

# **Introducción**

## **Plantas medicinales**

En todas las culturas el uso de plantas por sus propiedades medicinales es de gran importancia y su utilización se remonta al momento cuando aparece el hombre en la tierra. En las poblaciones rurales e indígenas es el principal recurso a explotar y es usada por el 80% de la población, confirmado por la organización mundial de la salud (WHO) (Kong y col., 2003; Agra y col., 2007, 2008).

Son diversas las formas de preparar medicinas caseras a base de plantas, entre las cuales se pueden mencionar las decocciones, infusiones, inhalaciones, ungüentos y tinturas, que son uno de los pasos críticos para la efectividad de las plantas como remedio, siendo el otro la parte de la planta empleada en la preparación de la medicina. Las plantas presentan compuestos que pueden ser o no benéficos para los humanos dependiendo de cómo se prepare y qué parte se utilice, pudiendo tener un efecto dañino o no en el metabolismo de los humanos (Hans-Walter y Birgit, 2011).

Muchos de los componentes dañinos para el hombre se descomponen en el proceso de elaboración del medicamento al ser aislados del tejido de la planta utilizado, sin embargo, otros tantos no son destruidos y a altas concentraciones podrían ejercer un efecto nocivo en el metabolismo del hombre, aunque bajas concentraciones de estos compuestos podrían proveer protección contra alguna enfermedad, pudiendo ser usados estos componentes como fármacos (Hans-Walter y Birgit, 2011).

Las plantas medicinales se encuentran disponibles en el ambiente en que viven los humanos y de forma abundante, por lo que existen tantas variantes de medicina tradicional como culturas y muchas de las recetas para curar diferentes enfermedades son transmitidas verbalmente

de generación en generación e incluso son tomadas por poblaciones de zonas urbanas a pesar de tener estas más accesibilidad a la medicina moderna, porque son una vía rápida para afrontar alguna dolencia, puesto que son menos costosas y más “amigables” al organismo. El mantenimiento, clasificación y estudios científicos de estos conocimientos populares son de gran importancia ya que, permiten encontrar nuevos componentes farmacológicamente útiles para la industria y medicina moderna, los cuales podrían ayudar a mejorar la calidad de vida de las poblaciones (Shultes y Raffauf, 2009; Bhattarai y col., 2010).

La riqueza en biodiversidad de plantas en el trópico está altamente relacionada con el uso medicinal que reportan las comunidades de estas zonas y muchas de las acciones terapéuticas se deben a su composición fitoquímica y la actividad biológica de sus componentes. La etnobotánica y la etnofarmacología son algunas de las ciencias encargadas de recopilar la información de las plantas y sus usos populares (Lizcano y col., 2010; Cadena-González y col., 2013).

En los últimos 15 años, han estado progresando los estudios químicos y farmacológicos de las plantas medicinales con los cuales se ha logrado la obtención y la identificación de nuevos compuestos con propiedades terapéuticas. Un trabajo publicado por Newman y colaboradores en el 2000, indica que, 119 sustancias químicas, que derivan de 90 especies de plantas han sido consideradas como drogas importantes y son usadas en muchos países tales como China, Grecia, India, Irán, Afganistán, Egipto, Francia, Alemania, Inglaterra, España entre otros. El 74% de estas sustancias fueron descubiertas mediante estudios químicos realizados sobre los compuestos activos aislados a partir de las plantas usadas en la medicina tradicional (Newman y col., 2000).

Para el año 2003, se estimó que de las 250.000 a 350.000 especies de plantas identificadas, 35.000 son usadas por el 80% de la población mundial para propósitos medicinales debido a su efectividad para tratar un amplio espectro de enfermedades (Kong y col., 2003; Kunle

y col., 2012). Estas propiedades medicinales de las plantas se deben a que ellas producen metabolitos primarios o secundarios que cumplen funciones ecológicas específicas que las afectan a ellas o a otros organismos (Hans-Walter y Birgit, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, de las plantas se han aislados una variedad de compuestos con diferentes acciones médicas sobre diversos sistemas del cuerpo humano, algunos de estos son usados actualmente por la medicina moderna (Tabla 1). Entre estos sistemas afectados por plantas se encuentra el hemostático, que según la sabiduría popular y los reportes científicos puede ser alterado por componentes aislados de hojas, corteza, flores, raíces y látex de diversas familias de plantas como las Zingiberaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Paeoniaceae, Moraceae y Fabaceae, agrupando esta última familia, el género de la especie utilizada en este estudio (Rajesh y col, 2006; Gilani y col., 2008; Koo y col., 2010; Dong y col, 2014; Shih y col, 2014; Omana y Maheshwari, 2014).

### ***Brownea macrophylla***

Es la especie de planta empleada en este trabajo y taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera: Clase Equisetopsida, Subclase Magnoliidae, Superorden Rosanae, Orden Fabales, Familia Fabaceae, Subfamilia Caesalpinoide, Género *Brownea* (Missouri Botanical Garden, 2014).

El género *Brownea* posee 54 especies, las cuales son árboles de 3 a 20 metros de altura con tronco delgado y ramificado. Presenta hojas compuestas y alternas generalmente. Inflorescencias en cabezuelas, terminales y/o axiales, cauliflora, flores hermafroditas, de 10 a 500 (carácter diagnóstico), pueden ser blancas, rojas, amarillas o anaranjadas, con 10 a 13 estambres, fruto tipo legumbre de 20 a 25 cm de largo y se distribuye desde el sur de México hasta Perú, incluyendo las Antillas menores, Jamaica y Trinidad y Tobago ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)).

**Tabla 1.** Compuestos bioactivos aislados de plantas y uso clínico (Tomado de Kong y col., 2003).

<b>Droga/Compuesto</b>	<b>Uso clínico</b>	<b>Fuente vegetal</b>
Timol	Antifúngico tópico	<i>Thymus vulgaris</i>
Esteviósido	Edulcorante	<i>Stevia rebaudiana</i>
Teobromina	Diurético, vasodilatador	<i>Theobroma cacao</i>
Topotecan	Anticancerígeno	<i>Camptotheca acuminata</i>
Tetrandrine	Antihipertensivo	<i>Stephania tetrandra</i>
Tricosantina	Abortivo	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
Vasicina	Estimulante cerebral	<i>Vinca minor</i>
Silimarina	Antihepatotóxico	<i>Silybum marianum</i>
Sanguinarina	Inhibidor de placa dental	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Rotenona	Insecticida, Piscicida	<i>Lonchocarpus nicou</i>
Pinitol	Expectorante	<i>Varias plantas</i>
Oubaina	Cardiotónico	<i>Strophanthus gratus</i>
Ácido Nordihidroguairético	Antioxidante	<i>Larrea divaricata</i>
Mentol	Rubefaciente	<i>Mentha species</i>
Nicotina	Insecticida	<i>Nicotiana tabacum</i>
Papaína	Proteolítico, mucolítico	<i>Carica papaya</i>
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
$\alpha$ -Lobelina	Estimulante respiratorio	<i>Lobelia inflata</i>
Kawaina	Tranquilizante	<i>Piper methysticum</i>
Hidrastina	Hemostático, Astringente	<i>Hydrastis canadensis</i>
Senosidos A,B	Laxante	<i>Cassia species</i>
$\alpha$ -Tetrahidrocannabinol (THC)	Antiemético, disminuye tensión ocular	<i>Cannabis sativa</i>
Cuanidina	Antiarrítmico	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Fisostigmina	Inhibidor de colinesterasa	<i>Physostigma venenosum</i>
Glasiovina	Antidepresivo	<i>Ocotea glaziovii</i>
L-Dopa	Antiparkinsonismo	<i>Mucuna sp</i>
Cocaína	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i>
Cis-sampelina	Relajante de musculo esquelético	<i>Cissampelos pareira</i>
(+)-Catequina	Hemostático	<i>Potentilla fragarioides</i>
Cafeína	Estimulante del sistema nervioso central	<i>Camellia sinensis</i>
Bromelaina	Antiinflamatorio, Proteolítico	<i>Ananas comosus</i>
Ajmalicina	Desórdenes circulatorios	<i>Rauvolfia serpentina</i>

En Venezuela se han descrito 10 especies del genero *Brownea*: *B. ariza*, *B. birschelli*, *B. coccinea*, *B. gladisrojasiae*, *B. grandiceps*, *B. leucantha*, *B. longipedicellata*, *B. simillisal*, *B.*

*tillettiana* y *B. macrophylla*, la especie objeto de estudio en este trabajo. Todas son conocidas comúnmente como Rosa de montaña o Rosa de Venezuela.

*Brownea macrophylla* tiene una amplia distribución en el territorio venezolano: Apure, Barinas, Carabobo, Falcón, Lara, Mérida, Miranda, Táchira, Yaracuy, Zulia (<http://www.tropicos.org/>). Esta planta es nativa de bosques lluviosos, siendo un árbol de 3 a 8 metros de alto, con tronco corto, ramificado cerca de la base y más o menos torcido, madera con albura de color claro y corazón oscuro, copa frondosa en forma de paraguas. Hojas compuestas, paripinnadas, con 7 a 11 pares de folíolos oblongo-lanceolados, de 30 cm de largo por 7 cm de ancho, los inferiores subalternos y los superiores opuestos. Raquis de 20 a 40 cm de largo. Las hojas cuando son tiernas forman masas marrón-rojizas en los extremos de las ramas, luego con la edad se tornan verdes y erectas (Figura 1).

Las flores se agrupan en inflorescencias vistosas, densas, apretadas, entre 300 a 500 flores de color rojo encendido nacen en los troncos y ramas importantes (Figuras 2). Brácteas con tegumento grisáceo. Sépalos 4 y pétalos 5; estambres 11, muy largos, unidos en la base formando un tubo de aproximadamente 8 cm de largo. Flores presentes de febrero a mayo. Fruto tipo legumbre, alargada, reticulada, de color marrón. 24 cm de largo por 5 cm de ancho (Hoyos, 1992).

En la medicina tradicional venezolana, las flores de *Brownea macrophylla* son usadas en forma de infusión para detener el sangrado menstrual excesivo que presentan algunas mujeres en edad reproductiva, dicho trastorno se denomina menorragia, el cual se caracteriza por un sangrado mayor a 100 mL por ciclo o una pérdida de sangre por un tiempo mayor a 7 días continuos. Recientemente se confirmó científicamente que el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* altera el sistema hemostático y se demostró que este extracto presenta un componente que inhibe a la plasmina, enzima que se encuentra exacerbada en mujeres con

menorragia, lo que permitió concluir que el compuesto antiplasmina presente en el extracto podría ser el responsable de regular la pérdida de sangre excesiva (Pereira, 2011).



**Figura 1.** Morfología foliar. Hojas tiernas (A) y maduras (B) de *Brownea macrophylla*. (Tomado por Pereira 2011).

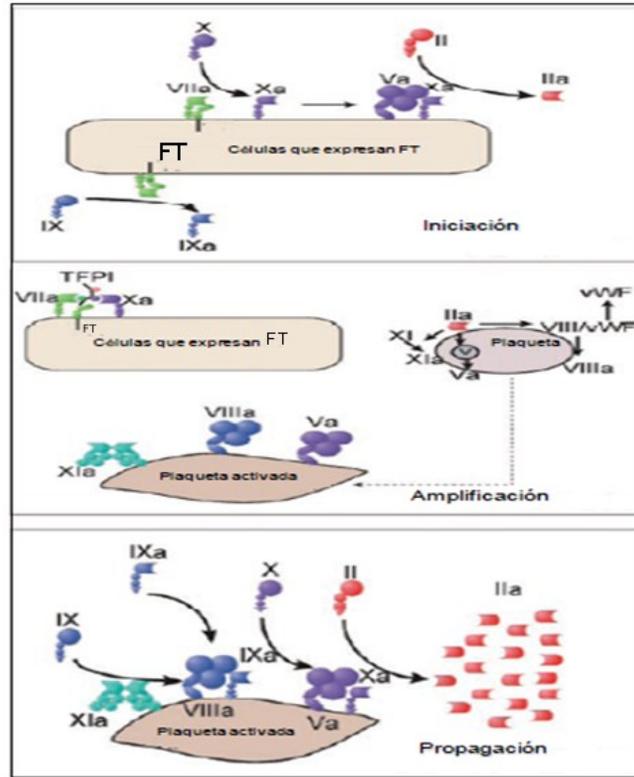


**Figura 2.** Inflorescencia (A) y flor (B) de *Brownea macrophylla* (Tomado por Pereira 2011)

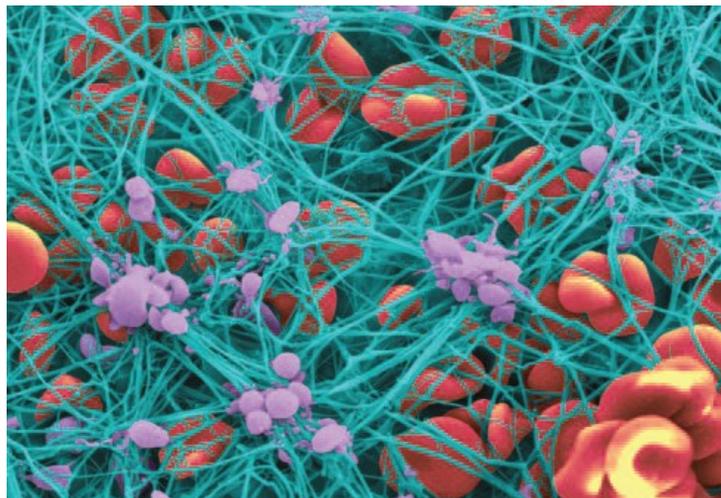
## **Hemostasia: Generalidades**

El sistema hemostático es el responsable de mantener el flujo adecuado de la sangre a través de los vasos, garantizando que el oxígeno y los nutrientes lleguen a los tejidos, este sistema inicia su función con la interrupción del continuo de venas y vasos por una lesión vascular donde son liberados diversos factores, produciendo una constricción de la pared vascular, disminuyendo el flujo de sangre en el vaso lesionado, simultáneamente ocurre la activación, adhesión y agregación de las plaquetas circulantes al tejido subendotelial expuesto, que en conjunto con la activación de las proteínas de la coagulación forman complejos estructurales en la superficie de las membranas de las plaquetas formando un coágulo o tapón y una vez que el coágulo formado cumple su función es el sistema fibrinolítico el encargado de su remoción, en situaciones donde se altera alguno de estos componentes (sistema vascular, plaquetas, sistema de la coagulación y fibrinolítico), el equilibrio hemostático se compromete, lo que puede desencadenar episodios hemorrágicos o trombóticos (Palomo y col., 2005; Kenneth y col., 2010; Levy y col., 2012). Este trabajo se concentrará en el fibrinógeno que es el sustrato central del sistema de la coagulación y objeto de estudio en esta investigación.

