



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LIProVe

Trabajo de Tesis Doctoral

Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina

María Eugenia Errasti

(Director: Dr. Néstor Oscar Caffini)

2013

El motivo con que fueron construidas las guardas de la portada está presente en tejidos elaborados con las fibras extraídas de las hojas de *Bromelia hieronymi* (cháguar), ambas actividades realizadas por mujeres pertenecientes a la comunidad wichí (Sastre *et al.*, 2013)

Indice

1. Introducción general y Objetivos

1.1. Productos Naturales, Medicina Tradicional y Fitomedicinas	1
1.2. Generalidades de la familia <i>Bromeliaceae</i>	3
1.2.1. Importancia. Usos	5
1.2.1.1. <i>Uso comestible</i>	5
1.2.1.2. <i>Obtención de fibras</i>	6
1.2.1.3. <i>Usos medicinales</i>	7
1.3. Tipos de Proteasas, Distribución y Rol en los Vegetales	9
1.3.1. Proteasas. Tipos y sistemas de clasificación	9
1.3.1.1. Sistema EC de clasificación de enzimas	10
1.3.1.2. El Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas	11
1.3.2. Distribución de proteasas en los seres vivos	12
1.3.3. Rol de las peptidasas en los vegetales	13
1.3.3.1. Peptidasas cisteínicas	14
1.4. Enzimas Proteolíticas de <i>Bromeliaceae</i>	16
1.4.1. Endopeptidasas del ananá	16
1.4.1.1. <i>Bromelina de tallo</i>	17
1.4.1.2. <i>Ananaína</i>	17
1.4.1.3. <i>Comosaína</i>	18
1.4.1.4. <i>Bromelina de fruto</i>	18
1.4.2. Balansaína	18
1.4.3. Hieronymaínas	19
1.4.3.1. <i>Hieronymaína I</i>	19
1.4.3.2. <i>Hieronymaína II</i>	19
1.4.3.3. <i>Hieronymaína III</i>	20
1.4.4. Macrodontaínas	20
1.5. Objetivos	21
1.6. Referencias	23
2. Material Vegetal	
2.1. Material Vegetal Utilizado	28

2.1.1. <i>Bromelia hieronymi</i> Mez	28
2.1.1.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de <i>B. hieronymi</i> (Bh)	28
2.1.2. <i>Bromelia balansae</i> Mez	28
2.1.2.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de <i>B. balansae</i> (Bb)	29
2.1.3. <i>Pseudananas macrodentes</i> (Morr.) Harms [= <i>P. sagenarius</i> (Arruda) Camargo]	29
2.1.3.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de <i>P. macrodentes</i> (Pm)	29
2.1.4. <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	30
2.1.5. Reactivos químicos	30
2.2. Caracterización proteolítica de los extractos parcialmente purificados (Bh, Bb y Pm) y de bromelina	30
2.2.1 Técnicas y metodología	30
2.2.1.1. Dosaje de la actividad caseinolítica	30
2.2.1.2. Cuantificación del contenido proteico	31
2.2.1.3. Isoelectroenfoque	31
2.2.1.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
2.2.1.5. Inhibición de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb, Pm y bromelina	33
2.2.1.5.1. <i>Tratamiento con E-64</i>	33
2.2.2. Resultados	33
2.2.2.1 Perfiles de pl y de peso molecular de Bh, Bb y Pm	33
2.2.2.2 Inhibición de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb, Pm y bromelina	35
2.3. Referencias	38
3. Efecto antiinflamatorio	
3.1. Inflamación	39
3.1.1. Inflamación aguda	39
3.1.1.1. <i>Respuesta vascular</i>	39
3.1.1.2. <i>Respuesta celular</i>	40
3.1.1.3. <i>Mediadores químicos</i>	40
3.1.2. Regulación y resolución de la inflamación	43
3.1.3. Inflamación crónica	44
3.1.4. Proteasas como antiinflamatorios	45
3.1.4.1. Bromelina	46
3.1.4.1.1. <i>Efecto sobre los componentes de la coagulación</i>	47
3.1.4.1.2. <i>Efecto sobre el sistema de calicreínas</i>	47
3.1.4.1.3. <i>Efecto sobre la vía de la COX y NOS</i>	47
3.1.4.1.4. <i>Modulación de moléculas de superficie celular</i>	47
3.1.4.1.5. <i>Activación celular y producción de citoquinas</i>	48

3.2. Objetivos	49
3.3. Materiales y métodos	50
3.3.1. Modelos de inflamación	50
3.3.1.1. Modelos de inflamación aguda. Edema de pata de rata	50
3.3.1.1.1. <i>Edema de pata inducido por carragenina</i>	50
3.3.1.1.1.1. Procedimiento experimental	51
3.3.1.1.2. <i>Edema de pata inducido por histamina</i>	51
3.3.1.1.2.1. Procedimiento experimental	51
3.3.1.1.3. <i>Edema de pata inducido por serotonina</i>	52
3.3.1.1.3.1. Procedimiento experimental	52
3.3.1.1.4. <i>Equipamiento, medidas y cálculo del volumen de edema</i>	52
3.3.1.2. Modelo de inflamación crónica: test del granuloma	53
3.3.1.2.1. Procedimiento experimental	53
3.3.1.3. Cálculo del efecto antiinflamatorio y análisis estadístico	53
3.3.2. Animales	54
3.3.3. Dosis	54
3.3.4. Material vegetal ensayado	54
3.4. Resultados y Discusión	56
3.4.1. Modelos de inflamación aguda	56
3.4.1.1. Edema de pata de rata inducido por carragenina	56
3.4.1.1.1. <i>Bromelia hieronymi</i>	56
3.4.1.1.1.1. <i>Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bh y bromelina</i>	57
3.4.1.1.2. <i>Pseudananas macrodontes</i>	59
3.4.1.1.2.1. <i>Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Pm</i>	60
3.4.1.1.3. <i>Bromelia balansae</i>	61
3.4.1.1.3.1. <i>Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bb</i>	61
3.4.1.2. Otros modelos de inflamación aguda	63
3.4.1.2.1. Edema de pata inducido por histamina en ratas	63
3.4.1.2.2. Edema de pata inducido por serotonina en ratas	64
3.4.1.2.2.1. <i>Bromelia hieronymi</i>	64
3.4.1.2.2.2. <i>Pseudananas macrodontes</i>	65
3.4.2. Modelo de inflamación crónica: test del granuloma	65
3.4.2.1. <i>Bromelia hieronymi</i>	65
3.4.2.1.1. <i>Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bh y bromelina en el test del granuloma</i>	67
3.4.2.2. <i>Pseudananas macrodontes y Bromelia balansae</i>	69

3.4.2.2.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bb en el test del granuloma	70
3.4.2.2.2. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Pm en el test del granuloma	71
3.4.2.3. Posible relación entre la actividad proteolítica-acción antiinflamatoria-modulación sobre población linfocitaria T	74
3.5. Conclusiones	77
3.6. Referencias	78
4. Efecto anticoagulante, fibrinogenolítico y fibrinolítico	
4.1. Hemostasia	82
4.1.1. Vasoconstricción	82
4.1.2. Formación del trombo plaquetario	82
4.1.3. Coagulación	83
4.1.3.1. Fase inicial	85
4.1.3.2. Fase de amplificación	86
4.1.3.3. Fase de propagación	86
4.1.3.4. Formación de fibrina	87
4.1.3.5. Regulación de la coagulación	89
4.1.4. Fibrinólisis	90
4.2. Trombosis	91
4.2.1. Agentes para el tratamiento de la trombosis	93
4.2.1.1. Proteasas vegetales como antitrombóticos	94
4.3. Objetivos	95
4.4. Materiales y métodos	95
4.4.1. Efecto anticoagulante	95
4.4.1.1. Ensayos <i>in vitro</i>	95
4.4.1.1.1. Pool de plasma pobre en plaquetas	95
4.4.1.1.2. Tiempo de protrombina (TP)	96
4.4.1.1.3. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)	97
4.4.1.1.4. Efecto de la inhibición de la actividad proteolítica sobre la acción anticoagulante	98
4.4.1.1.5. Análisis de los datos obtenidos y expresión de resultados	98
4.4.1.2. Ensayos <i>in vivo</i>	98

4.4.1.2.1. <i>Análisis de los datos obtenidos y expresión de resultados</i>	99
4.4.2. Efecto fibrinogenolítico	100
4.4.2.1. Hidrolizados	100
4.4.2.2. Tricina-SDS-PAGE	101
4.4.3. Efecto fibrinolítico	102
4.4.3.1. Placa de fibrina	102
4.4.3.2. Cálculos y análisis de resultados	103
4.4.4. Material vegetal	104
4.5. Resultados y discusión	105
4.5.1. Efecto anticoagulante	105
4.5.1.1. Ensayos <i>in vitro</i>	105
4.5.1.1.1. <i>Tiempo de Protrombina (TP)</i>	106
4.5.1.1.2. <i>Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)</i>	108
4.5.1.1.3. Efecto de la inhibición de las proteasas cisteínicas de los preparados proteolíticos sobre su efecto anticoagulante	112
4.5.1.2. Ensayos <i>in vivo</i>	114
4.5.2. Efecto fibrinogenolítico	116
4.5.3. Efecto fibrinolítico	119
4.6. Conclusiones	122
4.7. Referencias	123
5. Efecto antitumoral	
5.1. Las causas de la aparición del cáncer	125
5.2. Epidemiología del cáncer	126
5.3. Carcinoma Hepatocelular	128
5.3.1. Factores de riesgo	128
5.3.2. Patogénesis molecular	129
5.3.3. Tratamiento	129
5.4. Terapia enzimática sistémica en pacientes con cáncer	130
5.5. Objetivos	130
5.6. Materiales y métodos	131
5.6.1. Cultivo celular	131
5.6.2. Tratamientos	131
5.6.2.1. Evaluación de la viabilidad celular (Ensayo con MTS)	131
5.6.2.2. Ensayo de adhesión celular (Tinción con cristal violeta)	132

5.6.3. Análisis estadístico	132
5.6.4. Material vegetal ensayado	132
5.7. Resultados y discusión	133
5.7.1. Ensayo de viabilidad	133
5.7.2. Ensayos de adhesión	133
5.7.3. Efecto de la actividad proteolítica sobre los porcentajes de viabilidad y de adhesión celular	135
5.8. Conclusiones	139
5.9. Referencias	140
6. Conclusiones finales y perspectivas	142
Agradecimientos	146

1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS



1.1. Productos Naturales, Medicina Tradicional y Fitomedicinas

Los productos naturales, en especial los de origen vegetal, han sido una importante fuente de agentes terapéuticos. Los medicamentos derivados de productos naturales representan alrededor de un 25-30% de los agentes terapéuticos actuales. Si bien en las últimas décadas, debido al avance de la química combinatoria, la investigación sobre productos naturales en la industria farmacéutica ha mostrado una desaceleración, para algunas enfermedades complejas los productos naturales todavía constituyen una fuente muy valiosa para la producción de nuevas entidades químicas, ya que representan estructuras seleccionados por mecanismos evolutivos durante millones de años (Calixto, 2005).

Los “Fitomedicamentos” o “Fitomedicinas” constituyen una categoría especial de drogas vegetales. Una de las críticas tradicionalmente formuladas a la Medicina Natural o Medicina Tradicional es la falta de normalización o estandarización de los materiales biológicos, pero las fitomedicinas difieren de las así llamadas “plantas medicinales” en que están normalizadas o estandarizadas, lo que significa que ciertos compuestos que están presentes en el material vegetal se han cuantificado y dilucidado, con lo que en principio se cuenta con un producto final de composición más o menos constante (Israelsen, 1993), en la medida en que se respeten la época y el lugar de recolección (Bennett *et al.*, 1990).

En contraste con los millones de dólares y años de investigación necesarios para desarrollar un nuevo medicamento por síntesis, o incluso desde el prototipo de una fuente natural, el desarrollo de fitofármacos estandarizados exige menos presupuesto y parece ser perfectamente factible en los países en desarrollo. Esta área está recibiendo mucha atención en Brasil y en la mayoría de los países de América Latina. Por otra parte, la comercialización de las fitomedicinas se ha expandido en todo el mundo durante los últimos años, especialmente en países de Europa como Alemania, Francia, Italia, Reino Unido, España y, más recientemente, también en los Estados Unidos de América (Calixto, 2005).

El interés por las plantas medicinales y las fitomedicinas adopta diferentes características en las diferentes partes del mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 65-80% de la población de los países en desarrollo, como consecuencia de la pobreza y de la imposibilidad de acceso a la medicina moderna, dependen esencialmente de las plantas para la Atención Primaria de la Salud (Calixto, 2005). En todo el continente africano alrededor del 80% de sus habitantes utilizan fitomedicinas, especialmente en el tratamiento de enfermedades que resultan prevalentes en la zona, tales como el VIH/SIDA, el paludismo, la anemia falciforme o drepanocítica, la diabetes y la hipertensión. Los defensores de las fitomedicinas argumentan que son más beneficiosas que sus equivalentes sintéticos por ser seguras, económicas, aceptables

culturalmente y adecuadas para tratamientos crónicos, sugiriendo que su uso debería integrarse a la agenda de Salud de dichos países (Okigbo & Mmekka, 2006).

La producción de plantas medicinales y aromáticas tiene una larga tradición en varios países de Europa tales como el Reino Unido, Italia, Grecia, Alemania, Austria y Francia, mientras que en Finlandia, Irlanda y Holanda se ha establecido a lo largo de las últimas décadas (Verlet & Leclercq, 1998). Desde la década del 90 se ha producido un resurgimiento en el interés y el uso de productos de plantas medicinales en América del Norte y Europa. Estudios sobre el uso de plantas medicinales por el público norteamericano han mostrado un aumento en el consumo de casi el 3% de la población en 1991 a más del 37% en 1998. Un factor importante que sin duda contribuyó a dicho incremento fue la promulgación en ese país de la legislación federal de 1994 (Dietary Supplement Health and Education Act), que facilitó la producción y comercialización de productos fitomedicinales y el consiguiente ingreso de varias compañías farmacéuticas importantes en la producción de fitomedicinas (Brevoort, 1998). En los países desarrollados se ha venido dando un aumento en el uso de la medicina complementaria y alternativa, dentro de la cual se incluyen las fitomedicinas. Esto podría deberse, además de a la tradición, al bajo costo y a una preocupación creciente por los efectos adversos de los fármacos sintéticos. Por otro lado, la esperanza de vida más larga en dichos países ha dado como resultado un aumento de los riesgos de desarrollar enfermedades crónicas y debilitantes (las enfermedades coronarias, el cáncer y la diabetes) y para muchos pacientes la medicina alternativa parece ofrecer medios menos agresivos para el tratamiento de dichas enfermedades que la medicina alopática (OMS, 2002).

Las Farmacopeas de diversos países han recogido en sus monografías algunas de las plantas medicinales de mayor difusión. La legislación europea sobre medicamentos también aborda el uso medicinal de los productos procedentes de las plantas. El Comité de Medicamentos a Base de Plantas (HPMC) se constituyó en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para proporcionar monografías y entradas de la lista de sustancias y sus preparados a base de hierbas. Mientras tanto se han publicado aproximadamente 100 monografías, donde se define el estándar científico y regulatorio vigente para asegurar la eficacia y la seguridad de las sustancias vegetales y preparados vegetales utilizados en los medicamentos (Knöss & Chinou, 2012).

La Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 32 – NF 27) contiene 76 monografías relacionadas con productos de origen vegetal. Si bien existe una farmacopea herbolaria bastante completa editada con el título de American Herbal Pharmacopoeia, ésta no tiene carácter oficial. La Farmacopea Mexicana (FEUM) por su parte registra 56 productos vegetales de aplicación en medicina. En la actualidad, ambas Farmacopeas contienen un número reducido de monografías de productos vegetales en comparación al

que registran sus homólogas europeas. En el caso del código mexicano esta ausencia es aún más pronunciada y fue en el año 2000 cuando se inicia un cambio con la publicación de la Farmacopea Herbolaria, la cual forma parte de la FEUM. Esta publicación marca el inicio del rescate del arsenal terapéutico conocido y usado en México desde siglos atrás (Schifter Aceves *et al.*, 2009).

En cuanto a la Farmacopea Argentina, en 2008 se renovó su Comisión Permanente, quien ya ha producido la última versión de la misma (Farmacopea Argentina VIIIa. Edición) disponible en la página de la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT) en cuatro volúmenes¹, el tercero de los cuales contiene un “Apartado de Fitoterápicos” que incluye 29 monografías (ANMAT, 2011).

