2016.

La muestra de sangre se obtuvo por venopunción antecubital, y fue colocada en tubos cónicos plásticos de 15 mL, que contenían ACD como anticoagulante (citrato de sodio di-hidratado 25%, ácido cítrico 1,5%, glucosa 2%) en una proporción 1:9 (ACD:sangre) y mezclada por inversión. Seguidamente, se obtuvo el plasma rico en plaquetas (PRP) por centrifugación a 160×g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El PRP fue separado del resto de los componentes de la sangre, sin perturbar la capa leucocitaria. La densidad plaquetaria se determinó mediante conteo en hemocitómetro automático DREW3® (Drew Scientific Inc, Miami, USA).

Para la obtención de las plaquetas lavadas, el PRP fue centrifugado a 1200×g por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue descartado y el sedimento plaquetario fue lavado y resuspendido en solución amortiguadora CGS pH 6,4 (10 mM citrato de sodio, 30 mM glucosa, 120 mM ClNa); el lavado se repitió una vez más y finalmente, el precipitado de plaquetas fue resuspendido en Tyrode pH 7,4 suplementado con albúmina sérica bovina al 0,3%. Nuevamente, se determinó la densidad plaquetaria y se dejaron las plaquetas en reposo durante 1 hora.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ fue medido usando la sonda JC-1, que se caracteriza por acumularse en la mitocondria dependiendo del $\Delta\Psi_m$. A bajo $\Delta\Psi_m$, el JC-1 es un monómero y emite fluorescencia en la región verde (545nm), mientras que JC-1 se agrega con $\Delta\Psi_m$ alto y emite fluorescencia en la región roja (596nm). Cuando disminuye el potencial de membrana mitocondrial, la relación de las unidades relativas de fluorescencia es menor a la unidad (RFU596/RFU545 < 1) (22).

Las plaquetas (1×10^8 /mL) fueron incubadas en ausencia (control) o en presencia de EGCG (0,01-100 μ M), o pirogalol (concentración 0,01-100 μ M) durante 45 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, las plaquetas fueron cargadas con 0,5 μ M de JC-1 a 37°C durante 10 min, y posteriormente, fueron centrifugadas a 1200×g por 10 min a temperatura ambiente, resuspendidas en Tyrode pH 7,4 y analizadas inmediatamente en un lector de fluorescencia. Las muestras fueron excitadas a 488 nm y la emisión se detectó a 545 nm para JC-1 monomérico y 596 nm para JC-1 agregado. Los resultados se expresaron de la manera siguiente:

$$\% \Delta\psi_m = \frac{R_{muestra}}{R_{control}} \times 100$$

donde $\% \Delta\Psi_m$ es el porcentaje de potencial mitocondrial con respecto al control.

$R_{muestra}$ y $R_{control}$ son las relaciones de fluorescencia entre agregado y monómero (RFU596/RFU545) para muestra y control respectivamente.

En todos los ensayos se utilizó el desacoplante de protones mitocondrial CCCP como control positivo para evaluar la disipación del $\Delta\Psi_m$.

Evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9

Las plaquetas (1×10^8 /mL) fueron tratadas con pirogalol (30 μ M) o EGCG (10 μ M) por 60 min a 37°C, y posteriormente, se centrifugaron a 1200×g durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en solución Tyrode. La detección de las caspasas 3, 8 y 9, se realizó mediante incubación de las plaquetas con 10 μ L del reactivo inhibidor FAM-FLICA correspondiente a cada caspasa, durante 1 hora a 37°C y en oscuridad. Luego, las plaquetas se centrifugaron a 1200×g por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 200 μ L de solución Tyrode pH 7,4. La fluorescencia emitida fue detectada usando un lector de fluorescencia (excitación/emisión 488nm/530 nm).

Evaluación de la exposición de fosfatidilserina con anexina V-FITC

La anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue usada para detectar la externalización del fosfolípido fosfatidilserina en células apoptóticas. Para ello, las plaquetas (1×10^8 /mL) previamente tratadas con pirogalol o EGCG por 1 hora a 37°C , fueron colectadas por centrifugación a $1200 \times g$ por 10 min, y resuspendidas en $200 \mu\text{L}$ de buffer de unión a anexina V (0,3% albumina sérica bovina, 0,01 M HEPES, pH 7,4; 0,14 M NaCl; 2,5 mM CaCl_2) que contenía $0,2 \mu\text{L}$ de Anexina V-FITC (0,6 g/mL) e incubadas durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las plaquetas se centrifugaron a $1200 \times g$ por 10 min y fueron resuspendidas en Tyrode pH 7,4. El análisis se realizó empleando el lector de fluorescencia de microplacas con excitación/emisión de 496/560 nm.