La coagulación (Figura 3 y 4) es un proceso complejo, multifactorial y dinámico que involucra la continua conversión de proenzimas a sus formas activas, para lograr la generación de la trombina, la cual finalmente transforma el fibrinógeno, proteína soluble del plasma, en un gel de fibrina, que junto con el tapón plaquetario y otros elementos de la sangre conforman el tapón hemostático definitivo o coágulo (Kenneth y col., 2010).



**Figura 3.** Modelo celular de la coagulación. Se divide en tres fases, iniciación: en la superficie de las células que expresan factor tisular (FT) se forma el complejo FXa/FVa generando trazas de trombina (FIIa), donde en la etapa de amplificación se activan las plaquetas estimulando así la liberación de factor Va al exterior celular para que en la fase de propagación se genere grandes cantidades de trombina que transforman el fibrinógeno en fibrina (Tomado de Pereira, 2011).



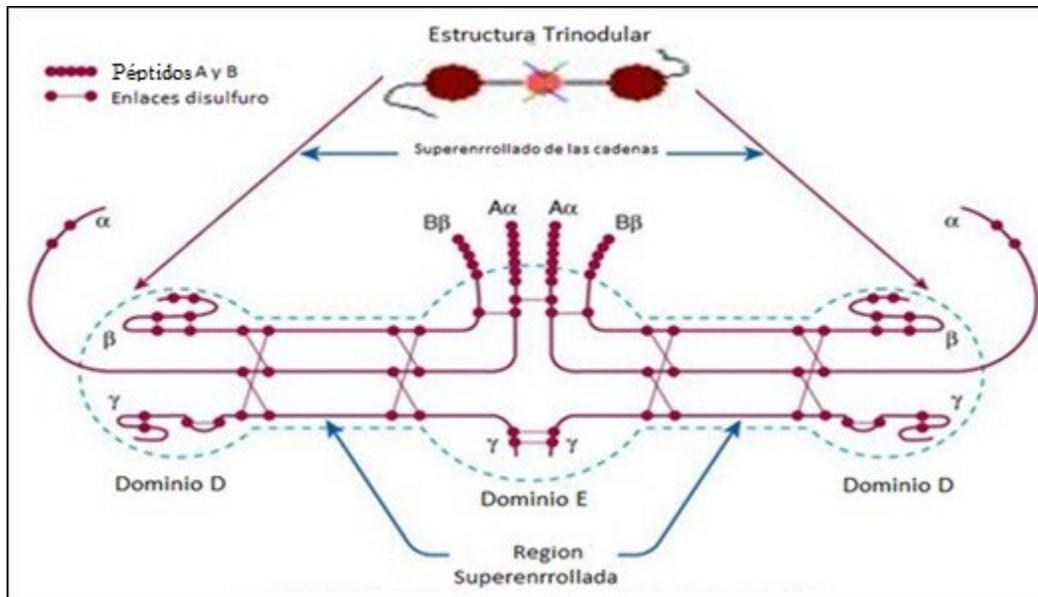
**Figura 4.** Coágulo de fibrina. Células de la sangre en rojo, fibras de fibrina en azul y agregados de plaquetas en morado (Tomado de Levy y col., 2012).

## **Fibrinógeno**

El fibrinógeno es una glucoproteína plasmática sintetizada en el hígado. En el humano tiene un peso molecular de 340 kDa, se encuentra en un rango de concentración de 1,5 a 4,0 g/L y tiene un tiempo de vida media aproximado de 4 días (Palomo y col., 2005).

Esta glucoproteína tiene una estructura simétrica formada por tres pares de cadenas polipeptídicas distintas denominadas A $\alpha$  (66,5 kDa), B $\beta$  (52 kDa) y  $\gamma$  (46,5 kDa), organizadas en dos mitades idénticas y unidas por 29 enlaces disulfuro. Este dímero está compuesto por dos dominios D externos y un dominio E que es el nódulo central de la proteína (Figura 5). Las cadenas polipeptídicas son codificadas por 3 genes de aproximadamente 50 kilobases en humanos, FGA, FGB y FGG en el cromosoma 4, las cadenas resultantes tienen 610 (A $\alpha$ ), 461 (B $\beta$ ), 411 ( $\gamma$ ) aminoácidos respectivamente. Entre las modificaciones postraduccionales que sufre la molécula para su maduración están fosforilación, hidroxilación, sulfatación y unión de oligosacáridos (Palomo y col., 2005; Tennent y col., 2007; Kenneth y col., 2010; Levy y col., 2012).

El fibrinógeno no solo cumple la función precursora para la formación de fibrina, fisiológicamente participa en la agregación plaquetaria enlazándose a receptores glucoprotéicos presentes en las superficies plaquetarias, actuando como una molécula de unión. En la angiogénesis, se une a componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, glucoaminoglucanos, péptidos de factores de crecimiento, entre otros (Kenneth y col., 2010). También se ha descrito que el fibrinógeno en diversas células epiteliales como células de carcinoma cervical, trofoblastos y granulocitos, es utilizado para reparar el tejido que ha sufrido lesiones y en los estados inflamatorios actúa como mediador de la interacción célula-matriz, aumentando su concentración (Tennent y col., 2007).



**Figura 5.** Estructura del fibrinógeno. Distribución de las cadenas polipeptídicas en los dominios que conforman al fibrinógeno mostrando los puentes disulfuro ([tomado de [http://quizlet.com/13738722/bcc\\_hemostasis-pretest-01-study-flash-cards/\(5/8/14\)](http://quizlet.com/13738722/bcc_hemostasis-pretest-01-study-flash-cards/(5/8/14)) Modificado por el autor]).

### Degradación del fibrinógeno por proteasas que intervienen en la coagulación y la fibrinólisis

Cuando se produce una lesión vascular se inicia el proceso de hemostasia, es decir, se activan diversos mecanismos reparadores que conllevan la formación de un trombo, el cual está constituido esencialmente por fibrina y plaquetas. La fibrina es un biopolímero que se forma en la fase final de la coagulación, luego que su precursor el fibrinógeno, es activado (cortado) por la trombina, siendo la formación del coágulo un evento importante para detener la extravasación de la sangre (Figura 3 y 4) (Palomo y col., 2005).

La trombina es una serino proteasa de 33,7 kDa, conformada por dos cadenas polipeptídicas A y B de 36 y 259 residuos respectivamente, unidos por un enlace disulfuro. En la cadena B se encuentra el sitio catalítico o funcional de la enzima (residuos His, Asp y Ser), típico de las serino proteasas (Di Cera y col., 1997; Palomo y col., 2005).

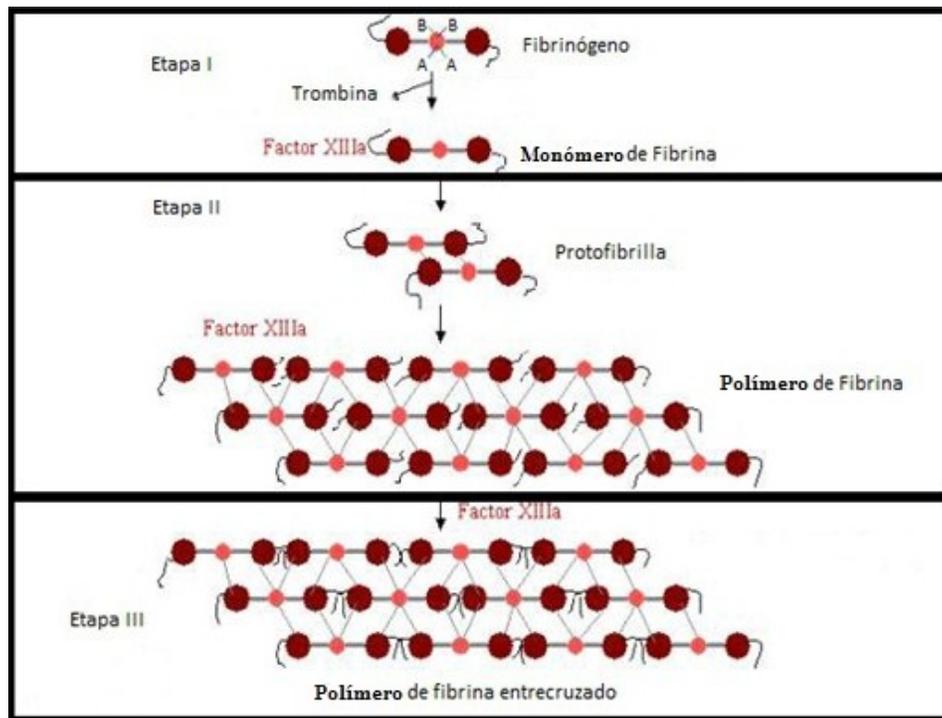
La conversión de fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina puede ser desglosada en tres etapas (Figura 6). La primera etapa, ocurre cuando la enzima trombina escinde los enlaces Arg16-Gly17 en las cadenas A $\alpha$  y Arg14-Gly15 en las B $\beta$ , liberando dos fibrinopéptidos, a los cuales se les denomina FpA (16 aminoácidos del extremo aminoterminal de las cadenas A $\alpha$ ) y FpB (14 aminoácidos del extremo aminoterminal de las cadenas B $\beta$ ), dejando al monómero de fibrina (Marchi, 2012).

La segunda etapa, inicia simultánea a la remoción de FpA y FpB, el cual deja expuestos en los dominios E centrales, los sitios de unión con otros monómeros de fibrina en su sitio complementario en la cadena  $\gamma$  presente en la región D de un monómero adyacente, mediante interacciones no covalentes tipo puentes de hidrógenos, formando así la unidad básica estructural de la malla de fibrina, la protofibrilla. La tercera etapa, se da por el crecimiento lateral y longitudinal de la malla al producirse interacciones en las regiones D-D de una protofibrilla y otra (Levy y col., 2012).

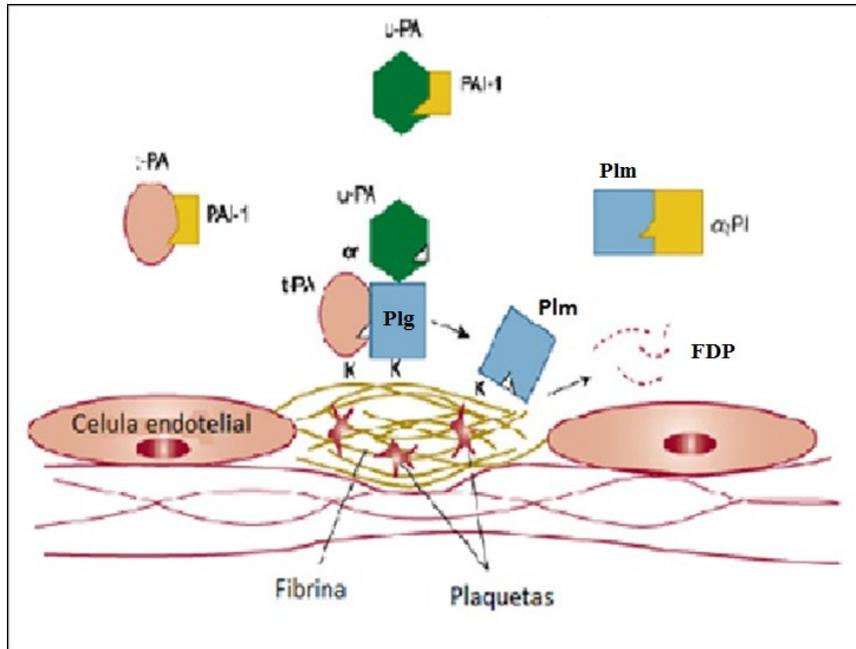
Estos polímeros de fibrina formados pueden disolverse con facilidad por acción del flujo sanguíneo o por otras proteasas como la plasmina, sin embargo, la estructura de la malla es estabilizada por la acción de una transglutaminasa o Factor XIIIa, la cual une de forma covalente las cadenas  $\gamma$  y  $\alpha$  desde el momento en que se liberan los monómeros y comienzan a formarse las protofibrillas y durante todo el proceso de polimerización, otorgando resistencia a las rupturas mecánicas y a la acción de la plasmina conformando así, el polímero entrecruzado de fibrina insoluble (Levy y col., 2012).

Fisiológicamente el fibrinógeno también puede sufrir degradación proteolítica por la serino proteasa plasmina, dando lugar a la formación de una serie de productos de diferentes pesos moleculares que pierden su función coagulante y no forman monómeros de fibrina o interrumpen la polimerización normal del coágulo definitivo (Marchi, 2012).

La plasmina (Plm) es la enzima central del sistema fibrinolítico (Figura 7), la cual circula en sangre en su forma inactiva denominada plasminógeno (Plg), es una glucoproteína de una sola cadena sintetizada en el hígado con una concentración plasmática de 20 mg/dL, un peso molecular en el humano de 92 kDa y un tiempo de vida media de 2,2 días. La transformación de Plg a Plm es mediada por t-PA (activador de plasminógeno tipo tisular) o UK (activador tipo uroquinasa) al cortar el enlace Arg561-Val562 en el Plg (Palomo y col., 2005; Kenneth y col., 2010).

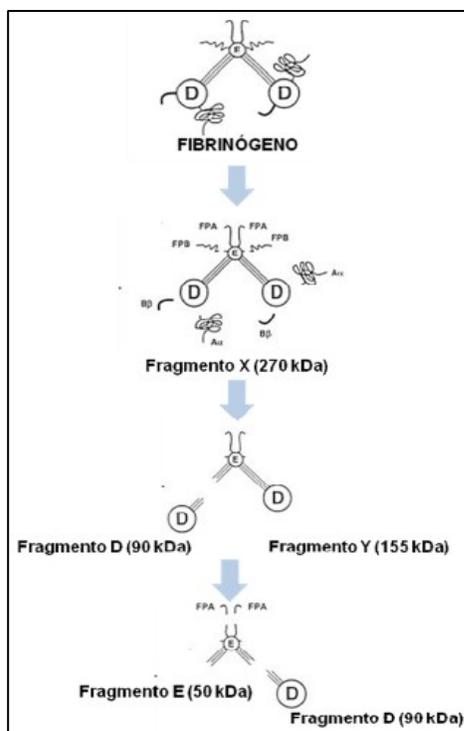


**Figura 6.** Polimerización y estabilización de los monómeros de fibrina en la formación de la malla insoluble de fibrina [Tomada de [http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006\\_11/Page1.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm) modificado por el autor (5/8/14)].



**Figura 7.** Sistema fibrinolítico. Luego de que los activadores del plasminógeno (t-PA y u-PA) cortan al plasminógeno (Plg) para formar a la plasmina (Plm), esta actúa sobre la malla de fibrina formando productos de degradación de fibrina (FDP) removiendo el coágulo (Tomado de Kenneth y col., 2010 modificado por el autor).