La flora argentina se encuentra representada por más de 8.000 especies de plantas superiores. De ellas, alrededor de 1.600 son utilizadas por la población como “remedio casero” (Rondina *et al.*, 2010), en especial por parte de los sectores sociales de menor acceso a los sistemas de salud.

Un estudio sobre el número de trabajos publicados entre 1984 y 2004 en revistas científicas indexadas con referato, da cuenta del avance que ha tenido en los últimos años la investigación sobre productos naturales (específicamente plantas) en América Latina, siendo Brasil y luego México, Argentina y Chile los países con mayor número de publicaciones. Los estudios de domesticación, producción, biotecnología y de mejora genética de las plantas medicinales son otros campos de la ciencia que se desprenden de tales avances en el uso de plantas medicinales en América Latina (Calixto, 2005).

Latinoamérica contiene gran parte de la biodiversidad de todo el mundo, pero a pesar de ello nuestros países nunca han podido utilizarla en beneficio de su propio desarrollo. Peor aún, como consecuencia de la explotación sin control, la mayor parte de las áreas relevantes en cuanto a biodiversidad se ha reducido sensiblemente año tras año, mas allá de los esfuerzos esporádicos de algunos gobiernos por preservarla. Inclusive el conocimiento de la medicina tradicional también está desapareciendo, especialmente el derivado de las comunidades indígenas originarias (Calixto, 2005).

1.2. Generalidades de la Familia *Bromeliaceae*

La familia Bromeliaceae está constituida por casi 3700 especies incluidas en 57 géneros. Tradicionalmente la familia ha sido subdividida en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae. La subfamilia **Pitcairnioideae** incluye a las bromeliáceas más ancestrales y muchas de sus especies recuerdan a la familia de las gramíneas (Poaceae), de la cual evolucionaron. La mayoría son terrestres contando con un sistema

¹ http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava_edicion.asp

extenso de raíz. La subfamilia **Tillandsioideae**, formada mayoritariamente por especies epífitas, se ha adaptado para sobrevivir en condiciones muy secas; las semillas tienen alas, lo que las hace susceptibles de ser dispersadas por el viento, y apéndices plumosos que les permite adherirse sobre superficies rugosas. **Bromelioideae** es la subfamilia más diversa. La mayoría de sus especies también son epífitas, aunque algunas se han adaptado a las condiciones terrestres. Están compuestas de un arreglo foliar espiralado denominado “roseta”, donde las bases foliares se superponen parcialmente y pueden funcionar como un reservorio hídrico. Generalmente tienen hojas espinosas y sus semillas son a menudo distribuidas por los pájaros y animales, que consumen sus frutos carnosos (Bromeliad Society International). Pero en base a recientes estudios genéticos (Givnish *et al.*, 2011), los géneros de la subfamilia Pitcairnioideae han sido reagrupados en 6 subfamilias, con lo que la situación taxonómica actual de las Bromeliaceae es la que se muestra en la Tabla 1.1.

Subfamilia	Género
Brocchinioideae*	<i>Brocchinia</i>
Lindmanioideae*	<i>Connellia, Lindmania</i>
Hechtioideae*	<i>Hechtia</i>
Navioideae*	<i>Brewcaria, Cottendorfia, Navia, Sequencia, Steyerbromelia</i>
Pitcairnioideae	<i>Deuterocohnia, Dyckia, Encholirium, Fosterella, Pepinia, Pitcairnia</i>
Puyoideae*	<i>Puya</i>
Tillandsioideae	<i>Alcantarea, Catopsis, Glomeropitcairnia, Guzmania, Mezobromelia, Racinaea, Tillandsia, Vriesea, Werauhia</i>
Bromelioideae	<i>Acanthostachys, Aechmea, Ananas, Androlepis, Araeococcus, Billbergia, Bromelia, Canistropsis, Canistrum, Cryptanthus, Deinacanthon, Disteganthus, Edmundoa, Eduandrea, Fascicularia, Fernseea, Greigia, Hohenbergia, Hohenbergiopsis, Lymania, Neoglaziovia, Neoregelia, Nidularium, Ochagavia, Orthophytum, Portea, Pseudaechmea, Pseudananas, Quesnelia, Ronnbergia, Ursulaea, Wittrockia</i>

Tabla 1.1. Subfamilias y géneros de Bromeliaceae (Bromeliad Society International). * Los géneros incluidos en esta subfamilia se encontraban originalmente dentro de las Pitcairnioideae.

Las Bromeliaceae poseen un rango de hábitat muy amplio: desde desiertos cálidos y secos hasta bosques lluviosos y frías regiones montañosas, mostrando un rango de altitud que va desde el nivel del mar hasta los 4700 metros. La mayoría se distribuye en Sudamérica, con el número más grande de especies halladas en Brasil; se extienden desde Chile y Argentina a través de Centroamérica y el Caribe, alcanzando el límite norte en los alrededores de Virginia, en el sudeste de los EE.UU. (Smith, 1934). Una única especie

(*Pitcairnia feliciana*) ha sido encontrada en el oeste de África (Figura 1.1). A la Argentina llegan 13 géneros y alrededor de 120 especies (Flora del Conosur. Catálogo de las Plantas Vasculares).

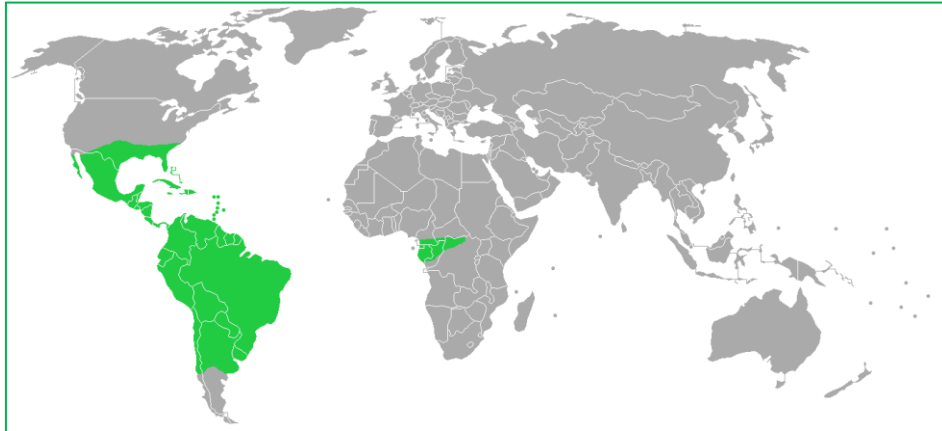


Figura 1.1. Distribución mundial de especies de Bromeliaceae. <<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:WorldBromeliadDistribution.jpg>>.

1.2.1. Importancia. Usos

En la actualidad, los usos ornamentales y comestibles son los más difundidos dentro de las Bromeliaceae, siendo el ananá o piña (*Ananas comosus* L) el fruto más ampliamente consumido en el mundo. El primer registro que se tiene data de 1493, cuando Cristóbal Colón vio a los indígenas cultivar la especie en las Antillas y a su regreso a España la introduce en el “Viejo Mundo” (Bromeliad Society International).

En Latinoamérica, diversas especies de Bromeliaceae han sido de gran importancia para el hombre desde tiempos ancestrales. En las distintas regiones se les ha dado un uso particular, que puede ser enmarcado en las siguientes categorías: ceremonial, comestible, textil, medicinal, ornamental y combustible, entre otros. Un estudio reciente (Hornung-Leoni, 2011) que incluye 78 especies de Bromeliaceae en 19 países latinoamericanos demostró que 33 de ellas son empleadas en México, Venezuela, Perú y Bolivia para rituales y ceremonias, de las cuales el 73% corresponde a especies del género *Tillandsia*. El uso ornamental involucra 12 especies, principalmente de los géneros *Tillandsia*, *Aechmea* y *Guzmania*, en Argentina, Chile, Venezuela y México, mientras que 2 especies de *Puya* son usadas en Perú y Ecuador como combustibles. Los usos comestibles, medicinales y para la extracción de fibras han sido registrados para 24, 19 y 17 especies, respectivamente, a lo largo de numerosos países y serán detallados a continuación.

1.2.1.1. Uso comestible

Además de *Ananas comosus*, *Bromelia pinguin* es una de las especies más usadas como comestible. Se consumen sus frutos, raíces, semillas y flores, tanto directamente

como para la preparación de dulces, refrescos, postres y guisos. Su uso está extendido desde México y las Antillas hasta el norte de Sudamérica y Ecuador. Hojas de especies de *Tillandsia* y *Puya* son empleadas para envolver bollos tipo “tamales” en Venezuela, Colombia y norte de los Andes Sudamericanos, así como también se consumen brotes de otras especies de *Tillandsia* en Bolivia y Argentina. Los frutos de *B. balansae* se comen asados en algunas zonas de Brasil (Hornung-Leoni, 2011)

Distintos grupos étnicos del Chaco paraguayo y argentino consumen frutos maduros, cocidos o crudos, de *Bromelia serra* y *B. balansae*, siendo sus semillas también empleadas, a partir de las cuales se obtiene un polvo que se consume directamente o bien se utiliza para hacer sopa. Las partes vegetativas de *B. serra*, *B. hieronymi* y *Dickya ferox* también son consumidas. Si bien las partes más usadas son las vainas foliares jóvenes y el eje vertical de las rosetas basales (Suárez & Montani, 2010), el consumo de los brotes jóvenes (ejes laterales) de *B. hieronymi* es una nueva modalidad entre los niños (Arenas, 2004).

1.2.1.2. Obtención de fibras

El empleo de las Bromeliaceae para la extracción de fibras es de gran importancia para el desarrollo de numerosas comunidades a lo largo del continente. Las fibras son destinadas a la fabricación de varios productos, tanto para uso propio de las comunidades como para su comercialización². Hamacas, bolsas de mano, redes para la pesca, puntas de flecha, sillas de montar, cestería, sacos, cordelería para adornar vestimentas, sombreros, zapatos, sandalias y cinturones, objetos para uso ceremonial, son algunos de los ejemplos.

Diversas especies del género *Aechmea* son usadas por distintos indígenas en México y Ecuador, principalmente *A. magdalanae*, a partir de la cual se obtiene una fibra (conocida como “ixtle” o “fibra de pita”) de gran resistencia, usada en la fabricación de elementos para la pesca. La fibra obtenida de varias especies de *Ananas* spp., caracterizada por su flexibilidad, es empleada para tejidos, hamacas y cestas en Venezuela. *Tillandsia usneoides* es utilizada para rellenar colchones y como material de empaque en Ecuador. En Chile, de las hojas de *Puya chilensis* se obtiene una fibra resistente empleada para las redes de pesca. Fibras duras son extraídas de *B. pinguin* en México y Nicaragua. (Hornung-Leoni, 2011).

Las fibras de *Bromelia hieronymi* Mez (conocida como cháguar), son utilizadas por indígenas del Gran Chaco. En cambio, el uso textil de *B. balansae* Mez y *B. serra* Griseb no es certero, ya que aunque en la bibliografía consta el empleo de sus fibras por parte de vilelas y tobas orientales no ha sido registrado en trabajos de campo recientes. La fibra más apreciada por distintas etnias chaqueñas es la obtenida a partir de *Deinacanthon urbanianum* Mez., que debido a su durabilidad y resistencia es usada para la elaboración de

² Productos elaborados con fibras de “bromeliáceas textiles” por la comunidad Wichí (Sastre *et al.*, 2013).

objetos para la pesca. Sin embargo, su escasez ha llevado a su reemplazo por *B. hieronymi*. Nativos de filiación guaraní en el Paraguay oriental así como los maká asentados en las inmediaciones del río Paraguay usan como textil las fibras obtenidas de *Pseudananas sagenarius*, mientras que su uso por parte de nativos del Chaco consta sólo en la literatura (Arenas, 1997).

A pesar del uso difundido de las “Bromeliáceas textiles” entre numerosas comunidades, son pocas las empleadas como materia prima para la industria. En Argentina, a fines del siglo XIX se iniciaron estudios técnicos a fin de evaluar el uso de las Bromeliaceae con fines textiles. Industrias extractoras de fibras fueron instalándose en Corrientes, Chaco, Formosa, Santiago del Estero y Tucumán, pero tuvieron corta duración. Sin embargo, con la Segunda Guerra Mundial y el consecuente desabastecimiento de yute, cáñamo y lino textil, se reiniciaron las tareas exploratorias impulsadas por el Estado (Res N° 949-46 del Ministerio de Agricultura), llegándose a hacer estudios de cultivos en campos de experimentación en distintas provincias del norte. Como resultado de tales estudios, se concluyó que las Bromeliaceae factibles de uso textil, en orden creciente de importancia industrial, son: *Pseudananas sagenarius*, *Bromelia hieronymi*, *B. balansae*, *B. serra*, *Deinacanthon urbanianum*, *Dyckia ferox* y *Aechmea distichantha*, adjudicándoles potencial para la elaboración de telas tipo batista, cuerdas para pescar y telas de arpillera, entre otros. Las dificultades con el mercado, así como las deficiencias técnicas en la explotación y la maquinaria de extracción no posibilitaron el desarrollo de esta industria en Argentina (Arenas, 1997). En Brasil, sin embargo, existen pequeñas industrias textiles extractoras de fibras de *B. laciniosa* y *Neoglaziovia variegata* (Hornung-Leoni, 2011).

1.2.1.3. Usos medicinales

Diversas especies del género *Hechtia* tienen importancia medicinal en México: *H. glomerata* ha sido empleada contra el catarro y la bronquitis, las hojas masticadas o hervidas de *H. melanocarpa* se usan para el tratamiento de la diabetes, mientras que el té obtenido de hojas de *H. podantha* es usado como diurético. *Puya gummifera* es empleada en Ecuador para dolencias de riñón, mientras que en Chile empleaban como emoliente y astringente las secreciones de sus inflorescencias, producto de las picaduras de las larvas de mariposas. También en Chile es usada *P. berteroniana* como emoliente, e infusiones de tallos y hojas de *P. chilensis* se emplean como antiinflamatorio y para aliviar fiebre y diarreas. Las raíces de *Pitcairnia pungens* son utilizadas como diurético en Ecuador (Hornung-Leoni, 2011). En Argentina, personas pertenecientes a comunidades Wichí de Salta han señalado que diversas especies de *Tillandsia* pueden ser utilizadas para aliviar el dolor causado por dislocaciones o fracturas (Suárez & Montani, 2010). *Tillandsia dasyliirifolia* y *T. elongata* han sido empleadas contra el catarro y la bronquitis en México, en tanto que *T.*

aeranthos (el “clavel del aire”) es usada como antiespasmódico y para el tratamiento de afecciones oculares en Sudamérica (Hornung-Leoni, 2011).

Dentro de las especies del género *Bromelia*, *B. pinguin* es conocida por sus propiedades medicinales en Centroamérica, Cuba y en algunas regiones de México. Su fruto es usado como antihelmíntico, pero también como diurético y antirreumático. Las hojas de *B. karatas* son utilizadas en algunas regiones de México como antiinflamatorio (Hornung-Leoni, 2011). En Brasil, los frutos de *B. balansae* son usados por la medicina popular como jarabe para la tos (Coelho, 2010) y el jugo de los frutos de *B. fastuosa* (gravatá) para el tratamiento de la bronquitis y el asma (Guimaraes-Ferreira *et al.*, 2007).

El uso medicinal de *Ananas comosus* trasciende a las comunidades latinoamericanas asentadas en las regiones en las cuales es autóctona. Desde los tiempos de la colonización la pulpa se empleaba por las comunidades aborígenes para tratar parasitosis intestinales, acción que fue sustentada por los médicos europeos de la época (Patiño, 2002). También ha sido utilizada como coadyuvante de la digestión (Hornung-Leoni, 2011).

El extracto obtenido a partir de *A. comosus*, conocido como bromelina o bromelaína, es comercializado desde mediados de la década del '50 y desde entonces se han publicado numerosos trabajos científicos en relación a sus propiedades terapéuticas: antiinflamatoria, antitrombótica, fibrinolítica, antitumoral, antimetastásica, inmunomodulador, promotora de la absorción de antibióticos, debridante de heridas y cicatrizante (Maurer, 2001). La bromelina ha sido usada como agente antiinflamatorio y antiedematoso en casos de artritis, lesiones deportivas, traumatismos, edema posquirúrgico, quemaduras y como complementario a la quimioterapia (Bhui, 2012). Actualmente la bromelina es un producto medicinal popular para el tratamiento de la inflamación y trastornos digestivos (Hornung-Leoni, 2011). Es de libre venta en farmacias y tiendas naturistas, principalmente de Estados Unidos de América y países de Europa, como un producto médico sin licencia (Brien *et al.*, 2004). La Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (Food and Drug Administration, FDA) considera a la bromelina dentro del subcapítulo correspondiente a los alimentos para consumo humano y en tal carácter es categorizada como GRAS (Generally Recognized as Safe). No hace referencia a su utilización como medicamento (FDA, 2012). Por su parte la Agencia Europea de Medicinas (European Medicines Agency), ha aprobado muy recientemente un producto conteniendo bromelina para su uso como debridante de las escaras producidas como consecuencia de quemaduras (European Medicines Agency, 2012).