Análisis de los datos

La relación de fluorescencia agregado/monómero, para la determinación del potencial de membrana mitocondrial, fue analizada con el software GraphPadPrism®. El *software* utiliza ajustes de regresión no lineal en el análisis de curvas de dosis respuesta para así obtener el valor del IC_{50} de cada sustancia (concentración del agente que produce una disminución de la respuesta inicial en un 50%). Las comparaciones entre los diferentes tratamientos fueron sometidas a pruebas estadísticas no paramétricas de tipo Kruskal-Wallis, considerando un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Determinación del potencial de membrana mitocondrial

En plaquetas lavadas incubadas con EGCG, pirogalol o CCCP, se evidenció una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial (Fig. 1). El efecto desacoplante del EGCG fue potencialmente

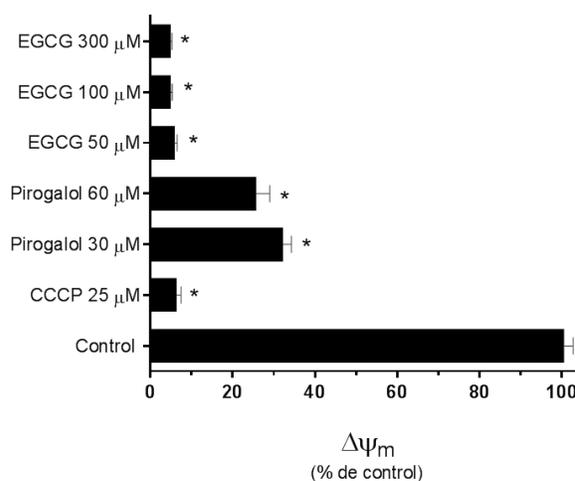


Fig. 1. Efecto de distintos agentes sobre $\Delta\Psi_m$ en plaquetas lavadas. Se muestra el efecto de EGCG, pirogalol y CCCP (control de disipación) sobre el $\Delta\Psi_m$. Cada barra es representativa de tres experimentos realizados por triplicado. * $P < 0,05$ al ser comparados por análisis de variancia utilizando el *software* GraphPadPrism®.

similar al del CCCP y superior al del pirogalol. El patrón de caída del potencial mitocondrial fue de naturaleza sigmoidea y permitió calcular los valores de IC_{50} para EGCG (Fig. 2). La Fig. 2 muestra, adicionalmente, las estructuras del pirogalol y la EGCG tomadas de la literatura, que permiten comparar la potencia de estas moléculas sobre la caída del potencial mitocondrial. Esto sugiere que una mayor presencia de grupos polifenólicos puede estar asociada a la mayor potencia del EGCG con respecto al pirogalol.

Efecto del EGCG sobre la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 en plaquetas humanas

La Fig. 3 muestra el incremento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9, inducida en presencia de $10 \mu\text{M}$ de EGCG y $30 \mu\text{M}$ de pirogalol (valores de concentración escogidos en base a los datos obtenidos de los ensayos de disipación del $\Delta\Psi_m$). Tanto el pirogalol como la EGCG incrementaron la actividad de las tres caspasas de manera similar, con

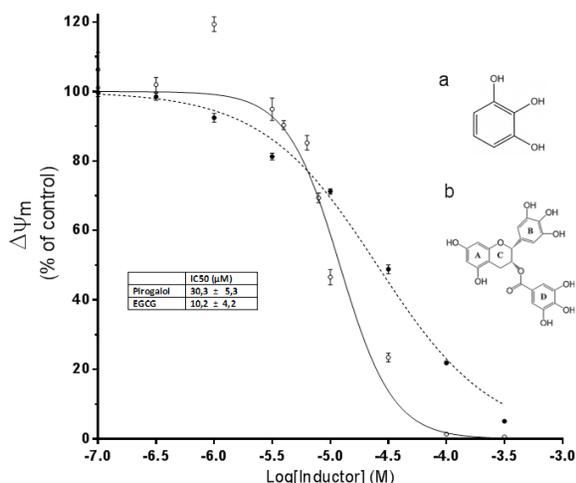


Fig. 2. Relación dosis-respuesta del EGCG y el pirogalol sobre el $\Delta\Psi_m$ en plaquetas. $\Delta\Psi_m$ de EGCG (círculos llenos) y pirogalol (círculos vacíos). Cada punto representa datos provenientes de tres experimentos realizados por triplicado. Adicionalmente se muestran las estructuras del pirogalol (a) y EGCG (b). Para detalles estructurales: Mitsuhashi y col. (30).