Cuando la Plm degrada al fibrinógeno libera fracciones de los extremos C terminal en los dominios D y N terminal de las cadenas  $A\alpha$  y simultáneamente escinde las regiones N terminales de las cadenas  $B\beta$  obteniendo el fragmento X, luego el ataque a la región  $\alpha$ -helicoidal degradando a las tres cadenas que unen el dominio D y E, dejando un dominio D libre y un binódulo E-D, denominado fragmento Y, el cual puede ser escindido de nuevo dejando los fragmentos D y E separados (Figura 8) (Kenneth y col., 2010). Estos fragmentos interrumpen la polimerización de fibrina, por lo que se podría producir una hemorragia. Estos productos de degradación de fibrinógeno son metabolizados por el hígado y secretados por los riñones (Palomo y col., 2005).



**Figura 8.** Acción de plasmina sobre el fibrinógeno formando los fragmentos de degradación (Tomado de Cesarman-Maus y Hajjar, 2005 modificado por Pereira 2011).

### **Degradación del fibrinógeno por compuestos externos**

A partir de bacterias, hongos, vertebrados, invertebrados, algas y plantas superiores se han aislado componentes con efecto sobre el fibrinógeno. Estos compuestos han sido estudiados bioquímica y farmacológicamente a fin de establecer sus mecanismos de acción. Dichos componentes pueden presentar similitud en su composición y/o peso molecular.

De invertebrados y de vertebrados se han aislado compuestos tanto con capacidad de degradar a la molécula del fibrinógeno, los cuales fueron denominados fibrinogenasas (Michel y col., 2004; Bernardes y col., 2008; Siritapetawee y col., 2012; Brazón y col., 2013). Estas enzimas tienen acción distinta a las proteasas fisiológicas plasmina y trombina generando fragmentos incoagulables (Markland y col., 1991, 1998).

Las fibrinogenasas, se han clasificado en dos grupos dependiendo de cuál de las cadenas del fibrinógeno es degradada. Las  $\alpha$ -fibrinogenasa, en general son metalo proteasas con pesos moleculares entre 21 y 58 kDa, que degradan preferencialmente las cadenas A $\alpha$  del fibrinógeno y si se incrementa el tiempo de incubación pueden actuar sobre las cadenas B $\beta$  y/o  $\gamma$ . Las  $\beta$ -fibrinogenasa, la mayoría son serino proteasas con pesos moleculares entre 23 y 33 kDa, que degradan principalmente las cadenas B $\beta$  y más lentamente pueden degradar las cadenas A $\alpha$  y/o  $\gamma$ . Hasta el presente no se han aislado enzimas fibrinogenolíticas capaces de degradar principalmente las cadenas  $\gamma$  del fibrinógeno (Markland, 1998; Swenson, 2005; Brazón y col., 2013).

Hasta la fecha se han descrito y caracterizado fibrinogenasas de distintos organismos, como las descritas en la siguiente tabla (Tabla 2).

**Tabla 2.** Fibrinogenas aisladas y caracterizadas de otros organismos.

Reino	Especie	Cadena afectada	Tipo de actividad	Masa molecular (kDa)	pH y temperatura óptimo	Referencia
Bacteria	<i>Chryseobacterium sp.</i>	$\alpha, \beta$	-	24	-	Lijnen y col. (2000)
	<i>Bacillus sp.</i>	$\alpha, \beta$	-	32,3	7,4 y 37 °C	Mukherjee y col. (2012)
	<i>Lonomia obliqua</i>	$\alpha, \beta$	-	-	-	Michael y col. (2004)
Animal	<i>Bothrops moojeni</i>	$\alpha, \beta$	Metalo proteasa	-	-	Bernardes y col. (2008)
	<i>Tityus discrepans</i>	$\alpha, \beta$	-	-	-	Brazon y col. (2013)
Fungi	<i>Armillaria mellea</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Metalo proteasa	21	6,0 y 33 °C	Lee y col. (2005)
	<i>Cordyceps militaris</i>	$\alpha, \gamma$	Serino proteasa	52	7,4 y 37 °C	Kim y col. (2006)
	<i>Hericium erinaceum</i>	$\alpha, \gamma$	Metalo proteasa	51	7,0 y 30 °C	Choi y col., 2013
Algae	<i>Codium latum</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Serino proteasa	23	pH 10,0	Matsubara y col., 1999
	<i>Undaria pinnatifida</i>	$\alpha, \beta$	Serino proteasa	50	70 °C	Choi y col., 2014a
	<i>Ulva pertusa</i>	$\alpha, \beta$	Serino proteasa	-	7,0 y 40 °C	Kang y col., 2015
	<i>Calotropis gigantea</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Cisteino proteasa	-	-	Rajesh y col. (2005)
Plantae	<i>Synadenium grantii</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Serino proteasa	34,4	-	Costa y col. (2010)
	<i>Moringa oleifera</i>	$\alpha, \beta$	-	-	-	Satish y col. (2011)
	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Serino proteasa	48	8,0 y 60 °C	Siritapetawee y col. (2012)
	<i>Euphorbia hirta</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Serino proteasa	34	7,2 y 50 °C	Patel y col. (2012)
	<i>Cryptostegia grandiflora</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Cisteino proteasa	-	-	Viana y col. (2013)
	<i>Aster yomena</i>	$\alpha, \gamma$	Metalo proteasa	50	50 °C	Choi y col. (2014b)
	<i>Cnidioscolus urens</i>	$\alpha, \beta, \gamma$	Cisteino proteasa	-	5,0 y 60 °C	Yamara y col. (2014)

## Antecedentes

A pesar del vasto uso de las plantas, se estima que solo 5% de ellas han sido estudiadas científicamente, comprobando el efecto medicinal de la mayoría. En Venezuela y otros países suramericanos confían en las propiedades curativas de las plantas del género *Brownea* ya que las flores, hojas y corteza de algunas especies de este género son empleadas en forma de infusión como remedio casero para el tratamiento del sangrado menstrual excesivo, otros tipos de hemorragias así como para la neutralización de venenos de serpientes. Aunque el conocimiento popular afirma estas cualidades medicinales, solo se ha reportado que *Brownea ariza* (Márquez-Vizcaíno y col., 2007) *Brownea latifolia* (Lans, 2007) *Brownea rosademonte* (Gomes y col., 2010), *Brownea grandiceps* (Pereira y Brazón, 2015) y *Brownea macrophylla* (Pereira, 2011) tienen efecto sobre la hemostasia.

El extracto etanólico de corteza de *Brownea ariza* promueve la coagulación de la sangre, observándose que el extracto acorta el tiempo de coagulación cuando se realizan las pruebas básicas de escrutinio PT (tiempo de protrombina) y PTTa (tiempo de tromboplastina activado). Además, este efecto procoagulante es dosis dependiente (Márquez-Vizcaíno y col., 2007)

En el 2007, Lans reportó que la decocción de flores y hojas de *Brownea latifolia* es capaz de mejorar la fertilidad y controlar la pérdida de sangre menstrual asociado a problemas de infertilidad en mujeres en edad reproductiva (Lans, 2007).

Algunas de las plantas con propiedades sobre el sistema hemostático como *Brownea rosademonte* son utilizadas para neutralizar veneno en casos de mordeduras de serpientes. Extracto acuoso de la corteza de esta planta es capaz de detener los episodios hemorrágicos que presentan personas mordidas por la serpiente *Bothrops atrox* (Gomes y col., 2010).

En los estudios realizados por Pereira (2011) y Pereira y Brazón (2015) empleando el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* y *Brownea grandiceps*, respectivamente, se demostró que ambos extractos poseen actividad procoagulante, anticoagulante, antifibrinolítica, fibronectinasa y fibrinogenolítica, esta última se refiere a la degradación del precursor de la malla de fibrina, el fibrinógeno o factor I de la cascada de coagulación.

Del trabajo de Pereira (2011) surgieron varias interrogantes. ¿Podría la acción del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* sobre el fibrinógeno: 1) interferir con la formación de los monómeros de fibrina y por ende en la polimerización del coágulo; 2) ocasionar que mujeres que toman dicha infusión sean más propensas a episodios hemorrágicos; 3) Hacer que el entramado de fibrina sea más resistente a la acción de los activadores del plasminógeno y con ello, retardar la degradación del coágulo y de esta manera, contribuir a disminuir la pérdida de sangre en mujeres que padecen de menorragia las cuales usan las flores de esta planta en forma de decocción?.

Como una manera de tratar de responder algunas de estas interrogantes en este trabajo se evaluó el efecto del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* sobre el fibrinógeno.

## Objetivos

### General

Aislar y caracterizar los componentes que tienen acción sobre el fibrinógeno presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*

### Específicos

1. Fraccionar el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.
2. Evaluar la actividad fibrinogenolítica de las fracciones obtenidas.
3. Evaluar la actividad fibrinogenolítica de la(s) fracción(es) activa(s) a diferente temperatura y pH.
4. Evaluar el efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad fibrinogenolítica de la(s) fracción(es) activa(s).
5. Evaluar la formación de fibrina a partir de fibrinógeno pretratado con extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.
6. Estimar el peso molecular de los componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.

## Materiales y Métodos

### Colecta y traslado del material vegetal.

Las flores de *B. macrophylla* se obtuvieron de árboles de 3 metros de alto aproximadamente, ubicados en la Posada Mocundo, vía al Pueblo de Aguirre en Montalbán, Estado Carabobo. La zona cuenta con una precipitación promedio anual (ppa) de 1318 mm y una temperatura media anual de 24 °C (Ybarra, 2007).

La recolección fue realizada en el mes de abril de 2011, seleccionando una inflorescencia que contenía 368 flores, de color rojo intenso y en perfecto estado de conservación, sin partes secas ni incompletas. La inflorescencia fue mantenida en recipientes a 4 °C para trasladarlas al Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas donde se procedió a preparar el extracto acuoso floral.

### Obtención del extracto acuoso a partir de las flores.

Para la preparación del extracto acuoso se pesó 160 g de flores de *B. macrophylla* para su decocción en 1,2 L de agua bidestilada a 55 °C por dos horas. Luego, la decocción fue homogenizada en una licuadora y se centrifugó a 27500 g, por 30 min a 4 °C, separando el sobrenadante del sedimento. Este último, se lavó con agua bidestilada a 55 °C y se centrifugó nuevamente manteniendo las condiciones antes mencionadas, este procedimiento se repitió tres veces para garantizar que en el sobrenadante se encontraran todos los componentes acuosos presentes en el homogenizado. Los sobrenadantes obtenidos se juntaron y liofilizaron, después el extracto acuoso seco obtenido fue pesado y almacenado a 4 °C hasta su uso (Pereira, 2011).

## Determinación de masas totales.

Se estimó por espectrofotometría en el equipo Eppendorf BioPhotometer plus, empleando la ley de Lambert y Beer, donde una unidad de absorbancia/cm de longitud de la trayectoria a 280 nm es equivalente a 1 mg/mL de proteína (D'Suze y col., 1996).

## Efecto del extracto acuoso y sus fracciones sobre el fibrinógeno.

Se evaluó mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando el sistema Tris-Tricina (Schägger y Von Jagow 1987). Para tal fin 30  $\mu$ g de fibrinógeno y diferentes cantidades (1; 5; 10; 20 y 30  $\mu$ g) de extracto acuoso se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Luego las muestras fueron sometidas a una corrida electroforética, utilizándose geles al 7,5% en condiciones reductoras para evaluar el efecto sobre las cadenas del fibrinógeno y al 5% bajo condiciones no reductoras para determinar el efecto sobre la molécula del fibrinógeno. Se utilizó un estándar de proteínas (6,5– 200 kDa) de la casa comercial BIO-RAD. Los geles fueron teñidos con azul Coomassie R-250 y decolorados con una solución 30% etanol/7% ácido acético con el fin de eliminar el exceso de colorante. El fibrinógeno utilizado fue de humano grado L de la casa comercial American Diagnostica Inc.

La relación extracto acuoso/fibrinógeno donde se obtuvo la máxima degradación del fibrinógeno se utilizó para evaluar la actividad fibrinogenolítica a diferentes tiempos de incubación (0, 3, 6, 12, 24, 32, 40 y 48 horas) a 37 °C, con el fin de determinar cuándo se inicia y finaliza la degradación del fibrinógeno.

La actividad fibrinogenolítica de las fracciones se evaluó a la relación (20/30) y tiempo de incubación (24 horas) donde hubo mayor degradación de fibrinógeno por el extracto acuoso floral.

Determinación del porcentaje de degradación del fibrinógeno por el programa imagej.

Una vez desteñidos los geles se fotografiaron en el equipo FotoDyne incorporated, donde las imágenes son tomadas usando el programa Foto/Analyst® PC image, las mismas fueron almacenadas en formato JPG para su posterior procesamiento. Con el programa Gimp las imágenes fueron recortadas y clarificadas. Luego, utilizando el programa Imagej se seleccionó la zona donde se encuentran las bandas en el gel para generar las curvas de intensidad de cada banda, después se cuantificó el área bajo la curva de cada banda y a partir del valor obtenido para la banda que corresponde al fibrinógeno control a la cual se le asignó 100% intensidad o 0% de degradación, se calcularon los porcentajes de degradación de los diferentes tratamientos (Pereira y Brazón, 2015).

Fraccionamiento del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.

El extracto acuoso liofilizado (100 mg) se disolvió en 1 mL de buffer acetato de amonio 0,02 M a pH 4,7. Luego se centrifugó a 27500 g a 4 °C por 2 min en una centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417R para clarificar el sobrenadante y eliminar los componentes que no se solubilizan en el buffer. El sobrenadante obtenido se fraccionó en una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (1 x 200 cm) con rango de fraccionamiento entre 1,5 y 30 kDa, usando como buffer de equilibrio y de elución acetato de amonio 0,02 M a pH 4,7. El proceso cromatografico se realizó a 20 °C con una velocidad de flujo de 0,25 mL/min. Se recolectaron fracciones de 9 mL utilizando un colector automático 2070 Ultrorac® II. La detección de los componentes se realizó a 280 nm con un espectrofotómetro SPECTRONIC™ Genesis 2. La fracción que presentó mayor actividad fibrinogenolítica (0,5 mg) fue resuspendida en 1 mL del buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM con NaCl 0,5 M a pH 7,4 suplementado con imidazol 10 mM, luego fue

centrifugada a 27500 g. por 10 segundos a temperatura ambiente para clarificar el sobrenadante y finalmente recromatografiada en una columna de afinidad Zn –IMAC Separopore (1,5 x 1 cm) de la casa comercial bioWorld, usando como buffer enlazante y de equilibrio Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M a pH 7,4 suplementado con imidazol 10 mM. Para eluir el material unido a la columna se utilizó el buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, EDTA 50 mM, pH 7. La corrida cromatográfica se realizó a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min, colectándose fracciones de 0,5 mL. La detección de las fracciones eluidas se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm.