Si bien los extractos obtenidos tanto a partir de tallos como de frutos de *A. comosus* son una mezcla compleja de fosfatasa, glucosidasas, peroxidasa, celulasas, inhibidores, glicoproteínas y carbohidratos (todos poco caracterizados), los componentes responsables de sus acciones antihelmíntica, antiedematosa, antiinflamatoria, fibrinolítica, antitrombótica,

antitumoral, debridante de heridas, así como aceleradora de la cicatrización de heridas, parecieran ser las proteasas cisteínicas presentes en grandes cantidades (Maurer, 2001; Salas *et al.*, 2008).

1.3. Tipos de Proteasas, Distribución y Rol en los Vegetales

1.3.1. Proteasas. Tipos y sistemas de clasificación

Se conoce como *proteasas* a las enzimas que catalizan la degradación de las proteínas (*proteólisis*) mediante la adición de una molécula de agua en los enlaces peptídicos. Aunque el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular³ (NC-IUBMB) ha recomendado usar el término *peptidasa* para referirse a estas enzimas, en trabajos recientes se siguen utilizando alternativamente las denominaciones *proteasa*, *enzima proteolítica* o *proteínasa*, por lo que en la presente tesis usaremos estos términos indistintamente.

Un sistema de nomenclatura y clasificación de proteasas es fundamental para el manejo de la información. A pesar de que existe una gran variedad de proteasas distribuidas en los siete reinos (*Archaea*, *Bacteria*, *Protozoa*, *Fungi*, *Planta*, *Animalia* y *Virus*) que cumplen roles fisiológicos muy distintos, la existencia de características comunes permitió establecer sistemas de clasificación. Estos se basan en: los mecanismos catalíticos, las regiones de la cadena polipeptídica sobre las que actúan, las relaciones evolutivas y la homología de sus secuencias.

Antes del establecimiento de un organismo reconocido internacionalmente que fijara pautas de clasificación y nomenclatura para las enzimas, Hartley (1960) propuso clasificar las proteasas teniendo en cuenta su mecanismo catalítico. Este criterio dio lugar a cuatro clases o tipos catalíticos de peptidasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. La denominación hace referencia al grupo químico del sitio catalítico responsable de la actividad enzimática: serina, cisteína, ácido aspártico e ión metálico (frecuentemente Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), respectivamente. Más recientemente fueron incorporados otros dos tipos: las peptidasas glutámicas (Kakudo *et al.*, 1992) y treonínicas (Barrett *et al.*, 1998).

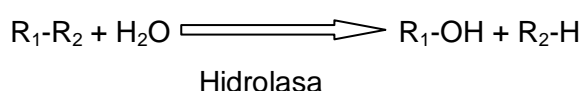
No obstante estas diferencias, los seis tipos catalíticos se pueden agrupar en dos categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas), donde el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina, cisteína o treonina, respectivamente) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (peptidasas aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas), siendo responsable del ataque nucleofílico una molécula de agua activada.

³ <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>

1.3.1.1. Sistema EC de clasificación de enzimas

En 1961 quedó establecido el sistema de clasificación y nomenclatura de enzimas de la Comisión Internacional de Enzimas (Enzyme Commission, EC), actualmente NC-IUBMB. Basándose en el tipo de reacción que catalizan, la EC agrupó las enzimas en seis clases y les asignó un código numérico: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6).

Dentro de la clase 3 (hidrolasas) se agrupan las enzimas que catalizan la reacción de escisión de un enlace mediante la adición de una molécula de agua. Los productos de esta reacción son dos moléculas, a una de las cuales se ha unido el hidrógeno y a la otra el hidroxilo, provenientes ambos de la hidrólisis del agua.



Las enzimas de la clase 3 se subagrupan en función del enlace químico sobre el que actúan. Así, si el enlace entre R_1 y R_2 es el grupo amida de la unión peptídica, las hidrolasas que catalizan tal reacción son peptidasas y pertenecen a la subclase 3.4 (EC 3.4), la que a su vez se divide en catorce sub-subclases, como se muestra en la Tabla 1.2.

	Sub-subclases	Descripción	Cantidad	%
Exopeptidasas	EC 3.4.11	Aminopeptidasas	26	7,6
	EC 3.4.13	Dipeptidasas	11	3,2
	EC 3.4.14	Di- y tri-peptidil-peptidasas	8	2,3
	EC 3.4.15	Peptidil-dipeptidasas	4	1,2
	EC 3.4.16	Carboxipeptidasas Tipo Serina	4	1,2
	EC 3.4.17	Metalocarboxipeptidasas	20	5,8
	EC 3.4.18	Carboxipeptidasas Tipo Cisteína	1	0,3
	EC 3.4.19	Omega peptidasas	11	3,2
Endopeptidasas	EC 3.4.21	Endopeptidasas Serínicas	98	28,5
	EC 3.4.22	Endopeptidasas Cisteínicas	98	28,5
	EC 3.4.23	Endopeptidasas Aspárticas	41	11,9
	EC 3.4.24	Metaloendopeptidasas	20	5,8
	EC 3.4.25	Endopeptidasas Treonínicas	2	0,6
	EC 3.4.99	Endopeptidasas de mecanismo desconocido	0	0
	Total		344	100

Tabla 1.2. Sub-subclases de peptidasas (3.4) según el sistema EC (Consultado 12/11/2012)

Las peptidasas EC 3.4.11 a EC 3.4.19 son exopeptidasas, mientras que las EC 3.4.21 a EC 3.4.25 y EC.3.4.99 son endopeptidasas. Las exopeptidasas hidrolizan secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo (carboxipeptidasas), amino (aminopeptidasas) o extremos sustituidos, ciclados o unidos por uniones

isopeptídicas (omegapeptidasas). Las que atacan el N-terminal pueden liberar un único residuo aminoacídico (aminopeptidasas, EC 3.4.11) o un di- o tripéptido (di- y tripeptidil-peptidasas, EC 3.4.14). A su vez las que actúan sobre el C-terminal pueden liberar un único amino ácido (carboxipeptidasas, EC 3.4.16-18) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, EC 3.4.15)

Las endopeptidasas hidrolizan las uniones peptídicas internas de la proteína y si actúan sobre pequeños péptidos se denominan genéricamente oligopeptidasas (Barrett, 2001).

Como puede observarse, la clasificación propuesta por Hartley quedó incorporada en el sistema EC. Las carboxipeptidasas se agrupan según el mecanismo catalítico en metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17), seríncarboxipeptidasas (EC 3.4.16) y cisteíncarboxipeptidasas (EC 3.4.18), mientras que las endopeptidasas se agrupan en serínicas (EC 3.4.21), cisteínicas (EC 3.4.22), aspárticas (EC 3.4.23), treonínicas (EC 3.4.25) y metaloendopeptidasas (EC 3.4.24)

1.3.1.2. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas

Desde mediados del siglo XX a la actualidad, la Biología Molecular (BM) ha aportado conocimientos no sólo referentes a los mecanismos de acción de las enzimas, sino también a sus estructuras. La posibilidad de conocer las secuencias de aminoácidos de las proteínas, así como su conformación espacial, permitió establecer nuevos criterios de clasificación de las enzimas, que a su vez, a la luz del Dogma Central de la BM, refleja las relaciones evolutivas entre ellas.

Así, Rawlings y Barrett (1993), haciendo uso del gran número de secuencias aminoacídicas de las que disponían, dieron a conocer un nuevo sistema de clasificación de peptidasas basado en las similitudes estructurales de las proteínas. Según el grado de homología las peptidasas fueron agrupadas en familias y éstas a su vez en clanes. Para 1996 este sistema había dado lugar a la base de datos MEROPS⁴. Los tres niveles de clasificación se definen a continuación:

Clan. Es un conjunto de familias cuyas peptidasas tienen un origen evolutivo común que, si bien no llega a evidenciarse por comparación de sus secuencias de aminoácidos, sí por las similitudes de sus estructuras terciarias. Se construye por comparación de las estructuras terciarias y cuando no están disponibles se comparan los ordenamientos de aminoácidos catalíticos en la cadena polipeptídica o las secuencias aminoacídicas alrededor de los aminoácidos catalíticos.

Familia. Se construye por comparación de la estructura primaria. Está constituida por peptidasas cuyas secuencia de aminoácidos, que debe incluir la secuencia de la “unidad

⁴ <<http://merops.sanger.ac.uk>>

peptidasa” (región de la proteína responsable de la actividad catalítica) presentan similitudes estadísticamente significativas.

Peptidasa. Cada proteína con actividad peptidasa recibe un nombre y un identificador (ID MEROPS). Se diferencian por su estructura, función biológica, sustrato, mecanismo catalítico y origen genético.

Dentro de algunas familias se han detectado dos o más grupos de peptidasas con suficientes diferencias como para constituir una subfamilia. Del mismo modo, algunos clanes han sido divididos en subclanes que contienen familias que evidencian una muy antigua divergencia.

El sistema MEROPS también tuvo en cuenta la clasificación de Hartley, ya que en la asignación de los identificadores a las familias, clanes y peptidasas se usaron letras que hacen referencia al tipo catalítico de las peptidasas que las integran: S (serínicas), C (cisteínicas), T (treonínicas), A (aspárticas), G (glutámicas), M (metalopeptidasas), N (asparagínicas) y U (mecanismo desconocido).

La letra P es utilizada para identificar clanes que contienen familias de peptidasas de más de un tipo catalítico. El identificador de un clan se completa con una segunda letra mayúscula, asignada secuencialmente (por ejemplo, clan CA), y el identificador para una familia es completado con un número (por ejemplo, C1, la familia de la papaína). El identificador MEROPS para cada peptidasa individual comienza con el identificador de familia y se completa con un número decimal (por ejemplo, C01.005 para bromelina de tallo). La versión 9.7 de la base de datos, actualizada al 1º de octubre de 2012, cuenta con 320.834 secuencias, de las cuales 113.968 corresponden a peptidasas serínicas, 118.637 a metalopeptidasas, 52.745 a peptidasas cisteínicas, 14.225 a peptidasas aspárticas, 11.439 a peptidasas treonínicas, 338 a peptidasas glutámicas, 3.222 a peptidasas asparagínicas, 6.256 a peptidasas de tipo catalítico desconocido y 4 inclasificables. La base contiene además 520 estructuras (Rawlings *et al.*, 2012).

1.3.2. Distribución de Proteasas en los Seres Vivos

En la Tabla 1.3 se consigna la distribución de las familias de proteasas en 8546 organismos de los distintos reinos. Dentro del reino vegetal la mayoría de las familias están constituidas por peptidasas del tipo metaloproteasas (34/101), serínicas (22/101) y cisteínicas (20/101). Sin embargo, el mayor número de peptidasas registradas son las serínicas (29%) seguidas por las aspárticas (25%) y las cisteínicas (24%). La mayoría de las proteasas cisteínicas en plantas pertenecen a la familia de la papaína (C1).

Tipo de peptidasas	Reino						
	Bacteria	Archaea	Protozoa	Fungi	Planta	Animalia	Virus
Aspárticas	9	5	6	6	9	7	4
Cisteínicas	27	11	20	16	20	22	30
Glutámicas	2	1	-	1	-	-	1
Metalopeptidasas	62	34	32	34	34	33	14
Serínicas	25	18	20	16	22	25	18
Treonínicas	1	1	1	1	1	1	-
Asparagínicas	3	-	-	-	-	-	6
Distintos Tipos	20	13	15	13	14	18	25
Mecanismo Desconocido	7	4	2	1	1	3	2
Totales	156	87	96	88	101	109	100

Tabla 1.3. Distribución de familias de peptidasas de organismos de diferentes reinos en el sistema propuesto por MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>, consultado 12/11/2012).

1.3.3. Rol de las peptidasas en los vegetales

La proteólisis es vital para las células. Por un lado es necesaria para el recambio proteico, permitiendo que proteínas dañadas, mal plegadas o innecesarias sean eliminadas, a la vez que los aminoácidos liberados sean utilizados para la síntesis de nuevas proteínas. Por otro lado la degradación proteica en sitios específicos es una de las modificaciones postraduccionales necesaria para que las proteínas sean funcionalmente activas, por ejemplo para la activación de proenzimas, o bien permitiendo el ensamblado de proteínas y su direccionamiento hacia distintos compartimientos celulares. La degradación proteica también sirve como mecanismo de control celular si el sustrato son proteínas regulatorias.

La principal vía proteolítica en las células eucariotas está mediada por el sistema ubiquitina/proteasoma: la proteína que debe ser degradada es marcada por unión a la ubiquitina facilitando la dirección al complejo proteasomal, efector de la hidrólisis.

En las plantas el recambio proteico es considerado fundamental para el crecimiento. Ejemplos de ello son la degradación de proteínas de reserva durante la germinación de las semillas o la removilización de proteínas luego de la senescencia foliar, con la relocalización de fuentes de N en los órganos reproductivos. Más recientemente, con la asociación encontrada entre el sistema ubiquitina/proteasoma y la embriogénesis, la fotomorfogénesis, los ritmos circadianos, el desarrollo de flores y tricomas, así como la señalización hormonal, la degradación selectiva de proteínas ha tomado relevancia como mecanismo de regulación de numerosos procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas (Schaller, 2004).

En *Arabidopsis thaliana*, la primer planta en tener su genoma completamente secuenciado, se han encontrado más de 600 genes de proteasas de todos los tipos catalíticos, a excepción de las glutámicas, además de 1300 genes asociados con el sistema ubiquitina-proteasoma (Schaller, 2004). Puesto que *Arabidopsis* es tomada como modelo para el estudio fitobiológico, la falta de exclusividad del sistema proteasomal en la

degradación proteica podría ser extensible a otras especies vegetales. El análisis en alrededor de cien genomas ha demostrado que aproximadamente un 2% de todos los productos génicos son peptidasas, evidenciándose así que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más grandes e importantes (Barrett *et al.*, 2004).

En el trabajo de revisión y actualización sobre el rol regulatorio de proteasas vegetales, Schaller (2004) cita referencias sobre proteasas (de todos los tipos catalíticos, a excepción de las treonínicas y las glutámicas) claves para varios procesos biológicos de las plantas, destacándose las funciones en: la degradación proteica y movilización de nitrógeno durante la germinación de las semillas y la senescencia foliar, el procesamiento de proteínas de reserva durante su acumulación en semillas, diferentes eventos de la muerte celular programada (iniciación, regulación y autólisis), la resistencia a insectos y patógenos, la digestión de insectos en plantas carnívoras, la señalización por brasinoesteroides y en la regulación de procesos de desarrollo y crecimiento tales como la diferenciación xilemática, la densidad de estomas y la formación lateral de raíces, del patrón embrionario y del meristema apical, entre otros.

1.3.3.1. Peptidasas cisteínicas

Según el sistema MEROPS las peptidasas cisteínicas están distribuidas en 76 familias, agrupadas en 13 clanes. Dentro del reino *Planta* las proteasas cisteínicas son una de las más conocidas, por ser el tipo catalítico en que se centraron los primeros estudios sobre proteasas vegetales. En las plantas, la mayoría de las proteasas cisteínicas pertenecen a las familias de la papaína (C1) y la legumaína (C13) (Schaller, 2004).

A nivel subcelular las proteasas cisteínicas se localizan en vacuolas y en la pared celular (Grudkowska & Zagdańska, 2004); sin embargo, actividad tipo caspasa en plantas ha sido detectada en el citosol pero no en vacuolas (Korthout *et al.*, 2000). En cuanto a su distribución en la planta, se han encontrado proteasas en prácticamente todos los órganos vegetales (Salas *et al.*, 2008).