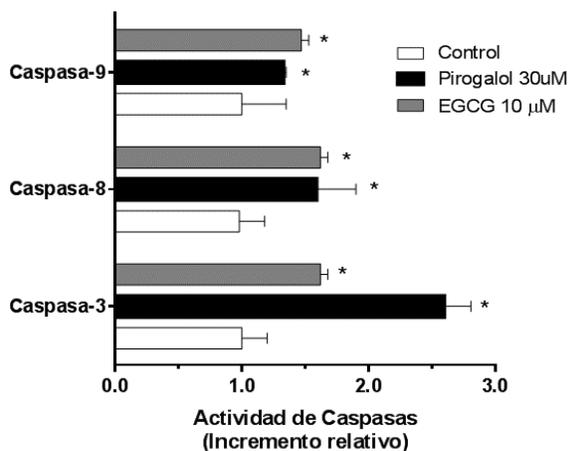


Fig. 3. Activación de las caspasas 3, 8 y 9 por EGCG y pirogalol en plaquetas lavadas. Las plaquetas lavadas se incubaron en ausencia (control) o presencia de pirogalol 30 μM o EGCG 10 μM por 1 hora a 37°C. La comparación por la prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas ($P < 0,05$) en los grupos de tratamiento con respecto al control.

excepción de la caspasa 3, donde el pirogalol mostró un efecto más pronunciado.

Efecto del EGCG sobre la unión de anexina V

La Fig. 4 muestra el efecto de concentraciones variables de EGCG sobre la unión de la anexina V. El EGCG incrementó la unión de anexina V. Este incremento fue superior al producido en presencia de pirogalol.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que el flavonoide EGCG estimula la apoptosis *in vitro* en plaquetas. Este efecto es dependiente de la concentración, como lo sugiere la curva dosis-respuesta relacionada con la disipación del potencial de membrana mitocondrial.

La apoptosis ocurre a través de dos vías principales: las vías apoptóticas extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial). En la vía apoptótica extrínseca, las citocinas

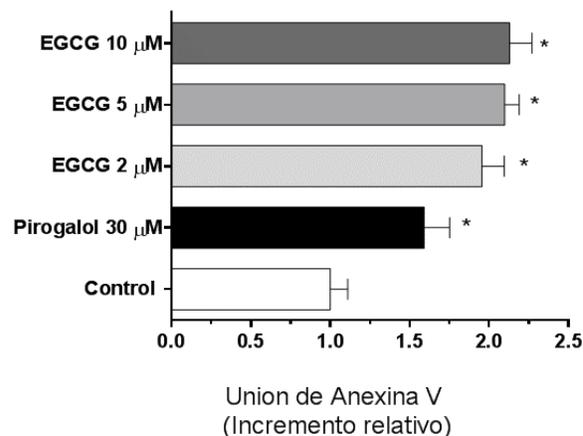


Fig. 4. Unión de Anexina V en plaquetas lavadas. Se muestra el efecto de concentraciones crecientes de EGCG sobre unión de anexina; se utilizó pirogalol como control positivo. La comparación por la prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas ($P < 0,05$) en los grupos con tratamiento en relación al control.

(factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Fas ligando (FasL) o el ligando inductor de apoptosis (TRAIL)), se unen a receptores de muerte de la membrana plasmática (receptores DR, TNF- α , FasL o TRAIL), que pueden captar el complejo de señalización inductor de la muerte (DISC) y activar a la caspasa-8 (4, 22, 23). En el citoplasma, el citocromo-c, el factor-1 activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) y la procaspasa-9 forman el apoptosoma que puede auto-activar a la caspasa-9, la cual posteriormente activa a la caspasa-3. La vía apoptótica intrínseca puede ser iniciada por una variedad de estímulos de estrés que incluyen daño al ADN, radiación UV, activación de genes supresores de tumores y la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, lo cual lleva a la liberación de citocromo-c y la posterior activación de las caspasas 9 y 3 (4, 8, 23-28).

La EGCG, es un molécula presente en las hojas del té verde, posee potenciales propiedades quimioterapéuticas (20), relacionadas con su capacidad de activar la apoptosis en varios tipos de cáncer. En este estudio, se muestra que la EGCG induce apoptosis en plaquetas, de manera dosis-dependiente a través de la disipación del $\Delta\Psi_m$.