Las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad fueron dializadas en bolsas de diálisis (Spectrapor membrane Tubing) de 0,17 mL/mm con cutoff entre 6 y 8 kDa, para eliminar el exceso de sales, además se ultracentrifugaron con filtros Millopore Microcon, centrifugal filter Devices Microcon YM-3 con retención a partir de 3 kDa, para concentrar las fracciones.

### Efecto de inhibidores de proteasas.

Para tal fin se incubó a 37 °C por 1 hora 20 µg de la fracción con mayor actividad fibrinogenolítica (obtenida de la cromatografía de exclusión molecular) con diferentes inhibidores de proteasas (a las concentraciones mencionadas abajo), luego se incubó la mezcla con 30 µg de fibrinógeno a 37 °C por 24 horas y finalmente se evaluó la actividad fibrinogenolítica.

Los inhibidores utilizados para metalo proteasas fueron: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 10 mM) y fenantrolina (Fenant, 10 mM), para serino proteasas: aprotinina (equi molar con la fracción), benzamidina (10 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 0,1 mM) para

cisteíno proteasas ácido yodoacético (AIA, 0,1 mM) y finalmente para aspartato proteasa pepstatina (1mM).

## Efecto del pH y la temperatura

Se evaluó la actividad fibrinogenolítica a distintos pH (3, 5, 7.4, 8, 10, 12), para esto se incubó 20 µg de la fracción más activa a los pH antes mencionado durante 1 hora a 37 °C, luego se mezcló con 30 µg de fibrinógeno y se incubó la mezcla durante 24 horas a 37 °C.

Por otro lado, para evaluar el efecto de la temperatura se colocó a incubar 20 µg de la fracción más activa a diferentes temperaturas (4; 25; 37; 55; 80 y 100 °C) durante 1 hora, luego se añadió 30 µg de fibrinógeno y la mezcla se incubó por 24 horas a 37°C.

## Estimación de las masas moleculares de los componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.

La estimación del peso molecular de la fracción activa se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular, usando el procedimiento descrito anteriormente para fraccionar el extracto reemplazándose este por proteínas de masas moleculares conocidas y diferentes. Los marcadores usados fueron: albúmina sérica bovina (66,120 kDa);  $\alpha$ -Quimiotripsina (25,6 kDa); citocromo C tipo VI (12,0 kDa); aprotinina (6,5 kDa); glucagón (3,5 kDa); vitamina B12 (1,3 kDa) La elución de estos compuestos permitió realizar una curva de selectividad que relacionó el volumen de elución de los marcadores moleculares con la masa de los mismos de forma logarítmica (Andrews, 1965; Ó'Fágáin y col., 2011). A partir de la ecuación de la recta generada, se calculó la masa de las fracciones activas obtenidas del extracto acuoso floral de *Brownea*

*macrophylla*. También se empleó SDS-PAGE bajo el sistema Tris-Tricina, usando geles en gradiente de 4-20% en condiciones no reductoras para estimar la masa de la fracción activa, los geles fueron teñidos con coloración de plata usando los reactivos y metodología de la casa comercial Biorad.

Formación de la malla de fibrina a partir de fibrinógeno pretratado con extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.

Se emplearon dos metodologías, las cuales se mencionan a continuación:

Tiempo de trombina.

Para la realización de este ensayo inicialmente se obtuvo plasma pobre en plaquetas (PPP) a partir de sangre humana previa autorización del comité de Bioética del IVIC. La sangre fue obtenida por punción venosa en el antebrazo del donante. La sangre fresca fue mezclada con citrato de sodio 3,8% a la relación 9:1, esta mezcla se centrifugó a 6875 g por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante o PPP, el cual se almacenó a -80 °C hasta su uso.

En un tubo de borosilicato (10 x 75 mm) se añadió 0,1 mL de tampón Tris-HCl (0,05 M/ NaCl 0,15 M a pH 7,4) y 0,1 mL de fibrinógeno humano al 0,3% en tampón imidazol salino (imidazol 0,05 M/NaCl 0,85%, pH 7,4) o plasma (PPP), sin tratar o tratado con el extracto o sus fracciones activas (20 µg), se mezcló bien y se incubó a 37 °C por 1 minuto. Posteriormente, se colocó 0,1 mL de trombina/Tris-HCl (2,5 IU/mL) y se midió el tiempo en segundos que tarda el coágulo en formarse, realizándose los ensayos por triplicado (Pereira, 2011).

## Cinética de polimerización

El fibrinógeno sin tratar o pretratado con extracto acuoso a la relación 20/30 (Extracto/fibrinógeno) durante 24 horas a 37 °C, fue incubado a 37 ° C por 10 minutos. Luego se tomó una alícuota (ajustando la concentración a 1 mg/mL con buffer Tris pH 7,4 50 mM y NaCl 150 mM) y se mezcló con 10 µL de cloruro de calcio (1 M) dejándolo reposar por 1 minuto, después se añadió 10 µL de trombina (1 U/mL). A las muestras se les midió la absorbancia a 350 nm durante 2 horas cada 15 segundos en un equipo Genesys 2 spectrophotometer (Spectronic Instruments, Rochester, NYC, EUA). El ensayo se realizó por triplicado (Marchi y col., 2005).

### .- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CARBOHIDRATOS.

En tubos de borosilicato (10 x 75 mm) se colocó 0,5 mL de la fracción S4 (obtenida por la matriz de Sephadex G-50), S4A y S4B (obtenidas por la matriz de Zn-IMAC separopore), sacarosa, albúmina o fibrinógeno al 5%, luego se les añadió 5 gotas de fenol al 4% disuelto en etanol. Los tubos fueron inclinados y se les agregó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se colocaron en baño de María a 100 °C hasta aparecer un anillo rojo-violeta en la interface que indica que la reacción es positiva para carbohidratos (Rendina, 1974).

## Resultados

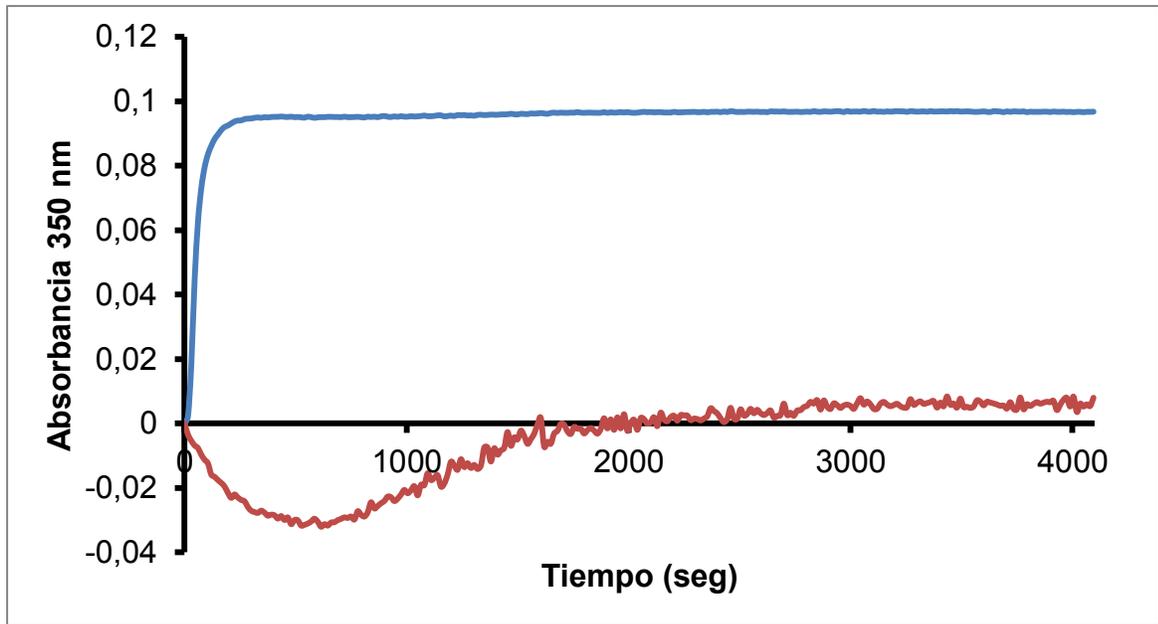
### Efecto del extracto acuoso sobre la formación de la malla de fibrina.

La formación de la malla de fibrina a partir de fibrinógeno pretratado con el extracto se evaluó empleando la prueba de tiempo de trombina (TT) y la cinética de polimerización de fibrina. Con respecto al TT se observó que el fibrinógeno tratado con el extracto (relación 20: 30  $\mu\text{g}$  de extracto/ $\mu\text{g}$  de fibrinógeno) no coaguló, resultado similar se obtuvo al usar plasma humano pobre en plaquetas. Estos resultados fueron corroborados con la cinética de polimerización realizada (Figura 9), ya que el fibrinógeno pretratado con el extracto en presencia de trombina y calcio no produjo cambios significativos en la absorbancia en función del tiempo (Figura 9, curva roja) con respecto al fibrinógeno control no tratado con el extracto (Figura 9, curva azul).

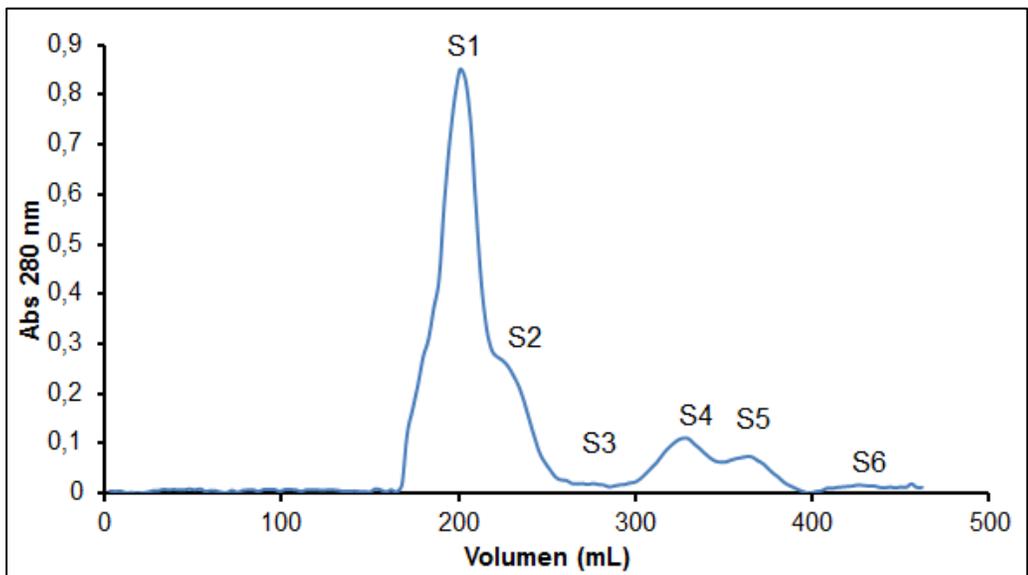
Este ensayo no se realizó con las fracciones porque tienen mayor actividad degradando al fibrinógeno, al estar enriquecidas en compuestos fibrinogenolíticos, por lo que darán resultados similares a la curva del fibrinógeno pretratado con extracto.

### Fraccionamiento del extracto acuoso

Al separar por la columna de exclusión molecular Sephadex G-50 el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* (100 mg/mL), se obtuvieron 6 fracciones, las cuales fueron denominadas S1, S2, S3, S4, S5 y S6 (Figura 10). De estas fracciones S4, S5 y S6 fueron capaces de degradar el fibrinógeno, sin embargo, con la fracción S4 se obtuvo la mayor degradación de la molécula (Figura 16 y 17). La duración de la separación cromatográfica fue de 29,19 horas. Los volúmenes y tiempos de retención de cada fracción se muestran en la Tabla 3.



**Figura 9.** Cinética de polimerización de 30  $\mu\text{g}$  de fibrinógeno pretratado con 20  $\mu\text{g}$  de extracto acuoso (24 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ ). Los cambios de absorbancia a 350 nm fueron registrados en función del tiempo (4000 seg), la curva azul corresponde a fibrinógeno control comercial y la roja a fibrinógeno pretratado con extracto.



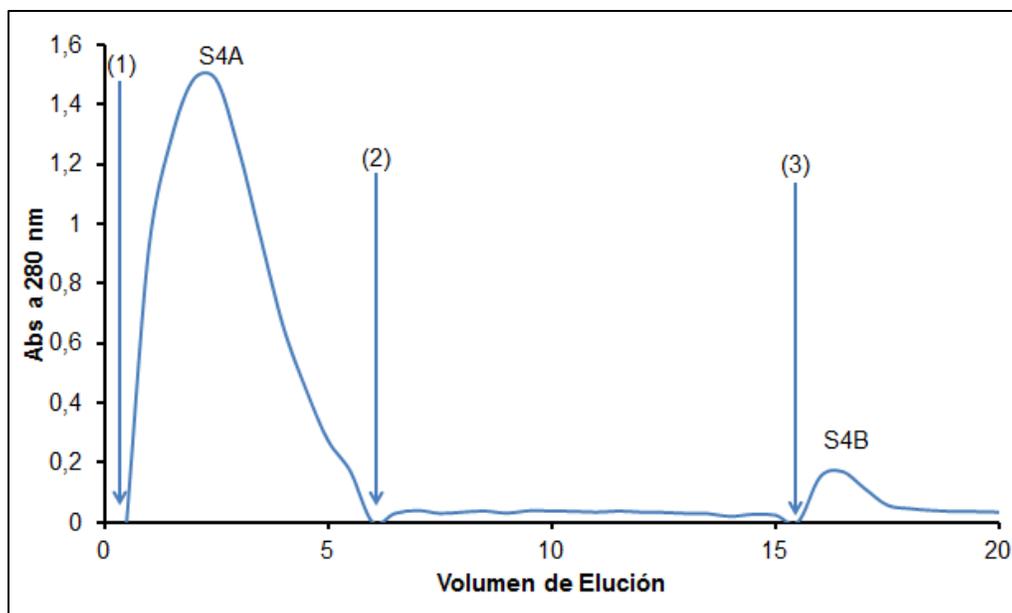
**Figura 10.** Cromatograma del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* (100 mg/ mL). Se empleó una columna exclusión molecular Sephadex G-50 (1 x 200 cm) usando acetato de amonio 0,02 M y pH 4,7 como buffer de elución y de equilibrio. Velocidad de flujo de 0,25 mL/min y detección a 280 nm. Las letras y números sobre los picos representan las fracciones obtenidas.

**Tabla 3.** Fraccionamiento del extracto acuoso por Sephadex G-50. con los volúmenes y tiempos de retención de cada fracción obtenida. El signo (-) ausencia y el signo (+) presencia. El signo (++) más activo.