Durante la maduración de las semillas, las proteínas de reserva son sintetizadas como precursores que deben ser procesados para su ensamblado y acumulación (Jung *et al.*, 1998). Ese procesamiento ha sido atribuido a proteasas tipo legumaínas, conocidas como enzimas de procesamiento vacuolar (VPE) (Hara-Nishimura *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 1999). Por otro lado, dentro de las proteasas responsables de la degradación y movilización de proteínas de reserva, las cisteínicas son las más abundantes e incluye, además de las legumaínas a las del tipo papaína (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Una característica de las proteasas cisteínicas es que responden a estímulos internos y externos. Ante el estrés abiótico, la sequía y el shock térmico, algunas proteínas son dañadas o innecesarias, haciéndose imprescindible la síntesis de nuevas proteínas. Este

recambio proteico conlleva un considerable aumento en la síntesis de proteasas cisteínicas, hecho demostrado en las hojas de trigo ante el déficit de agua. Por otra parte, los aminoácidos liberados actúan regulando la presión osmótica celular. La inducción de proteasas cisteínicas, principalmente tipo papaína y tipo caspasas, acompaña la muerte celular programada, la cual está asociada con procesos de desarrollo y diferenciación vegetal tales como la xilogénesis y la senescencia, así como también con las respuestas de defensa (Grudkowska & Zagdańska, 2004)

Algunas proteínas vegetales han sido clasificadas como proteínas “prescindibles” puesto que algunas especies pueden sobrevivir sin ellas mientras que otras especies o variedades dentro de la misma especie las producen en elevadas cantidades, siendo poco claro su rol fisiológico en la planta. Dentro de esta categoría entran las proteasas presentes en cantidades extremadamente altas, principalmente en látex y frutos, características de ciertas familias (Caricaceae, Bromeliaceae y Moraceae), dado que si bien podrían desempeñarse en la defensa contra la invasión de patógenos, no se explica la variedad de contenido proteolítico entre especies altamente relacionadas (Adams & Rinne, 1981). En estos casos las actividades proteolíticas detectadas son al menos dos órdenes de magnitud mayores que las actividades encontradas en tejidos comparables de la mayoría de otras plantas (Glazer & Smith, 1971). Puesto que la síntesis, acumulación y utilización de las proteínas “prescindibles” ocurre en determinados períodos que podrían estar relacionados con estadios del desarrollo de la planta, se les ha asignado un posible rol como metabolitos secundarios (Adams & Rinne, 1981). La sorprendente similitud bioquímica (elevada estabilidad, amplia especificidad y baja tendencia autolítica) de las proteasas cisteínicas muy abundantes no indicaría un ancestro común, sino más bien una convergencia evolutiva como resultado de una función defensiva común (Boller, 1986).

La actividad de proteasas cisteínicas frente a diferentes estímulos puede ser elevada al 90% de la actividad proteolítica total (Grudkowska & Zagdańska, 2004). En el caso de *Carica papaya* L. se ha demostrado que la producción de heridas repetidas en los frutos aumentan la cantidad de proteínas y la actividad proteolítica en el látex de la papaya, lo cual está acorde con el posible rol de estas proteasas en la defensa de la planta (Azarkan *et al.*, 2006).

El papel desempeñado por las proteasas en las respuestas de defensa en plantas desencadenadas por patógenos y pestes está comenzando a aclararse. No sólo intervendrían en la ejecución directa del patógeno, como es el caso de la papaína y otras proteasas tipo papaína, sino también en la percepción por parte del organismo defensor y en las cascadas de señalización involucradas con las respuestas de defensa (van der Hoorn & Jones, 2004).

1.4. Enzimas Proteolíticas de *Bromeliaceae*

Varias especies de la familia Bromeliaceae se caracterizan por poseer endopeptidasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias (Barrett, 2001). A pesar del elevado número de integrantes de la familia Bromeliaceae es muy reducido el número de géneros, todos pertenecientes a la subfamilia Bromelioideae, que han sido estudiados hasta la fecha en busca de enzimas proteolíticas (*Ananas*, *Bromelia*, *Hohenbergia* y *Pseudananas*), siendo *Ananas comosus* L. (el “ananá” o “piña”) la especie más estudiada, a partir de cuyos tallos se obtiene la bromelina (Heinicke & Gortner, 1957). Otras proteasas de Bromeliaceae que han sido aisladas y caracterizadas incluyen a la hemisfericina, a partir de frutos de *Bromelia hemispherica* (Agundis *et al.*, 1977; Ochoa *et al.*, 1987), pinguina, obtenida de frutos de *Bromelia pinguin* (Toro-Goyco *et al.*, 1980; Abreu Payrol *et al.*, 2008), karatasina, aislada de frutos de *Bromelia plumieri* (Montes *et al.*, 1990), macrodontaína I y II de frutos inmaduros de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Brullo *et al.*, 1994, Natalucci *et al.*, 1996, López *et al.*, 2000 y 2001; Brullo, 2003); balansaína I de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2000); hieronymaina I, II y III aisladas de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez (Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008), fastuosaína, extraída de frutos inmaduros de *Bromelia fastuosa* (Cabral *et al.*, 2006) y penduliflorain I, obtenida a partir de frutos de *Hohenbergia penduliflora* (Pérez *et al.* 2010). También se han aislado proteasas de frutos de otras especies de *Bromelia*: *B. serra* (Caffini *et al.*, 1988), *B. laciniosa* (Buttazzoni *et al.*, 1984; Priolo *et al.*, 1986), *B. palmeris* y *B. sylvestris* (Cruz *et al.*, 1974; Hernández Arana *et al.*, 1983).

Dado que el presente trabajo de tesis doctoral está centrado en el estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de las proteasas presentes en frutos de *Bromelia hieronymi*, *B. balansae* y *Pseudananas macrodontes* en comparación con la bromelina, a continuación se brinda un resumen de las principales características bioquímicas de las proteasas aisladas a partir de esos materiales.

1.4.1. Endopeptidasas del ananá

Las endopeptidasas del ananá son de tipo cisteínicas y pertenecen a la superfamilia de la papaína (C01). Conocidas en su conjunto como “bromelina”, término que se ha reemplazado en los últimos años por “bromelaína”. En el presente trabajo se utilizará indistintamente cualquiera de los dos términos. Rowan *et al.* (1990) denominan “bromelaína de tallo” a la principal endopeptidasa del tallo de ananá y “bromelaína de fruto” a la principal endopeptidasa de fruto. Adicionalmente dos endopeptidasas menores (ananaína y comosaína) fueron separadas del tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988, 1990). Actualmente, y

en base a estudios genéticos, se considera que existen dos tipos de bromelinas de fruto, denominadas “m-tipo 1” y “m-tipo 2” (Rawlings *et al.*, 2008).

1.4.1.1. Bromelina de tallo

La bromelina de tallo (EC 3.4.22.32) es la proteasa predominante (casi el 90%) en los extractos de tallos de *Ananas comosus* y se trata de una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa (Harrach *et al.*, 1995) con un punto isoeléctrico (pI) de 9,55 (Murachi, 1970), conteniendo siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995) y tres puentes disulfuro. La secuencia aminoacídica completa ha sido deducida por Ritonja *et al.* (1989), siendo su masa molecular de 22.831 Da. Para expresar su máxima actividad la enzima requiere la presencia de agentes reductores tales como cisteína. El pH óptimo, tanto con sustratos sintéticos como proteicos es amplio (Rowan & Buttle, 1994). A pesar de su elevada actividad sobre distintos sustratos proteicos, actúa eficientemente sobre sustratos sintéticos que contengan uniones Arg-Arg (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994). También se ha comunicado una cierta preferencia de la enzima por aminoácidos polares en las posiciones P1 y P1'⁵ (Napper *et al.*, 1994). Una característica distintiva de esta proteasa es su relativamente débil inhibición por E-64 y la carencia de inhibición por cistatina de pollo, lo que la diferencia de la mayoría de las peptidasas de la familia C1 (Rowan *et al.*, 1990).

1.4.1.2. Ananaína

Rowan *et al.* (1988) lograron purificar una enzima distinta a la bromelina de tallo, a la que denominaron ananaína (EC 3.4.22.31) y que representa el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo de ananá. A diferencia de la bromelina de tallo, la ananaína muestra baja preferencia por sustratos sintéticos que contengan Arg-Arg y alta actividad frente a Z-Phe-Arg-NHMec y a Bz-Phe-Val-Arg-NHMec. Ananaína muestra mayor preferencia por aminoácidos polares en la posición P1', mientras que el requerimiento para el sitio P1 es mucho menos específico (Napper *et al.*, 1994), en tanto que en el sitio P2 manifiesta preferencia por una cadena lateral hidrofóbica (Rowan *et al.*, 1990). El pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es cercano a la neutralidad (Rowan & Buttle, 1994). Ananaína no es glicosilada, está formada por una cadena proteica simple de 23,5 kDa (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995), y su pI es > 10 (Rowan *et al.*, 1988; Harrach *et al.*, 1995). También contiene siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994). La secuencia primaria de ananaína ha sido determinada, comprobándose que incluye un inserto entre los residuos 170 y 174 que no está presente en bromelina de tallo ni en

⁵ En el modelo ideado por Schechter y Berger (1967) para describir la especificidad de corte de las peptidasas, los residuos de aminoácido del sustrato (P) se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el extremo N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc. Los subsitios de la proteasa actúan acomodando los residuos del sustrato y se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3', respectivamente.

papaína y una serie de aminoácidos hidrofóbicos adyacentes a la His-157 (Lee *et al.*, 1997). El comportamiento de la enzima frente a los inhibidores es similar al de la papaína, ya que es eficientemente inhibida tanto por cistatina de pollo como por E-64 (Rowan *et al.*, 1988).

1.4.1.3. Comosaína

Comosaína es la endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de ananá y representa menos del 1% de las proteínas totales. Se trata de una glicoproteína de 24,5 kDa y $pI > 10$, conteniendo siete residuos Cys y tiene una composición similar en carbohidratos a la bromelina de tallo, pero es marcadamente diferente en su composición aminoacídica (Napper *et al.*, 1994). Tiene actividad sobre Z-Arg-Arg-NHMec (Rowan *et al.*, 1990), muestra preferencia por residuos polares tanto en el sitio P1 como P1' y es inhibida por E-64 (Napper *et al.*, 1994).

1.4.1.4. Bromelina de fruto

La preparación denominada “bromelina de fruto” (EC 3.4.22.33) constituye el 30-40% de las proteínas totales del fruto, representa casi el 90% del material proteolíticamente activo (Murachi, 1970) y al igual que la bromelina de tallo, tiene un amplio pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos (Rowan & Buttle, 1994). Se trata de una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 25 kDa (Rowan *et al.*, 1990), cuyo pI es 4,6 y parece no tratarse de una glicoproteína (Ota *et al.*, 1985). La secuencia N-terminal es idéntica a la de bromelina de tallo (Yamada *et al.*, 1976), pero es inmunológicamente distinta de ésta y de ananaína (Rowan *et al.*, 1990). Tiene preferencia por el sustrato sintético Bz-Phe-Val-Arg-NHMec y no por Z-Arg-Arg-NHMec, lo que la diferencia de la bromelina de tallo (Rowan *et al.*, 1990).

1.4.2. Balansaína

Utilizando frutos semimaduros de *Bromelia balansae* Mez, Natalucci *et al.* (1988) obtienen una preparación proteolítica activa en un rango de pH amplio (6,0–9,5) que se resuelve en tres fracciones proteolíticamente activas por cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente, Pardo *et al.* (2000) estudiaron las proteasas presentes en frutos en distintos estadios de maduración, determinándose un aumento en el número de proteínas con diferente pI y un incremento en el contenido de proteínas totales y de azúcares a medida que avanza el grado de madurez. La actividad caseinolítica y la actividad específica fueron mayores en los estadios de menor madurez. Mediante purificación parcial por precipitación etanólica lograron retener el 92 % de la actividad enzimática y el 83 % de las proteínas iniciales, eliminándose el 45 % de los azúcares contenidos en el extracto crudo. Dicha preparación mostró alta estabilidad térmica, conservándose un 80% de actividad

proteolítica luego de ser incubada durante 2 h a 45 °C. Una banda activa de pI 5,5 (balansaína I) se encontró en cantidades apreciables durante todo el proceso de maduración, mientras que otra banda activa, de pI 8,7 (balansaína II) sólo pudo encontrarse en cantidades apreciables en frutos maduros, tratándose en ambos casos de cisteínendopeptidasas.

El peso molecular de Balansaína I determinado por espectrometría de masas (MALDI-TOF) fue de 23.192 Da y por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue 24,4 kDa; su pH óptimo frente a caseína fue 8,7 y conservó más del 80% de actividad en el rango de pH 5,8 a 10,0. Balansaína I mostró preferencia por los derivados Ala y Gln de N- α -CBZ-*p*-Nitrofenil ésteres de aminoácidos, seguido por los de Gly, Tyr y Leu. La secuencia N-terminal muestra gran similitud con las proteasas del ananá (Pardo *et al.* 2000).

1.4.3. Hieronymaínas

A partir de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez Bruno *et al.* (2002) obtienen extractos parcialmente purificados por precipitación acetónica (PAR) y etanólica (PER), conteniendo alta cantidad de proteínas (91% en el PAR y 79% en el PER) y de actividad caseinolítica (90% en el PAR y 83% en el PER) respecto al extracto crudo de partida, mientras se eliminan la mayor parte de azúcares y fenoles. Las enzimas presentes resultaron ser cisteínendopeptidasas. Los preparados conservaron más del 90% de la actividad original cuando fueron preincubados a 37 °C y 55 °C durante 2 h y mostraron actividad en un amplio rango de pH, alcanzando el 80% de la actividad máxima entre los pH 7 y 10. Mediante isoelectroenfoque (IEF) se logran separar 6 bandas de pI 5,9; 6,4; 7,6; 8,3 y > 9,3.

1.4.3.1. Hieronymaína I

Desde frutos inmaduros de *B. hieronymi*, Bruno *et al.* (2003) logran aislar una fracción a la que denominan “hieronymaína I” (pI >9,3) cuya homogeneidad fue confirmada por MALDI-TOF, donde mostró una masa molecular de 24.066 Da, por SDS-PAGE, mostrando una banda de 25 kDa y por IEF. La enzima, de tipo cisteínica, presentó una actividad caseinolítica máxima en el rango de pH 8,5-9,5 y fue completamente inhibida por E-64 y ácido iodoacético, mientras que se incrementó por la adición de cisteína 20 mM.

1.4.3.2. Hieronymaína II

A partir del mismo material Bruno *et al.* (2006) purifican una segunda proteasa cisteínica (hieronymaína II) cuya homogeneidad fue confirmada por MALDI-TOF-TOF, mostrando un peso molecular de 23.411 Da, y por SDS-PAGE con un peso molecular de 25

kDa, aunque por IEF se observaron dos isoformas de pI 7,6 y 8,3. La actividad caseinolítica máxima fue detectada en el rango de pH entre pH 7,5-9,0.

1.4.3.3. Hieronymaína III

Una tercera endopeptidasa cisteínica (hieronymaína III) fue purificada desde frutos inmaduros de *B. hieronymi* (Bruno *et al.*, 2008), cuyo pH óptimo sobre caseína se encuentra en el rango de pH 8,6-9,3. La masa molecular determinada por SDS-PAGE fue de 25 kDa y por espectrometría de masas de 23.713 Da. Mediante IEF se observaron dos bandas, de pI 5,9 y 6,4.

La actividad de las tres endopeptidasas frente a sustratos sintéticos mostró diferencias significativas. Sólo hieronymaína I pudo degradar PFLNA (un sustrato común para proteasas de ananá). Z-Phe-Arg-p-nitroanilida fue hidrolizado por hieronymaína I y II, mientras que Z-Arg-Arg-p-nitroanilida, el sustrato sobre el que tiene alta afinidad bromelina de tallo y comosaína, fue degradado sólo por hieronymaína III. Además, las tres endopeptidasas mostraron diferentes especificidades sobre 5 de los 13 sustratos N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos ensayados: el derivado de Ala fue preferido por hieronymaína I y II, seguido por Gly y Asp, respectivamente; mientras que hieronymaína III clivó preferentemente el derivado de Lys, seguido por Asp (Bruno *et al.*, 2008).

La comparación de la secuencia de los N-terminales de hieronymaína II y III mostró gran similitud entre sí (93%) y con las de la bromelina de tallo, bromelina de fruto, comosaína, ananaína y balansaína I (70-90%) (Bruno *et al.*, 2006, 2008). Mientras que la secuencia del N-terminal de hieronymaína I mostró una similitud del orden del 70% con la de hieronymaína II y balansaína I y del 60% con las de hieronymaína III, bromelina de tallo, ananaína y comosaína (Bruno *et al.*, 2003, 2008).

1.4.4. Macrodontaínas

A partir de frutos de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms [= *Pseudananas sagenarius* (Arruda) Camargo] se obtuvo un extracto parcialmente purificado por precipitación acetónica, denominado macrodontaína, el cual fue activo en un amplio rango de pH, obteniéndose valores superiores al 75 % de la actividad máxima entre pH 7,0 y 10,5 (caseína). Macrodontaína fue estable en el rango de pH de máxima actividad así como en condiciones de elevada fuerza iónica. Por el contrario, a diferencia de otras fitoproteasas, macrodontaína no fue demasiado termoestable, ya que la actividad residual se redujo al 50% luego de ser incubada durante 2 h a 45 °C (Brullo, 2003).