Las curvas dosis-respuesta de la caída del potencial de membrana mitocondrial mostraron que la EGCG exhibe un efecto mayor en comparación con el pirogalol. Esto puede ser explicado en principio, por la mayor cantidad de grupos polifenólicos en la molécula de la EGCG comparada con el pirogalol. Hou y col. (29), han reportado que la EGCG se autooxida y genera radicales libres en medios de cultivo. La EGCG está constituida por dos anillos polifenólicos unidos a la catequina (30). La autooxidación de la EGCG se concentra en el anillo que conserva una similitud estructural con el ácido gálico; la generación de un radical libre por el O₂ es idéntica a la generada por este ácido cuando se oxida a pH alcalino. Luego de la autooxidación se produce una degradación de toda la estructura, debido a la generación de radicales libres liberados de la EGCG. Otro ele-

mento importante sumado a la observación anterior, sería la capacidad de la EGCG de perturbar la estructura de la membrana mitocondrial, debida también al componente hidrofóbico presente en su molécula, el cual es de mayor complejidad al presente en el pirogalol. Sun y col. (14), han observado que a concentraciones de EGCG superiores a 30 μM , se produce un trastorno conformacional de bicapas lipídicas artificiales, representado por una menor movilidad y un aumento de las interacciones laterales de las cadenas de hidrocarburos en los microdominios lipídicos (14). Las alteraciones en las membranas lipídicas celulares pueden modificar la actividad de proteínas implicadas en la regulación de la muerte celular. Esto podría explicar parcialmente, el efecto de la EGCG en la apoptosis plaquetaria.

El efecto apoptótico de la EGCG observado en este estudio, se evaluó a una temperatura de 37°C; sin embargo, se ha reportado un efecto de preservación de las plaquetas cuando estas se almacenan en presencia de EGCG a temperaturas de 22°C. Esta dualidad en el comportamiento de la EGCG ha sido observada con otros polifenoles (31). Lin y col. (32), han estudiado los mecanismos de inducción de apoptosis plaquetaria por resveratrol, un polifenol presente en el vino rojo. Similar al EGCG, el resveratrol afecta distintos marcadores apoptóticos plaquetarios. Pero recientemente, en un estudio de almacenamiento de plaquetas se demostró que el resveratrol preserva las funciones hemostáticas críticas (33). Las explicaciones para estos hechos, suelen estar relacionadas con el proceso de autooxidación asociado a los polifenoles y su dependencia de la temperatura (34, 35).

Este estudio sugiere que las caspasa-3, -8 y -9 se activan en presencia de EGCG. El proceso de activación de la caspasa 8 en plaquetas, pudiera estar relacionado con eventos no apoptóticos, pero no hay estudios concluyentes acerca de la presencia de una vía FasL en plaquetas; de aquí que sean necesarios estudios más detallados para caracte-

terizar esta vía de señalización apoptótica. Por otra parte, a diferencia de algunas sustancias que inducen apoptosis plaquetaria sin exposición de fosfatidilserina, la EGCG incrementó la exposición de este fosfolípido, como lo sugieren los resultados de unión de anexina V. Sin embargo, se requieren más estudios para caracterizar las subpoblaciones de plaquetas positivas a la exposición de fosfatidilserina.

El efecto apoptótico de la EGCG indica que esta molécula puede provocar una disminución de la supervivencia plaquetaria o incrementar el aclaramiento plaquetario *in vivo*. Thushara y col. (24, 27), han sugerido que las estrategias para promover la supervivencia plaquetaria mediante la inhibición de la apoptosis, pueden ser ventajosas en algunos pacientes con trombocitopenia. Por el contrario, los pacientes que padecen enfermedades trombóticas pueden beneficiarse del tratamiento con inductores apoptóticos para promover la apoptosis plaquetaria y prevenir así las secuelas asociadas con la coagulación patológica. Sin embargo, la función fisiológica de la maquinaria apoptótica en las plaquetas, aún no se comprende claramente, y la manera de influenciarla *in vivo* necesita ser investigada más a fondo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está conformado en parte por los resultados obtenidos del Trabajo Especial de Grado de la Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, realizado por Katherin Rosal y Aliana Useche. Este trabajo fue subvencionado por el proyecto “Estudio de la Muerte Celular en Plaquetas Humanas” del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas # 178.