<b>Fracciones obtenidas</b>	<b>Volumen de retención (mL)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Actividad fibrinogenolítica</b>
S1	201	804	-
S2	222	888	-
S3	270	1080	-
<b>S4</b>	<b>324</b>	<b>1296</b>	<b>++</b>
S5	360	1440	+
S6	438	1752	+

Posteriormente, la fracción S4 fue recromatografiada usando una columna de afinidad Zn – IMAC Separopore, obteniéndose dos fracciones, S4A la cual contiene los componentes que no se unieron a la columna y S4B que agrupa los componentes que se unieron a la columna (Figura 11). La fracción S4A fue la más activa en degradar al fibrinógeno (Figura 16). La Tabla 4 muestra los tiempos y volúmenes de retención de las fracciones obtenidas con la columna de afinidad Zn – IMAC Separopore, la corrida cromatográfica duró 47 minutos.

En la Tabla 5, se resume el proceso de purificación realizado en este trabajo, mostrándose la cantidad de proteína obtenida en cada paso, la actividad total y específica, así como el rendimiento y nivel de pureza del proceso realizado.



**Figura 11.** Cromatograma de la fracción S4 (0,5 mg) mediante cromatografía de afinidad, empleando una columna IMAC-Zn Separopore para separar metalo proteasas por su afinidad a iones metálicos de Zinc. Se utilizó como buffer de equilibrio y enlazante (1) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4 suplementado con imidazol 10 mM) y como buffer de elución (2) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M) y (3) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 10,5 M, imidazol 0,5 M, EDTA 50 mM, pH 7), La velocidad de flujo fue 0,5 mL/min y detección a 280 nm. Se obtuvieron 2 fracciones denominadas S4A y S4B.como se muestra representado por números y letras sobre los picos de mayor absorbancia.

**Tabla 4.** Fraccionamiento de la fracción S4 por una columna IMAC-Zn Separopore mostrando los volúmenes y tiempo de retención de las fracciones obtenidas. El signo (-) ausencia y el signo (+) presencia, el signo (++) más activo.

Fracciones obtenidas	Volumen de retención (mL)	Tiempo de retención (min)	Actividad fibrinogenolítica
S4A	6	12	++
S4B	17,5	35	+

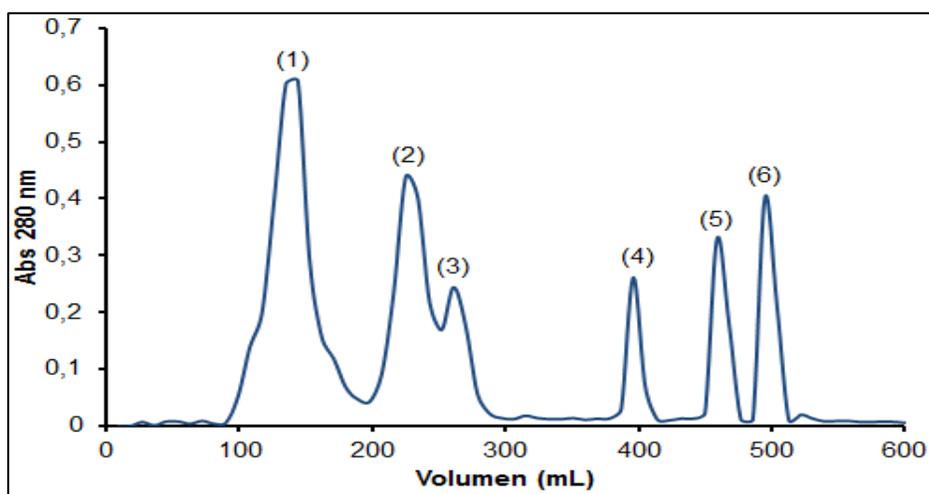
**Tabla 5.** Purificación del componente fibrinogenolítico.

Paso de purificación	Proteínas totales (mg)	Actividad total (UD/minxmL)	Actividad específica (UD/minxmL/mg)	Rendimiento (%)	Pureza
Extracto acuoso	100	0,0045	0,000045	100,0	1,0
S4	0,32	0,0046	0,014375	102,2	319,4
S4A	0,192	0,0044	0,022916	97,8	509,2

El volumen total de extracto acuoso fue 1 mL, para S4 0,1 mL mientras que, el de S4A fue de 0,098 mL. La actividad enzimática total es expresada como la unidad de degradación del fibrinógeno (UD) en función del tiempo en minutos multiplicado por el volumen total de la muestra. La actividad específica se obtiene dividiendo la actividad total entre la cantidad de proteína totales en cada paso. 1 UD es equivalente a 1% de degradación de la molécula de fibrinógeno.

## Estimación de la masa molecular de las fracciones activas.

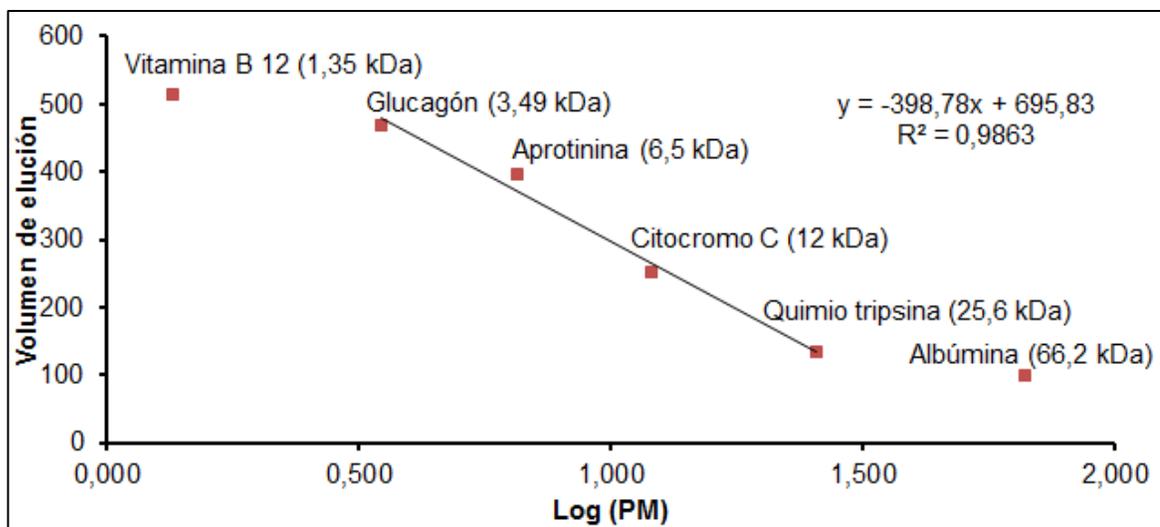
La mezcla de marcadores de masa moleculares fue eluida por la columna de Sephadex G-50 y se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 12. Con los datos de volumen de elución de cada marcador y sus masas moleculares (Tabla 6), se graficó la curva de selectividad (Figura 13) y a partir de esta, se estimaron las masas moleculares de cada fracción obtenida por Sephadex G-50 (Tabla 7).



**Figura 12.** Perfil de elución de la mezcla de compuestos conocidos [(1) Albúmina sérica bovina, (2) Quimiotripsina, (3) Citocromo C, (4) Aprotinina, (5) Glucagón, (6) Vitamina B 12] a través de la columna Sephadex G-50 usando como Buffer de equilibrio y de elución acetato de amonio 0,02 M H 4,7.

**Tabla 6.** Masas moleculares (PM) de los marcadores de usados y sus volúmenes de elución.

Proteína	PM (kDa)	Log(PM)	Volumen elución (mL)
Albúmina	66,2	1,821	99
Quimiotripsina	25,6	1,408	135
Citocromo C	12	1,079	252
Aprotinina	6,5	0,813	396
Glucagón	3,485	0,542	468
Vitamina B-12	1,355	0,132	513

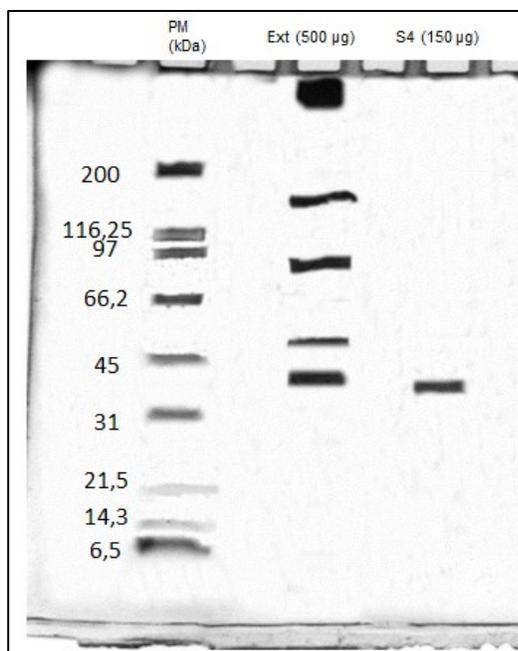


**Figura 13.** Curva de selectividad de los marcadores de masa molecular a través de la columna Sephadex G-50.

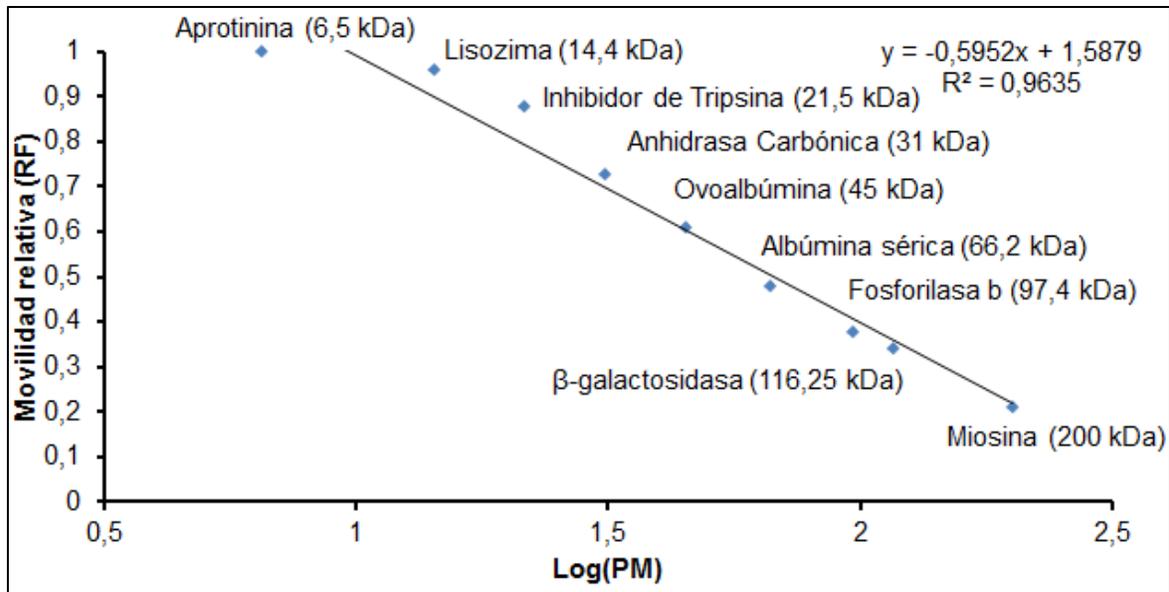
**Tabla 7.** Masas moleculares estimadas de las fracciones obtenidas del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* a través de la columna Sephadex G-50.

Fracciones obtenidas	Volumen elución (mL)	Log (PM)	Masa molecular estimada (kDa)
S1	201	1,241	17,41
S2	219	1,196	15,70
S3	276	1,053	11,29
<b>S4</b>	<b>324</b>	<b>0,932</b>	<b>8,55</b>
S5	360	0,842	6,95
S6	432	0,662	4,59

Por otro lado, tanto al extracto como a la fracción S4, se les estimó la masa molecular mediante SDS-PAGE empleando geles en gradiente de 4 a 20% en condiciones no reductoras (Figura 14). Se observó que el extracto presentó bandas de distintas masas moleculares mientras que, la fracción S4 muestra una única banda entre 31 y 45 kDa. Al medir la movilidad relativa (RF) de las bandas de los marcadores de masa molecular empleado (Figura 15), se pudo estimar la masa molecular de S4, la cual fue de 38,32 kDa.



**Figura 14.** Electroforesis en gel en gradiente de 4 a 20 % en condiciones no reductoras y teñido con plata, PM: Marcador de peso molecular, Ext (extracto 500 µg), S4 (150 µg).



**Figura 15.** Curva de movilidad relativa. Marcadores de masa molecular de la electroforesis en gradiente 4 – 20%.

## Efecto del extracto acuoso y sus fracciones sobre el fibrinógeno.

En la Tabla 8 se puede observar que a partir de la relación 5/30 ( $\mu\text{g}$  de extracto/ $\mu\text{g}$  de fibrinógeno) ocurrió la degradación de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$  del fibrinógeno, sin efecto sobre las cadenas  $\gamma$ . Conforme se aumentó la cantidad de extracto la degradación de todas las cadenas incrementó. Siendo este efecto mayor con las relaciones 20/30 y 30/30, como el porcentaje de degradación de estas relaciones fueron similares entre sí (Tabla 8), se escogió la relación 20/30 para realizar los siguientes ensayos, ya que permite utilizar menor cantidad de extracto.

Cuando se evaluó la actividad fibrinogenolítica del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* sobre el fibrinógeno a diferentes tiempos de incubación empleado la relación 20/30 y temperatura de 37 °C, se observó que la actividad fibrinogenolítica aumentó con el tiempo. A las 3 horas de incubación las primeras cadenas del fibrinógeno en ser degradadas son las  $A\alpha$  y las  $B\beta$ , siendo mayor el efecto sobre las  $A\alpha$ . No hubo degradación significativa sobre las cadenas  $\gamma$  antes de las 24 horas de incubación (Tabla 9). Además, se determinó que a las 24 horas de incubación el extracto degradó el 62 y 32,95% de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$  del fibrinógeno respectivamente (Tabla 9), siendo este tiempo el que se utilizó para todos los ensayos posteriores.

**Tabla 8.** Actividad fibrinogénolítica de diferentes cantidades de extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*.

Muestras	% Degradación A $\alpha$	% Degradación B $\beta$	% Degradación $\gamma$
FgC	0	0	0
1:30	0	0	0
5:30	1,68	0,16	0
10:30	40,13	5,86	0
<b>20:30</b>	<b>62,39</b>	<b>31,98</b>	<b>6,02</b>
30:30	63,35	32,00	6,02

Se observan los porcentajes de degradación de cada subunidad del fibrinógeno según la relación empleada, FgC: fibrinógeno control (30  $\mu$ g), 1:30: 1  $\mu$ g extracto: 30  $\mu$ g fibrinógeno, 5:30: 5  $\mu$ g de extracto: 30  $\mu$ g de fibrinógeno, 10:30: 10  $\mu$ g de extracto : 30  $\mu$ g de fibrinógeno, 20:30 20  $\mu$ g extracto : 30  $\mu$ g de fibrinógeno, 30:30: 30  $\mu$ g extracto : 30  $\mu$ g de fibrinógeno.