Desde macrodontaína se lograron purificar dos endopeptidasas: macrodontaína I, con una masa molecular de 25 kDa (SDS-PAGE) y pI de 6,1, y macrodontaína II, con masa molecular de 27 kDa (SDS-PAGE) y pI de 5,9. Macrodontaína I exhibió un rango de pH

óptimo entre pH 6,1 y 8,5, en tanto que en macrodontaína II fue más estrecho (pH 7,5-8,5). La actividad de ambas proteasas sobre N- α -CBZ-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos mostró mayor afinidad hacia el derivado de Ala, seguido por el de Gln y Tyr. El E-64, inhibidor específico del sitio activo de cisteínproteinasas, exhibió un comportamiento diferencial frente a una y otra proteasa, ya que produjo inhibición prácticamente total de macrodontaína I, pero macrodontaína II conservó un 15% de actividad residual, hecho que podría relacionarse con una diferente geometría del sitio activo como sugieren Ritonja *et al.* (1989) para bromelaína de tallo (Brullo, 2003). Macrodontaína I y II fueron activas frente a Bz-Phe-Val-Arg-NHMec pero no frente a Z-Arg-Arg-NHMec. Las secuencias N-terminales de macrodontaína I y II revelan un 92,6% de identidad entre sí, un 80-90% con comosaína, ananaína, bromelina de tallo y balansaína I (López *et al.*, 2001), un 70-80% con hieronymaína II y III y un 60% con hieronymaína I (Bruno *et al.*, 2008).

Brullo (2003) determinó la estructura primaria de macrodontaína I, que demostró estar compuesta por 213 aminoácidos con un peso molecular calculado de 23.486 Da, valor consistente con el dato aportado por la espectrometría de masas (23.459 Da). La comparación con las secuencias completas de algunas fitoproteasas cisteínicas reveló un alto grado de identidad (alrededor del 70%) con las de *Ananas comosus*: con bromelína de fruto exhibió la mayor similitud (77,0% de identidad), seguida por ananaína (con 71,9% de identidad) y bromelína de tallo (con 67,1% de identidad). Además fue determinado el carácter no glicoprotéico de la enzima. Al igual que en papaína, en macrodontaína I existen 7 residuos Cys, seis de los cuales participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas. Dada la semejanza estructural entre varias proteasas comparadas, se concluye que macrodontaína I integra el Clan CA de las proteasas cisteínicas que lidera papaína (Brullo, 2003).

1.5. Objetivos

Como se ha dicho, el extracto acuoso obtenido del ananá [*Ananas comosus* (L.) Merr.], conocido como bromelina, ha mostrado tener tanto *in vivo* como *in vitro* efectos antiinflamatorio, antitumoral, antitrombótico, entre otras acciones farmacológicas. Pertenece al grupo de proteasas que son administradas oralmente en el tratamiento sistémico contra la inflamación, las enfermedades relacionadas con la coagulación sanguínea y el cáncer. Su baja toxicidad permite que sea bien tolerada en tratamientos largos. Si bien su mecanismo de acción aún no ha sido definitivamente dilucidado, sus efectos farmacológicos son adjudicados principalmente a sus endopeptidasas cisteínicas. Actividades farmacológicas diversas han sido también atribuidas a fitoproteasas de tipo cisteínicas pertenecientes a otras bromeliáceas (*Bromelia fastuosa*) así como a especies pertenecientes a otras familias (*Caricaceae*, *Moraceae*).

Algunas especies de la familia Bromeliaceae, entre ellas *Bromelia hieronymi*, *B. balansae* y *Pseudananas macrodontes*, se caracterizan por producir grandes cantidades de endopeptidasas cisteínicas. Crecen en amplias regiones de nuestro país (NEA y NOA), así como en Brasil, Bolivia, Paraguay y Colombia. Excepto el uso de frutos de *B. balansae* para tratar la tos en una región de Brasil, no se conocen usos medicinales para estas tres especies. A partir de sus frutos se han aislado y caracterizado en el LIProVe varias proteasas de tipo cisteínicas, que sin embargo no han sido objeto de estudios farmacológicos hasta este momento.

Es propósito del presente trabajo aportar al conocimiento en relación a los posibles usos medicinales de especies de bromeliáceas autóctonas de nuestro país no estudiadas aún para dichos fines. Bajo la suposición que las proteasas de *Bromelia hieronymi*, *B. balansae* y *Pseudananas macrodontes*, por pertenecer al mismo tipo catalítico y a la misma subfamilia vegetal, podrían mostrar actividades biológicas similares a las proteasas de *Ananas comosus*, nos planteamos como **objetivo general** de la presente tesis:

- **La búsqueda de posibles efectos farmacológicos de extractos ricos en cisteínendopeptidasas obtenidos de frutos de *Bromelia hieronymi*, *B. balansae* y *Pseudananas macrodontes* y su comparación con bromelina**

Y como **objetivos específicos**:

- **Evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos de *B. hieronymi*, *B. balansae* y *P. macrodontes***
- **Evaluar los efectos de los extractos de *B. hieronymi*, *B. balansae* y *P. macrodontes* sobre algunos de los componentes de la hemostasia**
- **Evaluar los extractos de *B. hieronymi*, *B. balansae* y *P. macrodontes* como posibles agentes antitumorales**
- **Tratar de establecer la posible relación entre los efectos medidos y la actividad proteolítica de las cisteínendopeptidasas estudiadas**

1.6. Referencias

- Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, S.A. Trejo & N.O. Caffini (2008) Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *Protein J.* **27**: 88-96.
- Adams, C.A. & R.W. Rinne (1981) The occurrence and significance of dispensable proteins in plants. *New Phytol.* **89**: 1-14.
- Agundis, C., M. Reyes & F. Córdoba (1977) Hemisphaericin-D, a dialysable and polymerizable protease found in *Bromelia hemisphaerica*. *Experientia* **33**: 867-9.
- ANMAT (2011) Farmacopea Nacional Argentina, VIII Edición, Vol. 3, pp. 361-466 http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/octava_edicion/Tercer_Volumen.pdf.
- Arenas, P. (1997). Las bromeliáceas textiles utilizadas por los indígenas del Gran Chaco. *Parodiana* **10** (1-2): 113-139.
- Arenas, P. (2004) Las bromeliáceas en la vida de los nativos del gran chaco. Actas II Congreso Argentino de Orquideología y Conservación y I Jornadas Argentinas sobre Bromeliáceas. Montecarlo, Misiones, Argentina. Septiembre/2004.
- Azarkan, M., R. Dibiani, E. Goormaghtigh, V. Raussens & D.Baeyens-Volant (2006) The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**: 1063–1072.
- Barrett, A.J. (2001) *Proteolytic enzymes: nomenclature and classification*, en *Proteolytic Enzymes. A practical approach* 2nd ed. (R. Beynon & J.S. Bond, eds.), Oxford University Press, Great Britain, págs. 1-21.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (2004) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2nd edn. Elsevier Academic Press, London.
- Bennett, B.C., C.R. Bell, and R.T. Boulware (1990) Geographic variation in alkaloid content of *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae). *Rhodora* **92**: 57-69.
- Bhui, K., S. Tyagi, A.K. Srivastava, M. Singh, P. Roy, R. Singh, *et al.* (2012) Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G(2)/M arrest to apoptosis. *Mol. Carcinog.* **51**: 231-243.
- Boller, T. (1986) *Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms*. In: Plant Proteolytic Enzymes, Vol. 1 (M. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 67-96.
- Brevoort, P. (1998) The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram* **44**: 33–46
- Bromeliad Society International. *Bromeliaceae* Family (*on-line*). Genera by subfamily (visitado Octubre 2012). Disponible en URL: http://www.bsi.org/brom_info/taxonomy.html.
- Bruno, M.A., M.F. Pardo, N.O. Caffini & L.M.I. López (2002) Purification of a new endopeptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Acta Farm. Bonaerense* **21**: 51-6.
- Bruno, M.A., M.F. Pardo, N. O. Caffini and L.M.I. López. (2003) Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *J. Protein Chem.* **22**: 127-34.

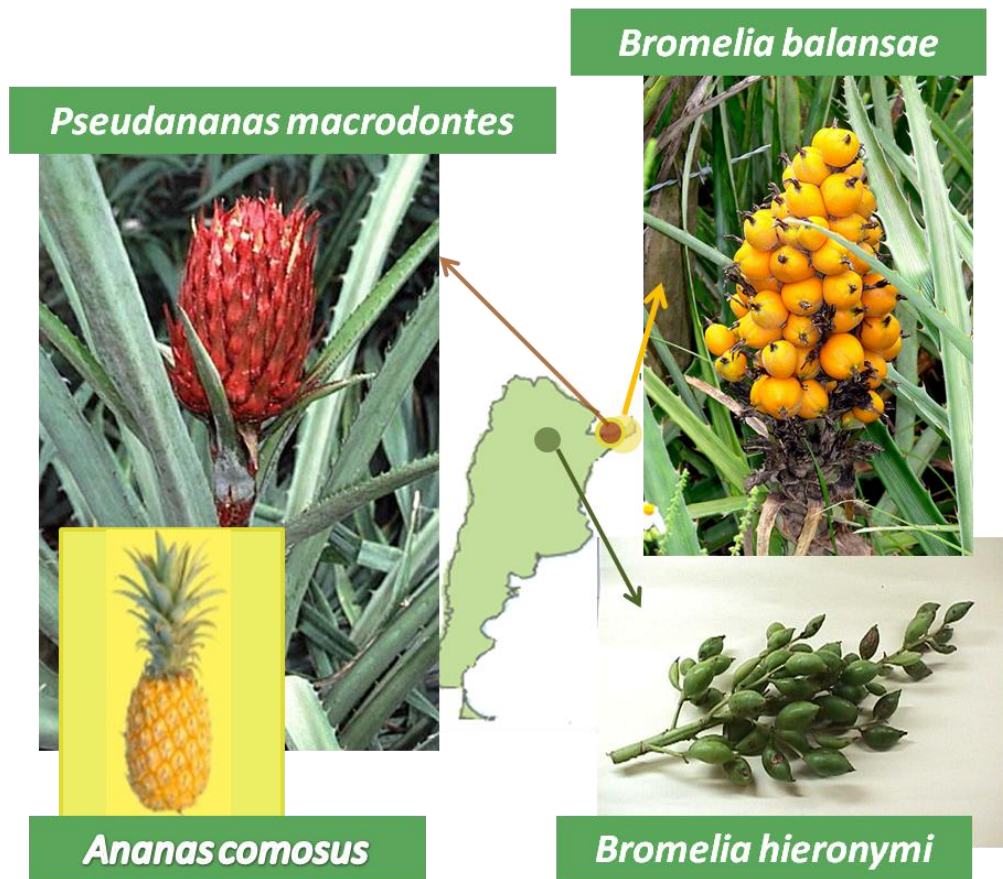
- Bruno, M.A., S.A. Trejo, F.X. Avilés, N.O. Caffini and L.M.I. López (2006) Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez. *Protein J.* **25**: 224-31.
- Bruno, M.A., S.A. Trejo, N.O. Caffini & L.M.I. López (2008) Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *Protein J.* **27**: 426-33.
- Brullo, A. (2003) Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Brullo, A., R. Hilal, C.L. Natalucci & N.O. Caffini (1994) Estudio preliminar de "macrodotina", una nueva cisteinilproteínasa aislada de frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Acta Farm. Bonaerense* **13**: 41-7.
- Buttazzoni, M.S., N.O. Caffini, C.L. Natalucci & N.S. Priolo (1984) Proteasas de Bromeliaceae. I. Estudio preliminar de la fracción proteolíticamente activa presente en frutos de *Bromelia laciniosa* Mart. *Acta Farm. Bonaerense* **3**: 33-8
- Cabral, H., A.M. Leopoldino, E.H. Tajara, L.J. Greene, V.M. Faca, R.P. Mateus, C.R. Ceron, W.A. de Souza Judice, L. Julianod & G.O. Bonilla-Rodriguez (2006) Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein Peptide Lett.* **13**: 83-9.
- Caffini, N.O., C.L. Natalucci, N.S. Priolo & M.S. Buttazzoni (1988) Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb. *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 9-14.
- Calixto, J.B. (2005) Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *J. Ethnopharmacol.* **100**: 131–134
- Coelho, R.G., N.K. Honda, M.C. Vieira, R.L. Brum, F.R. Pavan, C.Q. Leite, *et al.* (2010) Chemical composition and antioxidant and antimycobacterial activities of *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *J. Med. Food.* **135**: 1277-1280.
- Cruz, M.T., M. del C. Oliver, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1974) Proteinasas de plantas mexicanas. I. Determinación de pesos moleculares de proteinasas cisteínicas por concentración de grupos tioles. *Rev. Latinoamer. Quím.* **5**: 18-25.
- European Medicines Agency (2012) European Medicines Agency recommends first medical treatment for removal of eschar from severe burn wounds. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/09/news_detail_001610.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1. Consultado el 8 de octubre de 2012.
- FDA (2012) Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 3, Revised as of April 1, 2012, Sec. 184.1024 Bromelain. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=184.1024>. Consultado el 8 de octubre de 2012.
- Flora del Conosur. Catálogo de las Plantas Vasculares. Disponible en <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/Familias.asp>. Consultado 1 de octubre de 2012.

- Givnish, T.J., M.H. Barfuss, B. Van Ee, R. Riina, K. Schulte, R. Horres, *et al.* (2011) Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* **98**: 872-95.
- Glazer, A.N. & E.L. Smith (1971) *Papain and Other Plant Sulfhydryl Proteolytic Enzymes*. En "The Enzymes", Vol.3, 1971 (P.D. Boyer, ed.), Academic Press-Elsevier, pp. 501-546.
- Grudkowska, M. & B. Zagdańska (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **51**: 609-24.
- Guimaraes-Ferreira, C.A., E.G. Rodrigues, R.A. Mortara, H. Cabral, F.A. Serrano, R. Ribeiro-dos-Santos, *et al.* (2007) Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia* **9**: 723-733.
- Hara-Nishimura, I. T. Kinoshita, N. Hiraiwa & M. Nishimura (1998) Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J. Plant Physiol.* **152**: 668-674.
- Harrach, T., K. Eckert, K. Schulze-Forster, R. Nuck, D. Grunow & H.R. Maurer (1995) Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. Protein Chem.* **14**: 41-52.
- Hartley, B.S. (1960) Proteolytic enzymes, *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
- Heinicke, R.M. & W.A. Gortner (1957) Stem bromelain. A new protease preparation from pineapple plants. *Econ. Bot.* **11**: 225-34.
- Hernández Arana, A., A. Rodríguez Romero, M.T. Cruz y Victoria & L.M. del Castillo (1983) Proteinases of mexican plantas. IX. Structure, relationships and taxonomy. *Rev. Latinoamer. Quím.* **14**: 95-8.
- Hornung-Leoni, C.T. (2011) Avances Etnobotánicos de los usos de Bromeliaceae en Latinoamerica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas BLACPMA*: **10**: 297-314.
- Israelsen, L.D. (1993) *Phytomedicines as a new crop opportunity*. En: *New crops* (J. Janick and J.E. Simon, eds.), pp. 669-671. Wiley, New York.
- Jung, R., M.P. Scott, Y.W. Nam, T.W. Beaman, R. Bassuner, I. Saalbach, *et al.* (1998) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell* **10**: 343-357.
- Kakudo, S., N. Kikuchi, K. Kitadokoro, T. Fujiwara, E. Nakamura, H. Okamoto, M. Shin, M. Tamaki, H. Teraoka & H. Tsuzuki (1992) Purification, characterization, cloning, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *J. Biol. Chem.* **267**: 23782-8.
- Kinoshita, T., K. Yamada, N. Hiraiwa, M. Nishimura & I. Hara-Nishimura (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* **19**: 43-53.
- Knöss, W. & I. Chinou (2012) Regulation of medicinal plants for public health-european community monographs on herbal substances. *Planta Med.* **78**: 1311-1316.
- Korthout, H.A., G. Berecki, W. Bruin, B. van Duijn & M. Wang (2000) The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Lett.* **475**: 139-144.
- Lee, K.L., K.L. Albee, R.J. Bernasconi, & T. Edmunds (1997) Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochem. J.* **327**: 199-202.