REFERENCIAS

1. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol* 2013; 161:245-254.
2. Hoffmeister KM. Death regulates platelet birth and life. *Blood* 2012; 119:5617-5618.
3. Garcia de la Cadena S, Massieu L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. *Focus on caspase-12. Apoptosis* 2016; 21:763-777.
4. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1:19-30.
5. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:139-163.
6. Josefsson EC, Burnett DL, Lebois M, Debrincat MA, White MJ, Henley KJ, Lane RM, Moujalled D, Preston SP, O'Reilly LA, Pellegrini M, Metcalf D, Strasser A, Kile BT. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nat Commun* 2014; 5:3455.
7. Santhosh MS, Thushara RM, Hemshekhar M, Sunitha K, Devaraja S, Kemparaju K, Girish KS. Alleviation of viper venom induced platelet apoptosis by crocin (*Crocus sativus*): implications for thrombocytopenia in viper bites. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 36:424-432.
8. Thushara RM, Hemshekhar M, Basappa, Kemparaju K, Rangappa KS, Girish KS. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 93:149-158.
9. Zhao L, Zhang W, Chen M, Zhang J, Zhang M, Dai K. Aspirin induces platelet apoptosis. *Platelets* 2013; 24:637-642.
10. Argyri K, Proestos C, Komaitis M, Kapsokefalou M. Phenolic compounds in red wine digested *in vitro* in the presence of iron and other dietary factors. *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56:213-222.
11. Dias TR, Alves MG, Casal S, Oliveira PF, Silva BM. Promising potential of dietary (poly)phenolic compounds in the prevention and treatment of diabetes mellitus. *Curr Med Chem* 2017; 24:334-354.
12. Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, Oredsson SM. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 2011; 63:611-622.
13. Tufarelli V, Casalino E, D'Alessandro AG, Laudadio V. Dietary phenolic compounds: biochemistry, metabolism and significance

- in animal and human health. *Curr Drug Metab* 2017; 18:905-913.
14. Sun Y, Hung WC, Chen FY, Lee CC, Huang HW. Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers. *Biophys J* 2009; 96:1026-1035.
 15. Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Pyrogallol as a glutathione depletor induces apoptosis in HeLa cells. *Int J Mol Med* 2008; 21:721-730.
 16. Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Apoptosis in pyrogallol-treated Calu-6 cells is correlated with the changes of intracellular GSH levels rather than ROS levels. *Lung Cancer* 2008; 59:301-314.
 17. Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Pyrogallol inhibits the growth of lung cancer Calu-6 cells via caspase-dependent apoptosis. *Chem Biol Interact* 2009; 177:107-114.
 18. Han YH, Park WH. Pyrogallol-induced calf pulmonary arterial endothelial cell death via caspase-dependent apoptosis and GSH depletion. *Food Chem Toxicol* 2010; 48:558-563.
 19. Saeki K, Hayakawa S, Isemura M, Miyase T. Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. *Phytochemistry* 2000; 53:391-394.
 20. Mancini E, Beglinger C, Drewe J, Zanchi D, Lang UE, Borgwardt S. Green tea effects on cognition, mood and human brain function: a systematic review. *Phytomedicine* 2017; 34:26-37.
 21. Association WM. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 2013; 310:2191-2194.
 22. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:3671-3675.
 23. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1):1-16.
 24. Thushara RM, Hemshekhar M, Kemparaju K, Rangappa KS, Devaraja S, Girish KS. Therapeutic drug-induced platelet apoptosis: an overlooked issue in pharmacotoxicology. *Arch Toxicol* 2014; 88:185-198.
 25. Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death Dis* 2014; 5:e1526.
 26. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis* 2002; 7:433-440.
 27. Thushara RM, Hemshekhar M, Santhosh MS, Devaraja S, Kemparaju K, Girish KS. Differential action of phytochemicals on platelet apoptosis: a biological overview. *Curr Med Chem* 2013; 20:1018-1027.
 28. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, Wu Q, Zhang J, Hong Y. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 2014; 10:1072-1083.
 29. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res* 2005; 65:8049-8056.
 30. Mitsuhashi S, Saito A, Nakajima N, Shima H, Ubukata M. Pyrogallol structure in polyphenols is involved in apoptosis-induction on HEK293T and K562 cells. *Molecules* 2008; 13:2998-3006.
 31. Kumaran MS, Dabass G, Kapadia AB, Parsad D. Resveratrol-induced thrombocytopenia: Inadvertent side-effect of a commonly used antioxidant. *Dermatologic Therapy [letter]* 2017; 31:2.
 32. Lin KH, Hsiao G, Shih CM, Chou DS, Sheu JR. Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis. *Cardiovasc Res* 2009; 83:575-585.
 33. Lannan KL, Refaai MA, Ture SK, Morrell CN, Blumberg N, Phipps RP, Spinelli SL. Resveratrol preserves the function of human platelets stored for transfusion. *Br J Haematol* 2016; 172:794-806.
 34. Sharma K, Ko EY, Assefa AD, Ha S, Nile SH, Lee ET, Park SW. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *J Food Drug Anal* 2015; 23:243-252.
 35. Wang S, Hwang H, Yoon S, Choe E. Temperature dependence of autoxidation of perilla oil and tocopherol degradation. *J Food Sci* 2010; 75:C498-505.