**Tabla 9.** Efecto de diferentes tiempo de incubación (0, 3, 6,12, 24, 32, 40,48 h) sobre la actividad fibrinogénolítica del extracto acuoso floral

Tiempo de incubación (horas)	% Degradación A $\alpha$	% Degradación B $\beta$	% Degradación $\gamma$
FgC 48	0	0	0
0	0	0	0
3	17,68	1,16	0
6	25,13	5,86	1,03
12	47,35	18,57	3,42
<b>24</b>	<b>62,01</b>	<b>32,95</b>	<b>5,9</b>
32	85,74	68,53	24,18
40	97,04	87,64	43,52
48	97,98	92,85	61,02

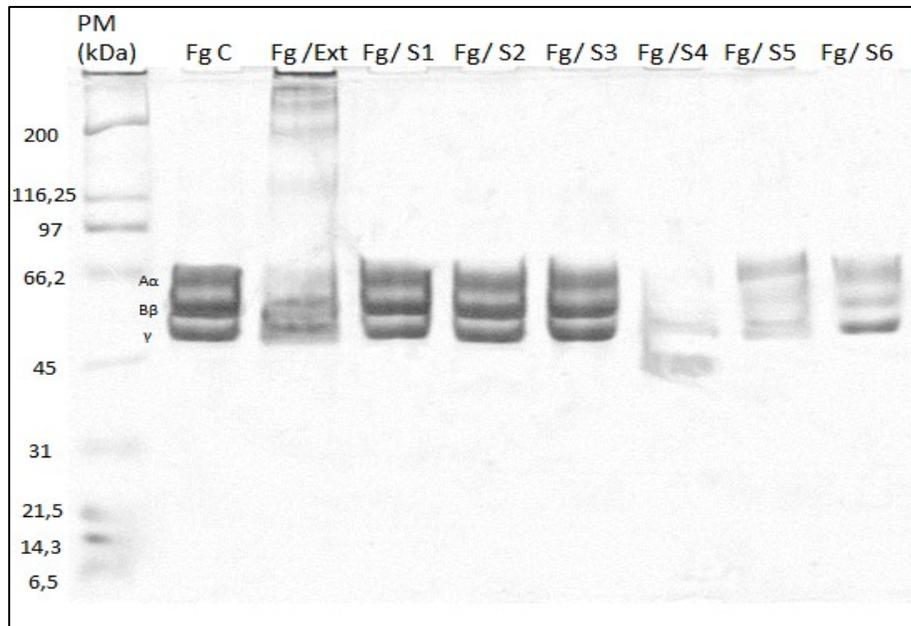
Usando la relación 20  $\mu$ g de extracto:30  $\mu$ g de Fibrinógeno, temperatura de incubación 37 °C. FgC 48: fibrinógeno control incubado 48 horas

Una vez conocida tanto la relación extracto/fibrinógeno (20/30) como el tiempo de incubación (24 h), se procedió a evaluar la actividad fibrinogenolítica de las fracciones obtenidas de la columna Sephadex G-50. En condiciones reductoras que permitió visualizar el efecto sobre los tres pares de cadenas del fibrinógeno (Figuras 14) y bajo condiciones no reductoras donde se apreció el efecto sobre la molécula del fibrinógeno (Figura 15). De las 6 fracciones obtenidas (Figura 10) solo las fracciones S4, S5 y S6 presentaron actividad fibrinogenolítica (Figura 16 y 17).

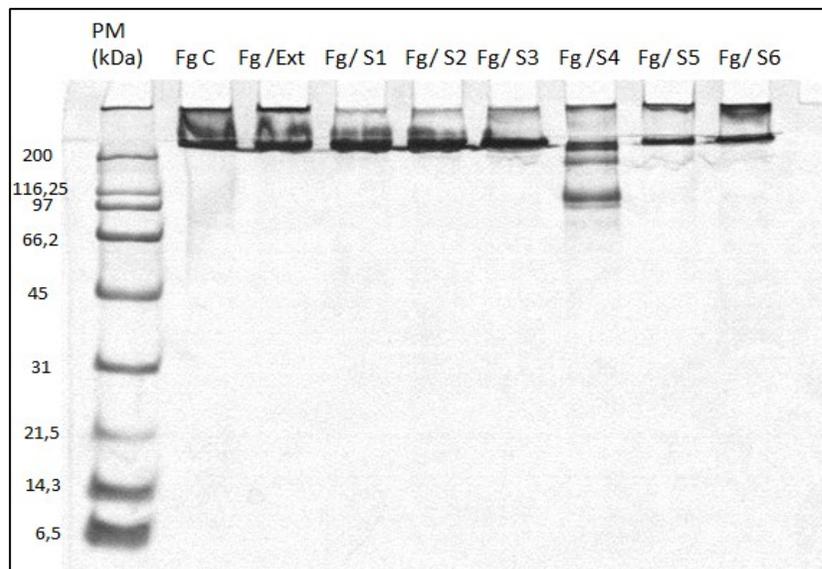
Bajo condiciones reductoras (Figura 16) se observa que el extracto crudo degradó las cadenas A $\alpha$  y parcialmente las B $\beta$  y  $\gamma$ , mientras que, la fracción S4 degradó las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$  y parcialmente las  $\gamma$ . Las fracciones S5 y S6 degradaron parcialmente los tres pares de cadenas. Teniendo S4 mayor efecto sobre todas las cadenas (Figura 16). Las restantes fracciones no tienen efecto sobre el fibrinógeno (Figuras 16 y 17).

Bajo condiciones no reductoras el extracto degradó parcialmente la molécula de fibrinógeno, mientras que, la fracción S4 degradó en mayor proporción dicha molécula, mostrando dos fragmentos de degradación del fibrinógeno uno < 200 kDa y otro de 97 kDa. Las fracciones S5 y S6, degradaron parcialmente el fibrinógeno. El resto de las fracciones (S1, S2, S3) no presentaron actividad fibrinogenolítica (Figura 17).

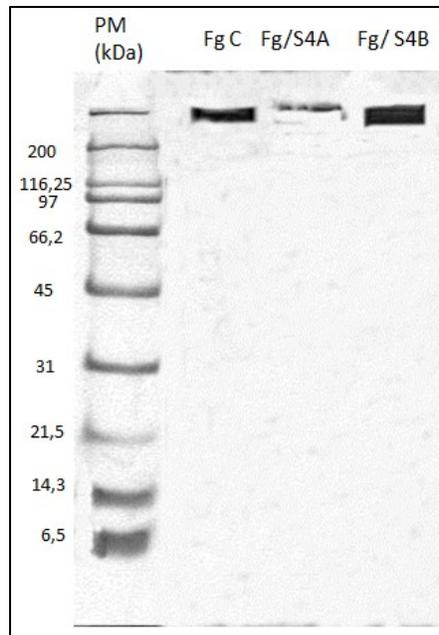
También se evaluó la actividad fibrinogenolítica a las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad, observándose que solo la fracción S4A degradó al fibrinógeno (Figura 18). En cuanto a la degradación de las cadenas de fibrinógeno la fracción S4A se comportó de forma similar a como lo hace la fracción S4 (Figura 19).



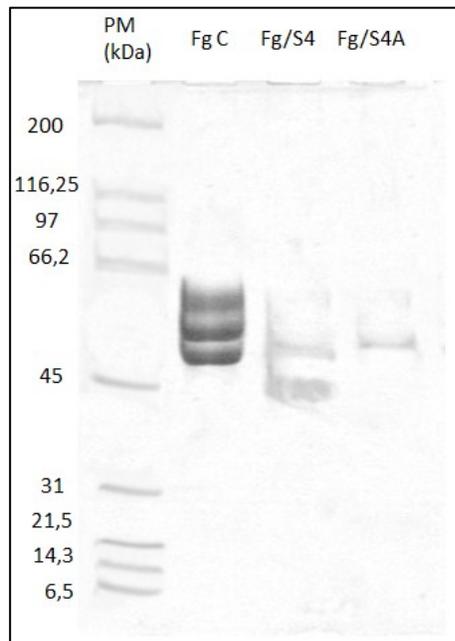
**Figura 16.** Actividad fibrinogenolítica del extracto y sus fracciones obtenidas de la columna sephadex G-50. 20  $\mu$ g de extracto o fracción se mezcló con fibrinógeno (30  $\mu$ g), tiempo de incubación 24 horas a 37 °C. Gel al 7,5 % en condiciones reducidas, teñido con azul de coomassie, PM: marcador de peso molecular de amplio rango, FgC: Fibrinógeno control, Fg/Ext: Fibrinógeno/extracto, Fg/S1: Fibrinógeno/ fracción S1, Fg/S2: Fibrinógeno/ fracción S2, Fg/S3: Fibrinógeno/ fracción S3, Fg/S4: Fibrinógeno/ fracción S4, Fg/S5: Fibrinógeno/ fracción S5, Fg/S6: Fibrinógeno/ fracción S6.



**Figura 17.** Actividad de las fracciones (20  $\mu$ g) obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en columna de sephadex G-50 sobre el fibrinógeno (30  $\mu$ g), tiempo de incubación 24 horas a 37 °C. Gel al 10% en condiciones no reductoras, teñido con azul de coomassie, PM: marcador de peso molecular de amplio rango, FgC: Fibrinógeno control, Fg/Ext: Fibrinógeno/extracto, Fg/S1: Fibrinógeno/ fracción S1, Fg/S2: Fibrinógeno/ fracción S2, Fg/S3: Fibrinógeno/ fracción S3, Fg/S4: Fibrinógeno/ fracción S4, Fg/S5: Fibrinógeno/ fracción S5, Fg/S6: Fibrinógeno/ fracción S6.



**Figura 18.** Actividad de las fracciones (20  $\mu$ g) obtenidas por cromatografía de afinidad sobre la molécula de fibrinógeno (30  $\mu$ g), tiempo de incubación 24 horas a 37 °C, gel al 5% en condiciones no reductoras teñidas con azul de coomasie. PM: Marcador de peso molecular, Fg C: fibrinógeno Control, Fg/S4A: fibrinógeno / fracción S4A, Fg/S4B: fibrinógeno / fracción S4B.



**Figura 19.** Actividad de las fracciones S4, S4A(20  $\mu$ g) sobre las cadenas de fibrinógeno(30  $\mu$ g), tiempo d eincubacion 24 horas a 37 °C, gel al 7,5% en condiciones reductoras teñidas con azul de coomasie. PM: Marcador de peso molecular, Fg C: fibrinógeno Control, Fg/S4: fibrinógeno / fracción S4, Fg/S4A: fibrinógeno / fracción S4A.

Para cuantificar la degradación del fibrinógeno se utilizó el programa Image J, observándose que el porcentaje de degradación del fibrinógeno pretratado con las fracciones S4, S5, S6 y S4A fue mayor que el porcentaje de degradación cuando se pretrató con extracto acuoso (Tabla 4 y 5). Bajo condiciones reductoras, el porcentaje de degradación de las cadenas del fibrinógeno fue mayor con la fracción S4A, la cual degradó los tres pares de cadenas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$ , en 96, 92 y 75% respectivamente, mientras que en condiciones no reductoras la fracción S4A degradó la molécula del fibrinógeno diez veces más que el extracto (Tabla 10).

**Tabla 10.** Cuantificación del porcentaje de degradación de las cadenas del fibrinógeno mediante el programa Image J.

<b>Muestra</b>	<b>% Degradación A<math>\alpha</math></b>	<b>% Degradación B<math>\beta</math></b>	<b>% Degradación <math>\gamma</math></b>
Fg C	0,00	0,00	0,00
Fg/ Ext	63,03	31,18	10,14
Fg/S1	10,68	1,16	0,00
Fg/S2	11,13	1,86	0,00
Fg/S3	12,09	1,00	0,00
<b>Fg/S4</b>	<b>93,25</b>	<b>90,91</b>	<b>76,00</b>
Fg/S5	67,82	80,58	73,55
Fg/S6	64,20	77,31	56,33
<b>Fg/S4A</b>	<b>96,35</b>	<b>92,00</b>	<b>75,28</b>

El fibrinógeno fue incubado con extracto acuoso o sus fracciones a la relación 20:30, durante 24 horas a 37 °C Fg C: Fibrinógeno control, Fg/Ext: Fibrinógeno/Extracto, Fg/S1: Fibrinógeno/Fracción S1, Fg/S2: Fibrinógeno/Fracción S2, Fg/S3: Fibrinógeno/Fracción S3, Fg/S4: Fibrinógeno/Fracción S4, Fg/S5: Fibrinógeno/Fracción S5, Fg/S6: Fibrinógeno/Fracción S6, obtenidas de la columna Sephadex G-50. Fg/S4A: fibrinógeno/Fracción S4A obtenida de la columna Zn – IMAC Separopore

**Tabla 11.** Cuantificación del porcentaje de degradación de la molécula del fibrinógeno mediante el programa Image J.

<b>Muestra</b>	<b>% Degradación</b>
Fg C	0,00
Fg/Extracto	6,47
Fg/S1	6,87
Fg/S2	7,55
Fg/S3	6,85
<b>Fg/S4</b>	<b>67,01</b>
Fg/S5	53,92
Fg/S6	40,63
<b>Fg/S4A</b>	<b>66</b>
Fg/S4B	2,45

El extracto y las fracciones fueron incubados con fibrinógeno a la relación 20:30, durante 24 horas a 37 °C. Fg C: Fibrinógeno control, Fg/Ext: Fibrinógeno/Extracto, Fg/S1: Fibrinógeno/Fracción S1, Fg/S2: Fibrinógeno/Fracción S2, Fg/S3: Fibrinógeno/Fracción S3, Fg/S4: Fibrinógeno/Fracción S4, Fg/S5: Fibrinógeno/Fracción S5, Fg/S6: Fibrinógeno/Fracción S6, obtenidas de la columna Sephadex G-50. . Fg/S4A: Fibrinógeno/Fracción S4A obtenida de la columna Zn – IMAC Separopore. . Fg/S4B: Fibrinógeno/Fracción S4B obtenida de la columna Zn – IMAC Separopore

## Efecto de inhibidores de proteasas

La actividad fibrinogenolítica de la fracción S4 obtenida por Sephadex G-50, se evaluó en presencia de inhibidores de proteasas y se obtuvo que el inhibidor de metalo proteasas EDTA, los inhibidores de serino proteasas benzamidina y PMSF como el inhibidor de cisteíno proteasa ácido yodoacético, protegieron al fibrinógeno de la degradación por la fracción S4, siendo el ácido yodoacético el más eficiente. En la Tabla 12 se muestran los porcentajes de inhibición de cada uno de estos compuestos sobre la actividad fibrinogenolítica de S4, los inhibidores restantes no protegieron a la molécula de fibrinógeno de la degradación.