- López, L.M.I., C. Sequeiros, C.L. Natalucci, N.O. Caffini, A. Brullo, B. Maras & D. Barra (2000) Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expres. Purif.* **18**: 133-40.
- López, L.M.I., C. Sequeiros, S.A. Trejo, M.F. Pardo, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**: 875-8.
- Maurer, R.H. (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1234-45
- Montes, C., M. Amador, D. Cuevas & F. Córdoba (1990) Subunit structure of karataasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agric. Biol. Chem.* **54**: 17-24.
- Murachi, T. (1970) Bromelain enzymes. *Meth. Enzymol.* **19**: 273-84.
- Napper, A.D., S.P. Bennett, M. Borowski, M.B. Holdridge, M.J. Leonard, E.E. Rogers, Y. Duan, R.A. Laursen, B. Reinhold & S.L. Shames (1994) Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* **301**: 727-35.
- Natalucci, C.L., N.S. Priolo, N.O. Caffini & L.M.I. López (1988) Proteasas de Bromeliaceae. V. Separación y purificación de sulfhidrilproteasas de frutos de *Bromelia balansae* Mez. *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 179-85.
- Natalucci C.L., A. Brullo, L.M.I. López, R.M. Hilal and N.O. Caffini. (1996) Macrodontin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *J. Food Biochem.* **19**: 443-54.
- Ochoa, N., C. Agundis & F. Córdoba (1987) Isolation and partial characterization of *Bromelia hemisphaerica* protease by affinity chromatography. *Prep. Biochem.* **17**: 337-41.
- Okigbo, R.N. & E.C. Mmekaka (2006) An Appraisal of Phytomedicine in Africa. *KMITL Sci. Tech. J.* **6**: 83-94.
- OMS (2002) Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf>.
- Ota, S., E. Muta, Y. Katanita & Y. Okamoto (1985) Reinvestigation of the fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains. *J. Biochem. (Tokyo)* **98**: 219-28.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, C.L. Natalucci, F. Canals, F.X. Avilés & N.O. Caffini (2000) Isolation and Purification of Balansain I, a Plant Protease Isolated from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3795-800.
- Patiño, V.M. (2002) Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotrópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Pérez, A., C. Carvajal, S. Trejo, M.J. Torres, M.I. Martín, J.C. Lorenzo, *et al.* (2010) Penduliflorain I: A Cysteine Protease Isolated from *Hohenbergia penduliflora* (A.Rich.) Mez (Bromeliaceae). *Protein J.* **29**: 225-233.
- Priolo, N.S., M.S. Buttazzoni, N.O. Caffini & C.L. Natalucci (1986) Proteasas de Bromeliaceae III. Condiciones óptimas de acción, estabilidad y purificación de la proteasa aislada de frutos de *Bromelia laciniosa* Mez. *Acta Farm. Bonaerense* **5**: 159-64.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (1993) Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.* **290**: 205-18.

- Rawlings, N.D., F.R., Morton, C.Y. Kok, J. Kong & A.J. Barrett (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**: D320-5.
- Rawlings, N. D., A.J. Barrett & A. Bateman (2012) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**: D343-D350.
- Ritonja, A., A.D. Rowan, D.J. Buttle, N.D. Rawlings, V. Turk & A.J. Barrett (1989) Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* **247**: 419-24.
- Rondina, R.V.D., A.L. Bandoni & J.D. Coussio (2010) Argentine medicinal plants with potential antifungal activity. *Dominguezia* **26**: 31-39.
- Rowan, A.D., D.J. Buttle. & A.J. Barrett (1988) Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 262-70.
- Rowan, A.D., D.J. Buttle & A.J. Barrett (1990) The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.* **266**: 869-75.
- Rowan, A.D. & D.J. Buttle (1994) Pineapple cysteine endopeptidases. *Meth. Enzymol.* **244**: 555-68.
- Salas, C.E., M.T.R. Gomes, M. Hernandez & M.T.P. Lopes (2008) Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry* **69**: 2263-2269.
- Sastre, J. Y. S., V.B. Martín Silva, A.V. Olmos, & V.B. Bajales (2013). "Y las mujeres subían y bajaban del cielo con los hilos del chágua..." La práctica del tejido de chágua en la comunidad wichí de La Loma (Salta). *La zaranda de ideas* **9** : 37-48.
- Schaller, A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**: 183-97.
- Schechter, I. & A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **27**: 157-162.
- Schifter Aceves, L., J. Puerto Sarmiento & P. Aceves Pastrana (2009) Las farmacopeas de México y Estados Unidos en el Nuevo Milenio: paralelismos y divergencias. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **75**: 923-946.
- Smith, L.B. (1934) Geographical evidence on the lines of evolution in the Bromeliaceae. *Botanische Jahrbucher* **66**: 446-8.
- Suárez, M.E. & R.M. Montani (2010) Vernacular knowledge of *bromeliaceae* species among the Wichí people of the Gran Chaco, Argentina. *J. Ethnobiol.* **30**: 265-288.
- Toro-Goyco E., I. Rodríguez-Costas & H. Ehrig (1980) Structural studies on pinguinain. Changes induced by carboxamidomethylation. *Biochim. Biophys. Acta* **622**: 151-9.
- van der Hoorn, R.A.L & J.D.G. Jones (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 400-7.
- Verlet, N. & G. Leclercq (1998) *The production of aromatic and medicinal plants in the Europe Union: an economic database of a development strategy*. First International Symposium, on the conservation of medicinal plants in trade in Europe. Royal Botanical Gardens, Kew, United Kingdom.
- Yamada, F., N. Takahashi & T. Murachi (1976) Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2. *J. Biochem. (Tokyo)* **79**: 1223-34.

2. MATERIAL VEGETAL



2.1. Material Vegetal Utilizado

2.1.1. *Bromelia hieronymi* Mez

Crece en bosques xerófitos de la provincia fitogeográfica chaqueña. Habita desde el SE de Bolivia a través del Chaco paraguayo y argentino, hasta las provincias de Tucumán, Santiago del Estero y Chaco (Arenas, 1997).

Frutos inmaduros fueron recogidos en los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero por el Ing. Lucas Roic de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Santiago del Estero. Un ejemplar de referencia ha sido depositado en el herbario de la División Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. Los frutos fueron lavados, secados al aire y almacenados en freezer a -20 °C hasta su uso.

2.1.1.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de *B. hieronymi* (Bh)

Aproximadamente 50 g de frutos congelados fueron cortados y triturados en una procesadora durante 1 min, en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera, con 250 mL de buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. Luego de filtrar con gasa se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 12000 g. El sobrenadante, que constituye el extracto crudo, se fraccionó y almacenó a -20 °C. Cada una de las etapas mencionadas fue realizada sobre baño de hielo.

A fin de eliminar compuestos fenólicos y la mayoría de los carbohidratos presentes, al extracto crudo mantenido en baño de hielo y en agitación suave se le adicionaron 4 volúmenes de etanol preenfriado a -20 °C. Luego de permitir la precipitación durante 30 min a 4 °C se centrifugó a 12000 g durante 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado fue secado al vacío durante 30 min, el que finalmente fue resuspendido en buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6, liofilizado y almacenado a -20 °C (Bruno, 2007).

2.1.2. *Bromelia balansae* Mez

Frecuente en el sotobosque umbrío, es una planta asociada con el ámbito fluvial. Se distribuye desde Colombia, Amazonia, Centro y Este de Brasil, Región Oriental del Paraguay, hasta Corrientes y Misiones y las zonas ribereñas de Formosa y Chaco en Argentina (Arenas, 1997).

El material estudiado proviene de la Provincia de Misiones (en la proximidad de Posadas, ruta 105, Km 28 a 33, entre los departamentos de San José y Fachinal). La recolección fue llevada a cabo por el Dr. Aníbal Amat, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, donde se encuentra depositado un ejemplar de herbario. Los frutos fueron lavados, secados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

2.1.2.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de *B. balansae* (Bb)

Aproximadamente 40 g de frutos semimaduros congelados fueron cortados y triturados en una procesadora 10 veces durante 10 s (con intervalos de 20 s) con 200 mL de buffer fosfato sódico 0,1M de pH 7 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 12,5 mM. Luego de filtrar la preparación resultante con gasa, se la centrifugó a 12000 g durante 25 min a 4 °C y el sobrenadante resultante, que corresponde al extracto crudo, fue fraccionado y almacenado a -20 °C. Cada una de las etapas mencionadas fue realizada sobre baño de hielo.

Al extracto crudo, mantenido en baño de hielo y con agitación suave, se le agregó un volumen de etanol preenfriado a -20 °C y se lo dejó durante 30 min a 4 °C. Luego se centrifugó a 3000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante, en baño de hielo, fue tratado con 3 volúmenes de etanol preenfriado a -20 °C y luego de dejarlo durante 30 min a 4 °C fue centrifugado a 3000 g durante 30 min a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado fue secado al vacío durante 45 min. Finalmente fue resuspendido con buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6, liofilizado y almacenado a -20 °C (Pardo, 2004).

2.1.3. *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms [= *P. sagenarius* (Arruda) Camargo]

Vegeta en el interior de bosques húmedos y sombríos; es característico en bosques de galería. Se extiende desde el nordeste, centro y este de Brasil, a través del Paraguay Oriental hasta la Mesopotamia argentina. Se halla en toda la cuenca de los ríos Paraguay y Paraná, desde Bolivia hasta la altura del litoral santafecino (Arenas, 1997).

Los frutos, en estado semimaduro, fueron recogidos en Santa Ana, departamento de Candelaria, Provincia de Misiones por el Prof. Aníbal Amat. Un ejemplar de referencia ha sido depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Los frutos fueron lavados, secados al aire y almacenados a -20 °C hasta su uso.

2.1.3.1. Extracto parcialmente purificado de frutos de *P. macrodentes* (Pm)

Aproximadamente 120 g de frutos semimaduros, congelados y desprovistos de semillas y bractéolas, fueron cortados y triturados en una procesadora durante 1 min (en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera) con 200 mL de buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6 conteniendo EDTA y cisteína 5 mM. Luego de filtrar la preparación resultante con gasa, se la centrifugó a 5000 g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante resultante (extracto crudo) fue fraccionado y almacenado a -20 °C. Cada una de las etapas mencionadas fue realizada sobre baño de hielo.

Al extracto crudo, mantenido en baño de hielo y con agitación suave, se le agregó un volumen de etanol preenfriado a -20 °C y se lo dejó durante 30 min a 4 °C. Luego se centrifugó a 12000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante, en baño de hielo, fue luego

tratado con 3 volúmenes de etanol preenfriado a -20 °C y luego de dejarlo durante 120 min a 4 °C fue centrifugado a 12000 g durante 30 min a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado fue secado al vacío durante 30 min. Finalmente fue resuspendido con buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6, liofilizado y almacenado a -20 °C. (Brullo, 2003).

2.1.4. *Ananas comosus* (L.) Merr.

Es una planta perenne nativa de América del Sur, de escaso porte y con hojas duras y lanceoladas de hasta 1 metro de largo; fructifica una vez cada tres años produciendo un único fruto fragante y dulce, muy apreciado en gastronomía (García Suárez & Serrano, 2005).

Los efectos evaluados de los preparados proteolíticos fueron comparados con los de bromelina de tallo comercial (B4882, Sigma Aldrich).

2.1.5. Reactivos químicos

En todos los casos se usó etanol 96° calidad medicinal (Soria), EDTA (Invitrogen), cisteína (Sigma Aldrich) y fosfato sódico pureza 98% (Carlo Erba).

2.2. Caracterización proteolítica de los extractos parcialmente purificados (Bh, Bb y Pm) y de bromelina

2.2.1. Técnicas y metodología

2.2.1.1. Dosaje de la actividad caseinolítica

La preparación del sustrato se realizó suspendiendo 1 g de caseína de leche bovina (Sigma Aldrich) en 100 mL de solución buffer (Tris-HCl 0,1M, pH 8,0); la suspensión se colocó en un baño de agua que se llevó a ebullición y se mantuvo durante 20 min en esas condiciones. La solución resultante se filtró en caliente y una vez enfriada se agregó cisteína 25 mM como activador de proteasas cisteínicas.

La mezcla de reacción se preparó con 1,1 mL de solución de caseína al 1% y 0,1 mL de solución del extracto en estudio. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C y detenida a los 2 min por la adición de 1,8 mL de ácido tricloroacético al 5%, luego de lo cual los tubos fueron centrifugados a 4000 g durante 30 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm, medida a través de una celda de 1 cm de paso. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco, agregando al preparado proteolítico primero el ácido tricloroacético y por último la solución de caseína.

Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (1989) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió para este caso una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica, UCas), que corresponde a la cantidad de enzima requerida para

producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al cabo de 1 min, en las condiciones de ensayo.

2.2.1.2. Cuantificación del contenido proteico

Se utilizó el método de Bradford (1976), basado en que la unión del Coomassie Blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich) en el rango de 0,2-1,2 mg/mL para el ensayo estándar y en el rango de 10-100 µg/mL para el microensayo.

2.2.1.3. Isoelectroenfoque

Las bandas proteicas se determinaron por isoelectroenfoque (IEF) utilizando un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad). Las muestras se precipitaron con 4 volúmenes de acetona durante 30 min y luego de centrifugar a 16000 g durante 15 min el precipitado resultante fue rediseñado con agua bidestilada.

Los geles fueron preparados mezclando 2,0 mL de acrilamida-bisacrilamida (25%⁶T⁶, 3%⁷C⁷), 2,0 mL de glicerol (25% p/v), 0,5 mL de anfólitos Biolyte 3-10 (para Bh, Bb y bromelina) o Pharmalyte 4-6,5 (para Pm), y 5,5 mL de agua; luego que dicha mezcla fue degasificada se adicionaron 3 µL de TEMED y 60 µL de persulfato de amonio al 10%.

Las muestras (1-5 µL) se sembraron y se permitió que difundieran dentro del gel durante 5 min. Los electrodos fueron humedecidos con agua bidestilada y los geles se apoyaron inmediatamente sobre los mismos. El IEF fue llevado a cabo en tres etapas sucesivas: 15 min a 100 V, 30 min a 200 V y finalmente 1 h a 450 V.

Una vez concluida la corrida, los geles fueron sumergidos durante 30 min en solución fijadora (4 g de ácido sulfosalicílico, 30 mL de metanol, 12,5 g de ácido tricloroacético y agua c.s.p. 100 mL). Una vez fijados, los geles fueron tratados durante 2 h con la solución colorante (10 mL de ácido acético glacial, 27 mL de etanol, 40 mg de Coomassie Brilliant Blue R-250, 500 mg de CuSO₄ y agua c.s.p. 100 mL), decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I (7 mL de ácido acético glacial, 12 mL de etanol, 500 mg de CuSO₄ y agua c.s.p. 100 mL) y finalmente sumergidos en solución decolorante II (7 mL de ácido acético glacial, 12 mL de Etanol y agua c.s.p. 100 mL) hasta obtener un fondo claro.

⁶ %T= (g acrilamida+g bisacrilamida) x 100 / volumen total.

⁷ %C= g bisacrilamida x 100 / (g acrilamida+g bisacrilamida).

2.2.1.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para el moldeado de los geles y la realización de la corrida electroforética se empleó el equipo Mini Protean III (Bio-Rad) y se procedió de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) con modificaciones. Los geles se prepararon con poliacrilamida al 16% (Tabla 2.1).

Reactivos	Gel de apilamiento (5%)	Gel de resolución (16%)
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	1,15 mL	4 mL
Buffer de resolución	-	0,94 mL
Buffer de apilamiento	0,9 mL	
H ₂ O	4,53 mL	2,425 mL
SDS al 10%	70 µL	75 µL
PSA 10%	52 µL	50 µL
TEMED	4 µL	4 µL

Tabla 2.1. Sistema de geles empleado. Buffer de resolución: Tris-HCl 3M, pH 8,8. Buffer de apilamiento: Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. PSA: persulfato de amonio. TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

Las muestras fueron tratadas con el agregado de un volumen de buffer de muestra (Tabla 2.2), previa adición de ácido iodoacético 1 mM (concentración final), llevadas a ebullición durante 10 min y centrifugadas durante 10 min a 16000 g.

Buffer de muestra	
Tris	1,57 g
SDS	4 g
Glicerol	16 mL
Azul de bromofenol	4 mg
β-mercaptoetanol*	2,5 µL
Llevar a pH 6,8 con HCl 1M	
AD, c.s.p	100mL

Tabla 2.2. Composición del buffer de muestra. *El β-mercaptoetanol fue agregado durante el tratamiento de las muestras.

El buffer de reservorio (0,3% p/v de Tris, 0,1% p/v de SDS y 1,44% p/v de glicina) se colocó en el reservorio catódico hasta cubrir la parte superior del gel y en el anódico hasta una altura suficiente como para permitir que todo el electrodo haga contacto con él.

En las distintas calles se sembraron 10-15 µL de las muestras y 3 µL de los patrones de peso molecular (LMW, GE Healthcare): fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α-lactoalbúmina (14,4 kDa).

La intensidad de corriente fue de 30 mA durante el apilado y de 60 mA durante la resolución, hasta la finalización de la corrida. Inmediatamente después los geles fueron removidos de las placas y dejados durante 30 min en solución fijadora (10% v/v de ácido acético, 50% v/v de metanol). Luego fueron coloreados con solución colorante (10% v/v de ácido acético, 40% v/v de metanol y 100 mg de Coomassie Brilliant Blue R-250) y decolorados con una solución de ácido acético al 10% v/v.

2.2.1.5. Inhibición de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb, Pm y bromelina

Con el fin de determinar si los efectos medidos para los distintos preparados proteolíticos eran debidos a la acción de sus proteasas cisteínicas, fue necesario evaluar el efecto de los mismos preparados desprovistos de actividad proteolítica.

El método de inhibición que se eligió fue tratar los preparados con E-64 (*trans*-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano), un potente, irreversible y selectivo inhibidor de proteasas cisteínicas. El grupo *trans*-epoxisuccinil (resto activo) del E-64 se une irreversiblemente al grupo tiol del sitio activo de muchas proteasas cisteínicas, tales como papaína y bromelina, y no reacciona con los grupos tiol de otras enzimas no proteasas como L-lactato deshidrogenasa (Barrett *et al.*, 1982). Dada esta gran especificidad y la baja toxicidad que ha mostrado, es considerado muy útil para ensayos *in vivo* (Katunuma *et al.*, 1995).

2.2.1.5.1. Tratamiento con E-64

Bh, Bb y Pm fueron obtenidos según lo indicado previamente (2.1.1.1, 2.1.2.1 y 2.1.3.1, respectivamente) y, antes de liofilizarlos, diferentes alícuotas de cada uno fueron incubadas con soluciones de 5, 10, 30, 60, 80 y 100 μM (concentración en volumen de mezcla) de E-64 (E3132, Sigma Aldrich) durante 30 min a 37 °C. La solución de bromelina fue preparada resuspendiendo el polvo comercial en buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6 (30 mg/ml) y diferentes alícuotas fueron incubadas con 60, 100, 130, 150 y 250 μM de E-64. Los blancos se incubaron de igual manera pero reemplazando el E-64 por igual volumen de agua destilada. Luego se determinó la actividad proteolítica de cada alícuota y se la referenció a la actividad proteolítica del preparado blanco a la que se consideró el 100% (actividad residual porcentual).

2.2.2. Resultados

2.2.2.1. Perfiles de pl y de peso molecular de Bh, Bb y Pm

El contenido proteico, la actividad proteolítica y la actividad específica de cada preparado de Bh, Bb y Pm evaluado se indican en cada capítulo. En la Figura 2.1 se muestran los perfiles de pl obtenidos para cada preparado, los cuales se correspondieron con los reportados para los extractos parcialmente purificados de *Bromelia hieronymi* (Bruno *et al.*, 2003), *B. balansae* (Pardo *et al.*, 2000) y *Pseudananas macrodentes* (López *et al.*, 2000).

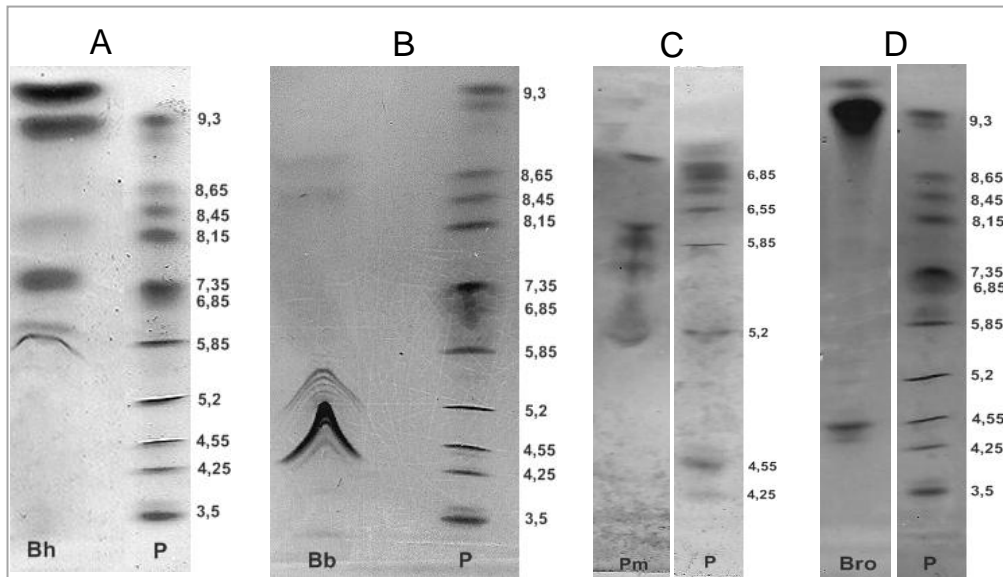


Figura 2.1. IEF. A. Bh: bandas de pI 5,9 y 6,4 (Hieronyma III), pI 7,6 y 8,3 (Hieronyma II), pI $\geq 9,3$ (Hieronyma I). B. Bb: banda de pI ≈ 5 (Balansaina I), bandas de pI 8,5 y 8,7 (balansaina II). C. Pm: bandas de pI 5,7, 5,9 (Macrodon I) y 6,1 (Macrodon II). D. Bro (Bromelina de tallo): banda de pI $>9,3$.

La banda de pI $\approx 4,6$ para bromelina (Fig.2.1, D) se corresponde a la bromelina de fruto que está presente en pequeñas cantidades en los tallos de *Ananas comosus* (Hale et al., 2005).

En la Figura 2.2 se observan las bandas características, todas ellas de alrededor de 25 kDa, de las proteasas de Bh (≈ 25 kDa), Bb (≈ 24 kDa) y Pm (≈ 26 kDa). La banda de ≈ 29 kDa presente en Bh y la banda de ≈ 30 kDa contenida en Pm también están presentes en los extractos crudos respectivos y desaparecen cuando las corridas electroforéticas se hacen sin previa inhibición con ácido iodoacético, comportamiento frecuente en el caso de proteasas vegetales, que actúan de inmediato sobre sus sustratos.

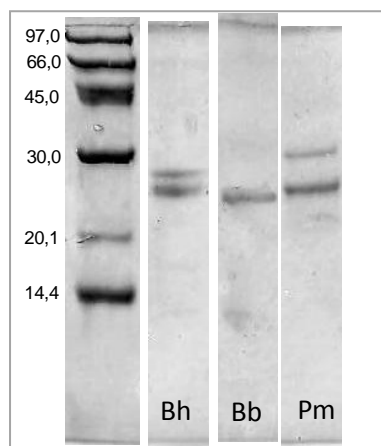


Figura 2.2. SDS-PAGE de Bh, Bb y Pm. A la izquierda, patrones de PM (kDa).

2.2.2.2. Inhibición de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb, Pm y bromelina

En la Figura 2.3 se muestra la actividad porcentual residual de Bh, Bb, Pm y bromelina luego de incubarlos con distintas concentraciones de E-64, durante 30 min a 37 °C.

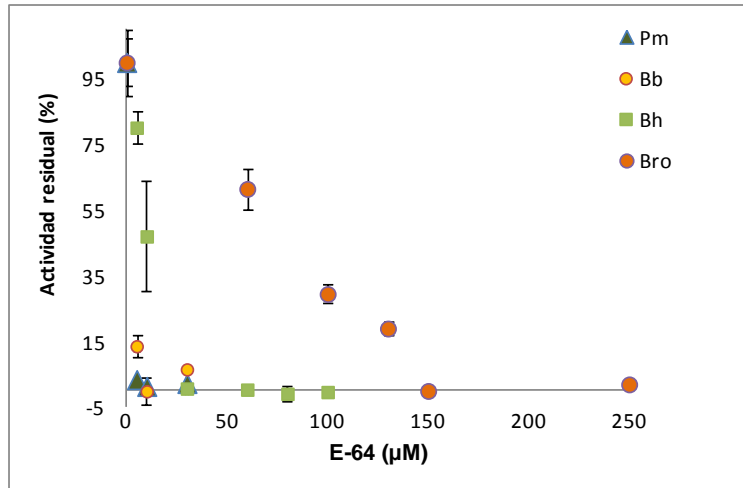


Figura 2.3. Actividad residual (%) de la actividad específica de Bh, Bb, Pm y bromelina (Bro). Media \pm DE (n=3).

De las curvas de inhibición de la Figura 2.3 se obtuvo la concentración mínima de E-64 que inhibe a cada preparado: 30 µM para Bh, 10 µM para Bb y Pm, 150 µM para 30 mg/mL de bromelina, las cuales fueron aumentadas un 10% más al momento de obtener los preparados inhibidos para los distintos ensayos.

Cuando los preparados fueron liofilizados (excepto bromelina), previo a la evaluación de los distintos efectos, se les midió la actividad proteolítica y la concentración de proteínas. Sin embargo, se observó una aparente inconsistencia en la concentración de proteínas medidas: la concentración de proteínas del liofilizado inhibido fue un 15, 30 y 70% respecto de la concentración del liofilizado sin inhibir para Bh, Bb y Pm, respectivamente. Habitualmente el proceso de liofilización no genera pérdida de proteínas en este tipo de preparaciones. Para comprobar si ello se debía a una destrucción parcial de las proteasas se analizó cada material liofilizado por SDS-PAGE, lo que permitió mostrar la presencia de las bandas esperadas con intensidad similar en los liofilizados activos e inhibidos.

Debido a que Bh era el preparado que aparentemente “perdía” más proteínas se lo eligió para hacer ensayos de inhibición y, evitando la liofilización, determinar el contenido proteico. Para esto, se repitió el procedimiento de inhibición descrito en 2.2.1.5.1 con 10, 30 y 60 µM de E-64 y a cada una de las alícuotas de Bh se le determinó la concentración de proteínas, la actividad proteolítica y el perfil por SDS-PAGE.

En la Figura 2.4 se muestran la actividad porcentual residual (A) y el contenido de proteínas (B) de Bh luego de incubarlo con distintas concentraciones de E-64, durante 30 min a 37 °C.

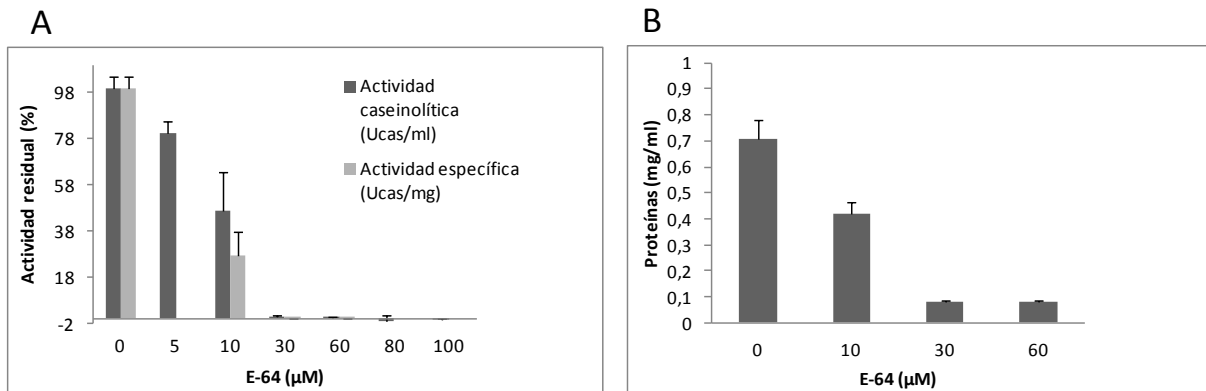


Figura 2.4. A. Actividad porcentual residual (%) de la actividad proteolítica y de la actividad específica de Bh luego de incubarlo con distintas concentraciones de E-64. B. Contenido proteico de Bh luego de incubarlo con distintas concentraciones de E-64. Media ± DE (n=3).

Se observa una disminución en la concentración de proteínas de Bh al aumentar la concentración de E-64. Sin embargo, en el SDS-PAGE de las distintas alícuotas de Bh (Figura 2.5) no se observa pérdida ni disminución de intensidad de las bandas principales de Bh, aun después de incubar Bh con 60 μM de E-64.

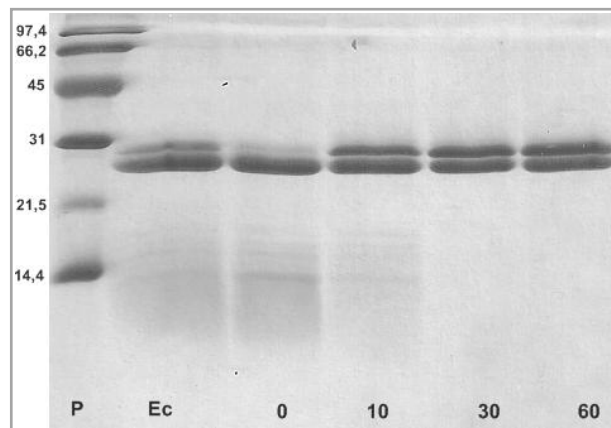


Figura 2.5. SDS-PAGE. Ec, extracto crudo de *B. hieronymi*; 0, Bco; 10, 30 y 60, Bh luego de incubarlo con E-64 10, 30 y 60 μM, respectivamente. P, patrones de peso molecular (LMW, Bio-Rad: fosforilasa b, 97,4 kDa; seroalbúmina, 66,2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21,5 kDa y lisozima, 14,4 kDa).

Por otro lado, en la Figura 2.4 B se observa que luego de inhibir Bh con 30 μM de E-64 (30) la concentración de proteínas fue ≈14 % de la concentración de proteínas de Bh sin inhibir (0), lo cual concuerda con la relación de proteínas de los liofilizados activo e inhibido observada para Bh.

La aparente inconsistencia entre lo observado en la Figura 2.4 B y la Figura 2.5 podría explicarse por la dependencia de la sensibilidad del método de Bradford con la composición de aminoácidos en la superficie proteica (Lucarini & Kilikian, 1999). Si bien el

E-64 interacciona esencialmente con la cisteína del sitio activo de las cisteínendopeptidasas, el inhibidor parece inducir algún cambio conformacional en las proteasas tratadas que afecta fuertemente la reacción con el colorante. No hemos encontrado referencia alguna a este comportamiento en la bibliografía consultada.

A pesar de esta dificultad en la determinación de la concentración de proteínas, para los distintos ensayos los preparados inhibidos se obtuvieron inhibiéndolos según las concentraciones de E-64 definidas en 2.2.2.2 y luego se les midió la actividad caseinolítica y se realizó un IEF y un SDS-PAGE. La inhibición fue llevada a cabo al momento previo de la liofilización para los preparados destinados a la evaluación del efecto antiinflamatorio (Capítulo 3) ya que los mismos fueron realizados en San Luis y se consideró más adecuado transportarlos ya inhibidos con la caracterización ya hecha en el LIProVe. En tanto que los preparados destinados al resto de los ensayos (Capítulos 4 y 5) fueron inhibidos luego de ser liofilizados, previamente a los ensayos.

2.3. Referencias

- Arenas, P. (1997). Las bromeliáceas textiles utilizadas por los indígenas del Gran Chaco. *Parodiana*, **10** (1-2): 113-139.
- Barrett, A. J., A.A. Kembhavi, M.A. Brown, H. Kirschke, C.G. Knight, M. Tamai & K. Hanada (1982) L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201**(1): 189-198.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brullo, A. (2003) *Aislamiento y purificación de proteasas vegetales destinadas a la obtención de proteínas modificadas para uso alimentario*. Tesis para optar al Doctorado en Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Bruno, M.A. (2007) *Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos Bromelia hieronymi Mez. (Bromeliaceae)*. Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Bruno, M.A., M.F. Pardo, N. O. Caffini and L.M.I. López (2003) Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *J. Protein Chem.* **22**: 127-134.
- García Suárez Ma. D. & H. Serrano (2005) La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. *Contactos* **56**: 55-61.
- Hale, L.P., P.K. Greer, C.T. Trinh & C.L. James (2005) Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 783-793.
- Katunuma, N. & E. Kominami (1995) Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: Cystatins and E-64 derivatives. *Meth. Enzymol.* **251**: 382-397.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- López, L.M.I., C. Sequeiros, C.L. Natalucci, N.O. Caffini, A. Brullo, B. Maras & D. Barra (2000) Purification and Characterization of Macrodontain I, a Cysteine Peptidase from Unripe Fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expres. Purif.* **18**: 133-140.
- Lucarini, A. C., and B. V. Kilikian (1999) Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology techniques* **13**: 149-154.
- Pardo, M.F. (2004) *Endopeptidasas de Bromelia balansae Mez y su aplicación en la modificación de proteínas alimentarias*. Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, F. Canals, F.X. Avilés, C.L. Natalucci, & N.O. Caffini (2000) Purification of balansain i, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3795-3800.
- Sarath, G., R.S. de la Motte & F.W. Wagner (1989) “Protease Assay Methods”, en “Proteolytic enzymes: a practical approach” (R.J. Beynon y J.S. Bond, eds.). IRL Press, Oxford. págs. 25-56.