**Tabla 12.** Cuantificación del porcentaje de degradación de la molécula de fibrinógeno por la fracción S4 en presencia de inhibidores de proteasa.

<b>Muestra</b>	<b>% degradación</b>	<b>% Inhibición</b>
S4/Sin inh	66,4	0,0
S4/Pepstatina	30,9	53,5
<b>S4/EDTA</b>	<b>25,6</b>	<b>61,5</b>
S4/Fenantrolina	53,7	19,1
S4/Aprotinina	39,0	41,3
<b>S4/Benzamidina</b>	<b>8,6</b>	<b>87,1</b>
<b>S4/PMSF</b>	<b>11,8</b>	<b>82,2</b>
<b>S4/Ácido Yodoacético</b>	<b>1,3</b>	<b>98,0</b>

S4/Sin inh: Fracción S4 en ausencia de inhibidores, S4/Peps: Fracción S4/Pepstatina, S4/Fenan: Fracción S4/Fenantrolina, S4/Apro: Fracción S4/Aprotinina, S4/Benz: Fracción S4/Benzamidina, S4/PMSF: Fracción S4/PMSF, S4/AIA: Fracción S4/Acido Iodoacético, gel en condiciones no reductoras, mediante el programa image J.

### Efecto del pH y la temperatura

Se evaluó la actividad fibrinogenolítica de S4A a distintos pH y temperaturas, se observó que hubo degradación del fibrinógeno a  $\text{pH} \leq 7,4$  siendo el óptimo pH 3. De las temperaturas ensayadas, los resultados muestran que la actividad fibrinogenolítica ocurrió a temperaturas  $\leq 37$  °C, siendo esta la óptima. Con pH básico y altas temperatura no hubo actividad fibrinogenolítica (Tablas 13 y 14).

**Tabla 13.** Cuantificación del porcentaje de degradación de la molécula de fibrinógeno mediante el programa image J.

<b>Muestra</b>	<b>% Degradación</b>
<b>pH 3</b>	<b>79,78</b>
pH 5	70,17
pH 7,4	65,87
pH 8	8,00
pH 10	1,00
pH12	1,00

La fracción S4A fue pretratada a distintos pH durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente fue incubada con fibrinógeno a la relación 20:30, por 24 horas y 37 °C.

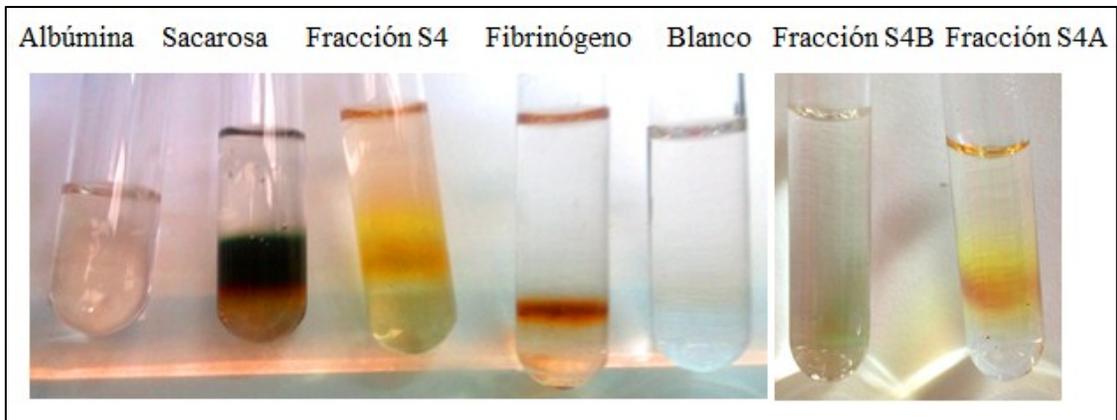
**Tabla 14.** Cuantificación del porcentaje de degradación de la molécula de fibrinógeno mediante el programa image J.

<b>Muestra</b>	<b>% Degradación</b>
4 °C	48,00
25 °C	53,12
<b>37 °C</b>	<b>68,23</b>
55 °C	9,00
80 °C	5,00
100 °C	0

La fracción S4A fue pretratada a distintas temperaturas durante 1 hora, posteriormente fue incubada con fibrinógeno a la relación 20:30, por 24 horas y 37 °C.

### Determinación de la presencia de carbohidratos

Se observó la formación del anillo de furfural de los carbohidratos tanto en la fracción S4 como en la S4A dando similar al fibrinógeno, el cual fue la glucoproteína que se utilizó control positivo. S4B no formó el anillo del furfural (Figura 17).



**Figura 20.** Determinación de la presencia de carbohidratos por el método de molisch en la fracción S4, S4A y S4B. Se empleó como control negativo albúmina, agua como blanco, controles positivos sacarosa y fibrinógeno.

## Discusión

Los desórdenes hemostáticos, ya sea por el desarrollo de cuadros hemorrágicos o trombóticos, son uno de los principales problemas que ponen en riesgo la vida humana y estos pueden ser tratados con plantas medicinales (Victório y col., 2009; Costa y col., 2010; Dayanand y Krishna, 2010; Koo y col., 2010; Pawlaczyk y col., 2010).

En la medicina tradicional venezolana se usan decocciones de flores de *Brownea macrophylla* para controlar la menorragia, uno de los trastornos menstruales más común en mujeres en edad reproductiva. Sin embargo, no fue hasta el año 2011, que se estudió científicamente el extracto acuoso floral de esta planta. Demostrando la presencia de componentes con actividad inhibitoria de plasmina. Estos componentes podrían ser los responsable de reducir la pérdida de sangre menstrual excesiva (menorragia). También se observó que este extracto degrada al fibrinógeno, sustrato central para formar el coágulo de fibrina. Para lograr comprender si este último hallazgo pudiera ser importante o no en el control de la menorragia, en este trabajo se estudió el efecto del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* sobre el fibrinógeno.

El extracto fue preparado de manera similar a como se prepara la infusión en la medicina tradicional, utilizándose agua bidestilada a 55 °C en vez de agua corriente. Sin embargo, en el remedio casero las flores son descartadas una vez es preparada la infusión, la cual es tomada diariamente durante la menstruación (4-7 días por ciclo menstrual) por 5 ciclos menstruales consecutivos, mientras que, en este estudio las flores con la infusión obtenida, fueron homogenizada empleando una licuadora y posteriormente centrifugada con el fin de extraer la mayor cantidad de componentes polares de las flores, los cuales mantuvieron su actividad sobre el sistema hemostático.

Con el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* se evaluó la formación de la malla de fibrina usando fibrinógeno o plasma (humano) pobre en plaquetas, empleando la metodología de tiempo de trombina y se observó que el extracto fue incapaz de coagular tanto al fibrinógeno como el plasma, por ende no formó fibrina, este resultado se corroboró con la metodología cinética de polimerización (Figura 9). Lo que indica que el extracto acuoso actúa sobre el fibrinógeno de forma distinta a como lo hace la trombina, ya que los fragmentos de fibrinógeno generados son incoagulables. Este hallazgo sugiere que el extracto acuoso altera la estructura del fibrinógeno siendo la trombina incapaz de liberar los fibrinopéptidos A y B de los dominios E centrales del fibrinógeno y por ende no se forman los monómeros de fibrina (Levy y col., 2012).

El fraccionamiento del extracto acuoso floral se realizó a través de dos columnas, la primera fue de exclusión molecular (Sephadex G-50), que permite separar los componentes por sus masas moleculares mientras que, la segunda fue de afinidad (Zn-IMAC separopore) que divide los componentes presentes en el extracto en dos grupos tomando en cuenta si son o no metaloproteasas. En la tabla 5 se muestra el rendimiento y nivel de purificación de los procedimientos cromatográficos empleados. Estos permitieron evaluar que tan eficientes fueron los pasos de purificación. Observándose que el compuesto de interés fue purificado efectivamente 500 veces más con respecto al extracto crudo, lo que sugiere que los pasos de purificación empleados fueron eficientes.

Con la columna Sephadex G-50, se obtuvieron 6 fracciones denominadas S1 a S6. De las cuales, las fracciones S4, S5 y S6, que son las últimas en eluir (Figura 10), presentaron actividad fibrinogenolítica, siendo S4 la más activa (Figuras 6 y 7), con masa molecular estimada empleado la misma columna de 8,55 kDa (Tabla 7). Sin embargo, cuando a S4 se le estimó la masa a través de SDS-PAGE se obtuvo un valor de 38,32 kDa (Figuras 14 y 15). La discrepancia en los

resultados obtenidos con la Sephadex G-50 y la electroforesis podrían ser debido a la presencia de glucopéptidos, cuyos segmentos hidrofílicos interaccionan de forma no covalente a través de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la dextrosa que compone la matriz de Sephadex retardando su elución por lo que la correlación entre el volumen de elución y la masa molecular es afectada dando masas menores a las reales (Andrews, 1965; Rendina, 1974; Ó'Fágáin y col., 2011).

Posteriormente, la fracción S4 fue recromatografiada, a través de la columna de afinidad Zn-IMAC separopore, la cual retiene componentes tipo metaloproteasa. Se obtuvieron dos fracciones, S4A y S4B (Figura 11), siendo S4A la más activa (Figura 18), los resultados de este fraccionamiento indican que la mayoría de los componentes fibrinogénolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* son de naturaleza distinta a las metaloproteasas. A esta fracción se le estimó la masa molecular por SDS-PAGE y se obtuvo una masa de 38,32 kDa.

En vista a la diferencia de masa molecular estimada por cromatografía de exclusión molecular y electroforesis se procedió a determinar la presencia de carbohidratos en las fracciones S4, S4A y S4B. Los resultados de este ensayo demostraron que, S4 y S4A contienen carbohidratos (Figura 20). Lo que permite sugerir que los componentes fibrinogénolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* son glucoproteínas. En el látex de la planta *Synadenium grantii* se aisló una glucoproteína de 34 kDa con actividad fibrinogénolítica denominada LGP (Rajesh y col., 2006).

Tomando en cuenta los hallazgos obtenidos hasta este momento, se puede concluir que los componentes más activos en cuanto a su capacidad de degradar fibrinógeno son glucoproteínas

de aproximadamente 38,32 kDa y de naturaleza distinta a las metaloproteasas. Teniendo estos componentes fibrinogénolíticos masa molecular similar a componentes purificados de otras especies de plantas, que en general poseen masas moleculares entre 20 y 50 kDa (Rajesh y col., 2006; Siritapetawee y col., 2012; Patel y col., 2012; Choi y col., 2014b).

Al evaluar la actividad fibrinogénolítica del extracto a distintas cantidades sobre una cantidad fija de fibrinógeno se observó que la relación 20  $\mu$ g de extracto / 30  $\mu$ g de fibrinógeno permitió obtener una degradación de las cadenas A $\alpha$  del fibrinógeno mayor a 62% siendo el porcentaje de degradación para las cadenas B $\beta$  y  $\gamma$  de 32 y 6% respectivamente, esta relación extracto/fibrinógeno permitió seguir apreciando como aumentaba el efecto fibrinogénolítico en los pasos siguientes de purificación (Tabla 8).

Cuando se incubó (a 37 °C) por distintos tiempos el extracto con el fibrinógeno (a la relación 20:30), se observó que conforme incrementaba el tiempo de incubación, mayor era la actividad fibrinogénolítica, donde las primeras cadenas a ser degradada son las A $\alpha$  y al aumentar el tiempo ocurre degradación de las cadenas B $\beta$  y  $\gamma$ , lo que permite sugerir que este extracto contiene  $\alpha$ -fibrinogenasas, siendo estos resultados similares a fibrinogenasas reportadas en diversas especies de plantas, venenos de serpiente y artropodos (Rajesh y col., 2006; Paes y col., 2008; Trisina y col., 2011; Siritapetawee y col., 2012; Patel y col., 2012; Brazón y col., 2013).

Cuando se evaluó la actividad fibrinogénolítica de todas las fracciones obtenidas de la columna sephadex G-50, a la relación 20/30, 24 horas de incubación a 37 °C, se observó que las fracciones S4, S5 y S6 fueron capaces de degradar al fibrinógeno, sin embargo la fracción S4 degradó en más de 90% las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$ , mientras que las  $\gamma$  fueron degradadas en más de 70%, con presencia de un fragmento de degradación de masa molecular entre 31 y 45 kDa

(Figura 16 y Tabla 10), estos resultados sugieren que los compuestos que degradan fibrinógeno tienen actividad distinta a la enzima fisiológica plasmina, ya que al degradar los tres pares de cadenas del fibrinógeno no se forman los fragmentos de degradación del fibrinógeno característicos de la hidrólisis por esta enzima (Cesarman-Maus y Haijar, 2005).

Luego, se evaluó el efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad fibrinogenolítica de la fracción S4 (Tabla 12) y se observó disminución significativa (mayor a 60%) de la actividad fibrinogenolítica en presencia de inhibidores de serino proteasas (Benzamidina y PMSF) metaloproteasas (EDTA) y cisteino proteasas (Ácido yodoacético), presentando este último inhibidor mayor actividad inhibitoria (98%) ver Tabla 11, como distintos inhibidores pudieron disminuir la actividad de S4, estos resultados indican que hay más de un compuesto con actividad fibrinogenolítica en esta fracción, los cuales son de naturaleza metalo, serino y cisteino proteasa, abundando estos últimos. Resultados similares fueron reportados por Yamara y col., en el 2014, quienes purificaron del extracto acuoso de hojas de *Cnidioscolus urens*, una fracción rica en proteínas, la cual tiene actividad fibrinogenolítica, cuya actividad fue disminuida por inhibidores de cisteino y metaloproteasa, siendo el primer inhibidor más eficiente, por lo que los autores concluyen que los componentes fibrinogenolíticos presentes en esta fracción mayoritariamente son del tipo cisteino proteasa (Yamara y col., 2014).

A la fracción S4A se le evaluó la actividad fibrinogenolítica a distintos pH y temperatura (Tablas 12 y 13), lo que permite concluir que esta fracción contiene proteasa de naturaleza ácida (pH óptimo 3), termolábil (temperatura óptima 37 °C). Si se toma en cuenta que el inhibidor de cisteino proteasa abolió la actividad fibrinogenolítica de S4 en 98% y que la actividad fibrinogenolítica de S4A fue óptima a pH 3, se podría sugerir que la mayoría de las fibrinogenasas presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* son cisteino

proteasas. Además, si se considera que la superfamilia de las cisteino proteasas tienen mayor actividad hidrolítica a pH ácidos (4 – 6,5) por la tendencia a tener grupos de oxidación Tiol y que la mayoría de las proteasas establecidas en plantas son del tipo cisteino (Grzonka y col., 2001), entonces, este hecho refuerza los resultados de este trabajo.

En resumen, se puede concluir que los componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* son glucoproteínas ácidas de 38,32 kDa tipo  $\alpha$ -fibrinogenasa, de naturaleza cisteino proteasa, cuya temperatura óptima de trabajo es 37 °C. Además, el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* degrada al fibrinógeno de tal manera que interfiere con la formación de los monómeros de fibrina y por ende en la polimerización del coágulo. Es probable que esta degradación del fibrinógeno no sea capaz de incrementar los episodios hemorrágicos en mujeres con menorragia ya el máximo efecto sobre el fibrinógeno se observa a las 24 horas de incubación, sin embargo, desconocemos la tasa de expresión de estos componentes en humano y se deben realizar más estudios que permitan dilucidar si esta degradación del fibrinógeno aumenta los episodios hemorrágicos.

## Conclusiones

- El efecto fibrinogenolítico del extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* es dosis dependiente y aumenta con el tiempo de incubación a 37 °C.
- El fibrinógeno (30 µg) pretratado con extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* (20 µg) durante 24 horas a 37 °C genera fragmentos de degradación de fibrinógeno que son incoagulables.
- Los componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* son mayoritariamente del tipo  $\alpha$ -fibrinogenasa.
- La fracción S4A con actividad fibrinogenolítica contiene carbohidratos.
- Los componentes fibrinogenolíticos presentes en la fracción S4A actúan a pH ácidos (pH 3) y a temperatura de 37 °C, tiene además, una masa molecular estimada de 38,32 kDa.
- El componente mayoritario con actividad fibrinogenolítica presente en la fracción S4 tiene naturaleza de cisteino proteasa.

## Recomendaciones

- Se sugiere probar actividad hemorrágica *in vivo* del componente activo.
- Estimar la masa molecular, secuencia y estructura por medio de espectrometría de masa.
- Usar técnicas de biotecnología vegetal para obtener en mayor cantidad y de forma más eficiente el componente fibrinogenolítico.
- Caracterizar las fracciones S5 y S6.
- Determinar el sitio de corte de la fracción S4A sobre el fibrinógeno.
- Evaluar la cinética de polimerización del extracto a distintos tiempos de incubación del extracto o sus fracciones con el fibrinógeno.
- Evaluar la degradación de plasmina sobre la fibrina que se formó a partir de fibrinógeno pretratado con extracto o sus fracciones a tiempos cortos de incubación

## Bibliografía

- Agra, M., Freitas, P., Barbosa-Filho, J. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **17**: 114-140.
- Agra, M., Silva, K., Basilio, I., de Freitas, P., Barbosa-Filho, J. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **18**: 472-508.
- Andrews, P. 1965. The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weights over a Wide Range. *Journal of Biochemistry*. **96**: 595-602.
- Bernardes, C., Santos-Filho, N., Costa, T., Gomes, M., Torres, F., Costa, J., Borges, M. y colaboradores. 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* **51**: 574-584.
- Bhattarai, S., Chaudhary, R.P., Quave, C.L., Taylor, R. 2010. The use of medicinal plants in the transhimalayan arid zone of Mustang district, Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **6**: 1-11.
- Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik, C., Arocha-Piñango, C. 2013. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **168**: 62-69.
- Cadena-González, A.L., Sørensen, M., Theilade, I. 2013. Use and valuation of native and introduced medicinal plant species in Campo Hermoso and Zetaquirá, Boyacá, Colombia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **9**: 1-14.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*, **129**: 307-321.

- Choi, B., Choi, K. S. J., Shin, C., Kim, S., Kim, S. 2013. Herinase: A Novel Bi-functional Fibrinolytic Protease from the Monkey Head Mushroom, *Hericium erinaceum*. Appl Biochem Biotechnol. **170**: 609–622.
- Choi, B., Choi, K. S. J., Shin, C., Kim, S., Kim, S. 2014a. Undariase, a Direct-Acting Fibrin(ogen)olytic Enzyme from *Undaria pinnatifida*, Inhibits Thrombosis In Vivo and Exhibits In Vitro Thrombolytic Properties. . Appl Biochem Biotechnol. **180**: 1-20.
- Choi, J., Kim, D., Park, S., Choi, B., Sapkota, K., Kim, S. 2014b. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: Purification and partial characterization. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1-6.
- Costa, J.O., Fonseca, K.C., Garrote-Filho, M.S., Cunha, C.C., Freitas, M.V., Silva, H.S., Araújo, R.B., Penha-Silva, N., De Oliveira, F. 2010. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. Biochimie. **40**: 1-6.
- Dayanand, C., Krishna, N. 2010. Evidence of fibrinolytic protease in the latex *Synadenium grantii* Hook. Journal of Biotechnology and Biochemistry, **6**: 645-655.
- Di Cera, E., Dang, Q., Ayala, Y. 1997. Review Molecular mechanisms of thrombin function, USA. CMLS, Cell. mol. life sci. **53**: 701-730.
- Dong, J. S., Ye, O.P., Chengguang. Y., Sung, E., Young H. 2014. Bioassay-guided isolation and identification of anti-platelet-active compounds from the root of Ashitaba (*Angelica keiskei* Koidz.), Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. **28**: 2312-2316.
- D'Suze, G., Corona, F., Possani, LD., Sevcik, C.1996 HPLC purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. Toxicon. **34**: 591–598.

- Gilani, A.H., Mehmood, M.H., Janbaz, K. H. 2008. Ethnopharmacological studies on antispasmodic and antiplatelet activities of *Ficus carica*. *Journal of Ethnopharmacology*. **119**: 1-5.
- Gomes, A., Das, R., Sarkhel, S., Mishra R., Mukherjee, S., Bhattacharya, S., Gomes, A. 2010. Herbs and herbal constituents active against snake bite. *Indian journal of Experimental Biology*. **48**: 865-878.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wieczerek, E., y colaboradores. 2001. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*. **48**: 1-20.
- Hans-walter H., Birgit P. 2011. Plant biochemistry. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. Fourth edition. Heidelberg. Alemania.
- Hoyos, J. 1992. Plantas ornamentales tropicales. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle Caracas. Monografias 38. Venezuela
- Kenneth, K., Marshall, A.I., Beutler, E., Kipps, T.J., Seligsohn, U., Prchal, J.T. 2010. Williams Hematology. McGraw-Hill. Eighth Edition. California, USA.
- Kang, S., Choi, J., Kim, D., Park, S., Sapkota, K., Kim, S., Kim, S. 2015. A bifunctional protease from green alga *Ulva pertusa* with anticoagulant properties: partial purification and characterization. *J Appl Phycol*. **134**: 1-9.
- Kim, J., Sapkota, K., Park, S., Choi, B., Kim, S., Hiep, N.T., Kim, C., y colaboradores. 2006. A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris*. *The Journal of Microbiology*. **44**: 622-631.
- Kong, J., Goh, N., Chia, L., Chia, T. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin*. **24**: 7-21.

- Koo, Yean Kyoung., Kim, Jeong Mi., Koo, Ja Yong., Sam, Sik., Bae, Kihwan., Kim, Yeong Shik., Chung, Jin-Ho., Sook, Yun-Choi. 2010. Platelet anti-aggregatory and blood anti-coagulant effects of compounds isolated from *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Pharmazie – An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. **8**: 624-628.
- Kunle. O.F., Egharevba, H.O., Ahmadu, P.O. 2012. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. **4**: 101-112.
- Lans, C. 2007. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **3**: 1-12.
- Lee, S., Kim, J., Kim, J., Sapkota, K., Shen, M., Kim, S., Chun, H., Yoo, J., y colaboradores. 2005. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Protein Expression and Purification*. **43**: 10-17.
- Levy, J.H., Szlam, F., Tanaka, K.A., Sniecinski, R.M. 2012. Fibrinogen and Hemostasis: A Primary Hemostatic Target for the Management of Acquired Bleeding. *International Anesthesia Research Society*. **114**: 261-274.
- Lijnen H.R., Van Hoef, B., Roelants, I., Collen, D. 2000. Fibrin(ogen) degradation by a 24kD endopeptidase from a *Chryseobacterium* Sp. *Fibrinolysis & Proteolysis*. **14**: 247-252.
- Lizcano, L.J., Bakkali, F., Ruiz-Larrea, M.B., Ruiz-Sanz, J.I. 2010. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *FOOD CHEM*. **119**: 1566-1570.
- Márquez-Vizcaíno, R., De la Rosa, C., Arrieta-García, E.J., Villalba-Uparela, J. 2007. evaluación de la actividad coagulante de *Brownea ariza* bentham (caesalpiniaceae). *Actual Biol*. **27**: 101-104.

- Marchi, R., Carvajal, Z., Meyer, M., Soria, J., Ruiz-Saez, A., Arocha-Pichango, C. L., Weisel, J.W. 2005. Fibrinogen Guarenas, an abnormal fibrinogen with an A $\alpha$ -chain truncation due to a nonsense mutation at A $\alpha$  467 Glu (GAA)  $\rightarrow$ stop (TAA). *Thromres.* **13**: 1-14.
- Marchi, R. 2012. Fibrinogen: Structural and Functional Aspects. In: *Thrombin: Function and Pathophysiology*. Nova publisher. OpenAccess.
- Markland, F.S. 1991. Inventory of a- and b-fibrinogenases from snake venoms. *Thromb. Haemost.* **65**: 438–443.
- Markland, F.S., 1998. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an update inventory. *Thromb. Haemost.* **79**: 668–674.
- Matsubara, K., Hori, K., Matsuura, Y., Miyazawa, K. 1999. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry.* **52**: 993-999.
- Michel, A., Dobrovolski. R., Gorini A., Almeida, J. 2004. Lonofibrase, a novel  $\alpha$ -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis research.* **113**: 147-154.
- Mukherjee, A.K., Rai, S.K., Thakur, R., Chattopadhyay, P., Kar, S.K. 2012. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. *Biochimie.* **94**: 1300- 1308.
- Newman, D., Cragg, G., Snader, K. 2000. The influence of Natural Products upon drug discovery. *Nat. Prod.* **17**: 215-234.
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P.M., O'Connor, B.F. 2011. Gel-Filtration Chromatography. *Protein Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* **681**: 25-35.
- Omana, S. B., Maheshwari, K.S. 2014. Hemostatic, milk clotting and blood stain removal potential of cysteine proteases from *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex. *Pharmacognosy Magazine.* **10**: 5350-5358.

- Paes, A.F., Prezoto, B.C., Yamashiro, E.T., Bertholim, L., Tashima, A.K., Klitzke, C.F., Camargo, A.C.M., Serrano S. M. T. 2008. Bothrops protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinolytic agent. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**: 1363–1372.
- Palomo, I.G., Pereira, J.g., Palma, J.B. 2005. *Hematología Fisiopatología y Diagnostico*. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile.
- Patel, G.K., Kawale, A.A., Sharma, A.K. 2012. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **52**: 104-111.
- Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Kanska, J., Bijak, J., Capek, P., Pliszcak-Krol, A., Gancarz, R. 2010. An acidic glycoconjugated from *Lythrum salicaria* L. with controversial effects on haemostasis. *Journal of Ethnopharmacology*, **131**: 63-69.
- Pereira, B. 2011. Efecto de componentes presentes en el extracto acuoso de flores de *Brownea macrophylla* (Fabaceae) sobre el sistema hemostático. Tesis Licenciatura. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
- Pereira, B., Brazón, J. 2015. Aqueousextractfrom *Browneagrandidiceps* flowerswiththeeffect on coagulationand fibrinolyticsystem. *Journal of Ethnopharmacology*. **160**: 6-13.
- Pólgar, L. 2005. Review The catalytic triad of serine peptidases. *CMLS*. **62**: 2161-2172.
- Rajesh, R., Raghavendra Gowda, C.D., Nataraju, A., Dhananjaya, B.L., Kemparaju, K., Vishwanath, B.S. 2006. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. *Toxicon*. **46**: 84-92.
- Rendina, G. 1974. *Técnicas de Bioquímica aplicada*. Nueva editorial interamericana. D.F. México.

- Schägger, H., Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. **166**: 368-379.
- Shih, H., Chern, C., Kuo, P., Wu, Y., Chan, Y., Liao, Y., Teng, C., Wu, T. 2014. Synthesis of Analogues of Gingerol and Shogaol, the Active Pungent Principles from the Rhizomes of *Zingiber officinale* and Evaluation of Their Anti-Platelet Aggregation Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 3926-3951.
- Shultes, R.E., Raffauf R.F. 2009. La selva sanadora: plantas medicinales y tóxicas del noreste del Amazonas. *Revista de Estudios Sociales*. **32**: 126-143.
- Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P., Thammasirirak, S. 2012. A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1824**: 907–912.
- Tennent, G., Brennan, S., Stangou, A., O’Grady, J., Hawkins, P., Pepys, M. 2007. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *BLOOD*. **109**: 1971-1974.
- Trisina, J., Sunardi, F., Suhartono, M.T., Tjandrawinata, R.R. 2011. DLBS1033, A Protein Extract from *Lumbricus rubellus*, Possesses Antithrombotic and Thrombolytic Activities. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2011**: 1-7.
- Veiga, A.B., Pinto, A.F.M., Guimaraes, J.A. 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis*. **111**: 95-101.
- Viana, C.A., Oliveirab, J.S., Freitas, C.D.T., Alencarc, N.M.N., Carvalho, C.P.S., Nishia, B.C., Ramosa, M.V. 2013. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. *Blood Coagulation and fibrinolysis*. **24**: 386-392.

- Victório, C., Kuster, R., Soares de Moura, R., Lage, C. 2009b. Vasodilator activity of extrates of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Shum y *A. zerumbet* (Pers.) Burt et Smith cultured in vitro. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45**: 507-514.
- Yamara, A.S., Félix-Silva, J., Silva-Júnior, A.A., Rebecchi, I.M.M., Oliveira, A., Uchoa, A., Fernandes-Pedrosa, M., 2014. Protein-Rich Fraction of *Cnidocolus urens* (L.) Arthur Leaves: Enzymatic Characterization and Procoagulant and Fibrinogenolytic Activities. *Molecules*. **19**: 3552-3569.
- Ybarra, J. 2007. El torreón del alambique. Historia del auge y decadencia de la agroindustria de la caña de azúcar en Montalbán (1938-1960). Colección Historias., Caracas, Venezuela: Fundación el perro y la rana.
- <http://quizlet.com> (5/8/14)
- <http://www.tropicos.org> (5/8/14)