3. EFECTO ANTIINFLAMATORIO



3.1. Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por cualquier agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (García Barreno, 2008). Una respuesta inflamatoria típica consta de cuatro componentes: los inductores inflamatorios, los sensores que los detectan, los mediadores inflamatorios inducidos por los sensores, y los tejidos diana, o efectores, que se ven afectados por los mediadores. Dependiendo de la naturaleza de la causa desencadenante, diferentes combinaciones de los distintos componentes existentes darán lugar a diferentes respuestas inflamatorias. Así, las respuestas inflamatorias a la infección y a la lesión tisular estéril tienen diferentes propósitos: la primera tiene por objeto proteger al huésped de la infección y se puede acoplar con la inducción de la inmunidad adaptativa, mientras que la segunda sirve principalmente para promover la reparación de los tejidos (Medzhitov, 2010).

3.1.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda es la respuesta temprana de un tejido ante la lesión; es inespecífica, de corta duración y se caracteriza por cambios en la microcirculación, exudación de líquido y migración de leucocitos desde los vasos sanguíneos al área afectada. Desde el punto de vista clínico se caracteriza por los cinco signos cardinales que se manifiestan en el área dañada: **rubor** (eritema), **calor**, **tumoración** (edema), **dolor** y **functio laesa** (pérdida de la función, por una combinación de los 4 puntos anteriores). Las alteraciones morfológicas y funcionales son una manifestación de una serie compleja de eventos interrelacionados: **respuesta vascular**, **respuesta celular** y cooperación tisular vía **mediadores químicos de la inflamación** (García Barreno, 2008).

3.1.1.1. Respuesta vascular

Luego de una vasoconstricción pasajera de las arteriolas en el sitio de agresión, le sigue una **vasodilatación de las arteriolas precapilares** producida por la relajación del músculo liso vascular. Estos cambios llevan a un aumento del flujo sanguíneo en el área lesionada, causando rubor y calor.

Ciertos mediadores son capaces de producir la contracción de las células endoteliales de vénulas y capilares, lo cual produce separación de las uniones intercelulares de dichas células, conduciendo a un **aumento de la permeabilidad vascular** y permitiendo el pasaje de proteínas y líquido al espacio extracelular. Este escape neto de fluido se denomina **exudación**. Entre las proteínas plasmáticas que exudan está el fibrinógeno, el cual se deposita como fibrina sobre los tejidos extravasculares, lo cual disminuye la permeabilidad tisular evitando la reentrada del exudado al vaso, que finalmente conduce a la

formación del edema. A raíz del aumento de la permeabilidad vascular se produce un aumento de viscosidad sanguínea y el flujo sanguíneo comienza a disminuir permitiendo el acercamiento de los leucocitos a la pared de los vasos (Roitt, 2003).

3.1.1.2. Respuesta celular

Si bien los tipos celulares presentes en los exudados dependerán del agente agresor, la célula predominante es el polimorfonuclear (PMN) neutrófilo, en especial en la fase temprana de la inflamación. Los leucocitos llegan al sitio lesionado mediante una serie de pasos: marginación, adhesión, emigración y quimiotaxis a través de la pared vascular.

A raíz del enlentecimiento del flujo sanguíneo, los leucocitos son desplazados hacia la periferia del vaso, lo cual, junto al aumento de la viscosidad sanguínea, favorece la **marginación leucocitaria** hacia la superficie endotelial. Esto les permite adherirse a la superficie endotelial de los vasos, proceso incrementado durante la inflamación aguda por el aumento en la **expresión de moléculas de adhesión (CAM)** en células endoteliales de las vénulas (P y E-selectinas, ICAM, PAF, etc.) y en los leucocitos (MAC-1, LFA-1, PAF-R, L-selectinas, etc.). Los neutrófilos adheridos pueden atravesar el vaso sanguíneo por las uniones intercelulares y la membrana basal (**diapédesis**) alcanzando el espacio intersticial (**emigración**) desde donde se dirigen al sitio de inflamación inducidos por un gradiente de concentración de factores quimiotácticos (**quimiotaxis**) (Roitt, 2003).

La **fagocitosis**, llevada a cabo fundamentalmente por macrófagos y neutrófilos, es la internalización y digestión celular de partículas extrañas y requiere el reconocimiento, el englobamiento y la degradación de la partícula. Cuando se trata de un agente inerte y grande el reconocimiento es directo. Las **opsoninas** son sustancias que recubren la partícula y favorecen su fagocitosis. La destrucción del material se lleva a cabo por las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno y el sistema halogenador, además de mecanismos independientes del oxígeno, tales como la proteinasa 3, la catepsina G, la lisozima y la lactoferrina, entre otros. Estos efectores, junto a los productos de degradación, son liberados al medio extracelular, por lo que los daños colaterales a los tejidos del huésped resultan inevitables (Nathan, 2006).

3.1.1.3. Mediadores químicos⁸

La respuesta inflamatoria está coordinada por un copioso dispositivo de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras (García Barreno, 2008). Se trata de moléculas solubles que difunden fácilmente y actúan sobre los receptores de los efectores. Los mediadores pueden provenir de los sistemas plasmáticos (coagulación, complemento, cininas), ser liberados desde gránulos almacenados en células (serotonina, histamina) o ser

⁸ En este apartado aquellos párrafos que no contienen citas fueron adaptados convenientemente de Rotelli (2004).

sintetizados inmediatamente cuando se requieren (eicosanoides). Teniendo en cuenta su acción y su origen se pueden clasificar como se indica en la Tabla 3.1.

Mediadores que incrementan la permeabilidad vascular en el edema inflamatorio	
Vasoactivos derivados de células	Vasoactivos derivados del plasma
-Aminas biógenas: serotonina, histamina -Eicosanoides -Factor activador de plaquetas (PAF) -Oxido nítrico (NO)	-Cininas -Cascada de coagulación -Sistema de complemento
Mediadores involucrados en el reclutamiento celular (Factores quimiotácticos)	
-C5a, C3a -Eicosanoides (LTB ₄) -Quimiocinas	

Tabla 3.1. Clasificación de mediadores de la inflamación, según acción y origen

La **histamina** es un mediador temprano de la inflamación aguda y es liberado desde los gránulos almacenados en los mastocitos perivasculares luego de ser estimulados por neuropéptidos liberados desde las terminaciones nerviosas (Benoist & Mathis, 2002), antígenos, IL-1, C3a y C5a (Roitt, 2003), entre otros. Su acción es mediada por receptores (H) ubicados a lo largo de todo el lecho vascular, principalmente en células del músculo liso y células endoteliales. Sobre el músculo liso produce dilatación mientras que sobre las células endoteliales produce contracción y por tanto **incrementa la permeabilidad vascular**, estimula la expresión de P-selectinas **incrementando la adhesión leucocitaria** y estimula la síntesis de NO y prostaciclina (PGI₂), ambas con **efectos vasodilatadores** (Brunton *et al.*, 2006).

La **serotonina** (5-hidroxitriptamina, 5-HT) puede tener un efecto vasoconstrictor o vasodilatador según el receptor sobre el cual actúe; sin embargo durante la inflamación aguda actúa tempranamente provocando vasodilatación con aumento de permeabilidad, aunque con menor potencia que la histamina.

Los **eicosanoides** son las familias de prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) y compuestos similares que derivan de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de 20 átomos de carbono. Son sintetizados en la membrana celular por activación de la **fosfolipasa A₂** o de la **fosfolipasa C**, las cuales catalizan la liberación del precursor eicosanoide (ácido araquidónico) desde la membrana celular (Brunton *et al.*, 2006).

A partir del **ácido araquidónico** se inician dos vías principales de síntesis: la vía de la **ciclooxigenasa (COX)**, la cual conduce a la formación de PGs, prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXAs) y la vía de la **lipooxigenasa**, la cual conduce a la síntesis de LTs.

Existen dos isoformas de la COX: COX-1, expresada de manera constitutiva en la mayoría de las células y COX-2, inducida por citocinas y factores de crecimiento, entre otros estímulos.

Los leucotrienos **LTC₄** y **LTD₄** aumentan la permeabilidad vascular aumentando el exudado de plasma. El **LTB₄**, además de aumentar la permeabilidad, es un potente agente quimiotáctico, aumenta la adherencia y emigración de los neutrófilos a través del endotelio y estimula la degranulación y la síntesis de superóxido en los PMNs.

Mientras que la **PGF₂** es vasoconstrictora, **PGE₂** y **PGI₂** son vasodilatadoras y aumentan el edema y la infiltración de leucocitos en el área inflamada. Sin embargo, PGE₂ puede actuar como inmunosupresor: inhibe la liberación de los productos lisosomales de los neutrófilos y macrófagos, así como la participación de leucocitos en reacciones de hipersensibilidad tardía (Brunton *et al.*, 2006).

El factor activador de plaquetas (**PAF**), además de ser un potente estimulador de la agregación y activación plaquetaria, aumenta la permeabilidad vascular, la quimiotaxis y la adhesión de neutrófilos al endotelio, así como la generación de superóxido y enzimas lisosomales desde los PMNs. Al actuar sobre receptores acoplados a proteínas G, activa las fosfolipasas A₂ y C estimulando la síntesis de TXA₂, PGs y LTs. La trombina e histamina estimulan su expresión en las células endoteliales. Se sintetiza en mastocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y NK (“natural killers”).

El óxido nítrico (**NO**) es un potente vasodilatador, potencia la citotoxicidad de los fagocitos y activa las COX-1 y COX-2 (Salvemini *et al.*, 1993). Es sintetizado por dos isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS constitutiva (c-NOS) está presente en plaquetas y células endoteliales y produce pequeñas cantidades de NO. La NOS inducible (i-NOS) se expresa en múltiples células tales como neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y músculo liso vascular. Diversos agentes vasoactivos (serotonina, histamina, bradicinina, trombina y estímulos físicos) estimulan la síntesis de NO en las células endoteliales.

Las **cininas** (bradicinina plasmática y calidina tisular) son péptidos derivados, por acción de **calicreínas**, del cininógeno plasmático (cininógeno de alto peso molecular) y del cininógeno tisular (cininógeno de bajo peso molecular). La calicreína plasmática es activada a partir de la precalicreína por acción del **factor XII**, el cual a su vez es activado por contacto con superficies cargadas negativamente (colágeno, heparina, productos plaquetarios, etc.). Las cininas tienen propiedad vasodilatadora (sobre arteriolas) y vasoconstrictor (sobre arterias y venas de gran calibre), así como también aumentan la permeabilidad en la microcirculación y estimulan la síntesis de PGs por activación de fosfolipasas A₂ y C. En macrófagos estimulan la liberación de la interleucina IL-1 y del factor de necrosis tumoral (TNF- α). Uno de sus receptores (B1) es inducible por daño tisular e inflamación.

El paso final de la coagulación es la formación de fibrina, la cual no sólo frena el sangrado permitiendo la reparación del área lesionada, sino que también forma una malla en la que quedan atrapados los agentes agresores impidiendo su diseminación. Por otro lado, durante la formación de la fibrina se liberan **fibrinopéptidos A y B** desde el fibrinógeno, los cuales actúan como quimiotácticos de los PMNs y potencian los efectos de la bradicinina.

El sistema del complemento está formado por proteínas plasmáticas (C) que actúan en forma de cascada, en la que cada enzima activa la siguiente. La activación es desencadenada por complejos antígeno-anticuerpo y productos bacterianos. Como consecuencia de su activación se forman productos con propiedad opsonizante, quimiotáctica y capacidad lítica sobre células diana. Los productos **C5a** y **C3a** estimulan el estallido respiratorio en los fagocitos, desencadenan la liberación de mediadores (histamina, PAF, IL-3, 4, 5 y 6, entre otros) así como la síntesis de LTs, PGs y TXs desde mastocitos y basófilos. C5a, y en menor medida C3a, es un potente agente quimiotáctico de neutrófilos, además de estimular la síntesis de eicosanoides. C5a también genera vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. C5a y C3a también se pueden formar por acción de la plasmina, la calicreína y enzimas leucocitarias.

Bajo el estímulo local, el macrófago hístico libera las **citocinas IL-1** y **TNF- α** , entre otros mediadores, las cuales actúan estimulando las células endoteliales (luego de la trombina o la histamina), células epiteliales y fibroblastos a liberar quimiocinas (MCP-1). Las quimiocinas actúan sobre diversos tipos leucocitarios, conduciéndolos al sitio inflamado. **IL-8** es un potente quimiotáctico para neutrófilos, pero también para linfocitos (Roitt, 2003).

3.1.2. Regulación y resolución de la inflamación

La finalización de la respuesta inflamatoria y la transición al estado homeostático es un proceso activo y altamente regulado conocido como la resolución de la inflamación (Medzhitov, 2010). Entre los mecanismos reguladores identificados se pueden mencionar: proteínas reguladoras del complemento, el factor transformante β (**TGF- β**), las **IL-4** y **IL-10**, la **PGE₂** y los **glucocorticoides endógenos**, que actúan regulando la proliferación y activación de las células inflamatorias (Roitt, 2003); las **lipoxinas** (producidas por la 15-lipooxigenasa en los tejidos) inhiben el reclutamiento de neutrófilos y promueven el reclutamiento de los monocitos, que eliminan las células muertas e inician la reparación del tejido; las **resolvinas** y **protectinas** (derivadas del ácido eicosapentanoico y del docosahexanoico) tienen un papel crucial en la resolución de la inflamación junto a las lipoxinas (Medzhitov, 2008); los fosfolípidos de las membranas de las células endoteliales vasculares, oxidados por las ROS disminuyen la expresión de moléculas de adhesión (Brash, 1999).

Dependiendo de la cantidad de tejido destruido y la naturaleza del agente agresor la inflamación puede generar secuelas, tales como la cicatrización y la formación de abscesos.

La **cicatrización** ocurre cuando hay daño sustancial al tejido conectivo y/o el tejido carece de la capacidad para regenerar células especializadas. Los tejidos muertos y el exudado inflamatorio agudo se reemplazan por un tejido conectivo vascular especializado llamado tejido de granulación, el cual produce gradualmente colágeno para formar una cicatriz fibrosa. A pesar de la pérdida de algunas células especializadas y algo de distorsión arquitectónica de la cicatriz fibrosa, se restablece la integridad estructural.

La formación de abscesos es un proceso que tiene lugar cuando la reacción inflamatoria aguda no puede destruir/eliminar el agente agresor y continúa con un componente de la inflamación crónica. Esto es más común en el caso de la infección por bacterias piógenas (Woolf *et al.*, 2002).

3.1.3. Inflamación crónica

Cuando la inflamación se mantiene durante un tiempo prolongado (semanas o meses), se habla de **inflamación crónica**, en la que coexisten el daño tisular y los intentos de reparación. Puede producirse por mantenimiento de la inflamación aguda (si no se resuelve la causa), o bien empezar de manera progresiva y poco evidente, sin las manifestaciones de la inflamación aguda. Este segundo caso es el responsable del daño tisular de algunas enfermedades como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la tuberculosis y la fibrosis pulmonar. Además, es importante en el desarrollo del cáncer y en enfermedades que anteriormente se consideraban exclusivamente degenerativas, como el Alzheimer. Entre las causas de la inflamación crónica se pueden distinguir las infecciones persistentes (micobacterias, ciertos hongos, virus y parásitos), las enfermedades mediadas por el sistema inmune (artritis reumatoide, reacciones alérgicas, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple) y la exposición prolongada a agentes tóxicos (polvo de sílice, fibras, suturas y cuerpos extraños que no pueden ser removidos por fagocitosis) (Kumar, 2009).

Ante la persistencia durante días del agente agresor, los PMNs son reemplazados por células mononucleares (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), si bien pueden persistir algunos neutrófilos. Los macrófagos presentan una morfología variable, secretan mediadores de inflamación, regulan la actividad de linfocitos y favorecen la proliferación y el desarrollo de fibroblastos y células endoteliales. Durante la fase proliferativa de la inflamación crónica los fibroblastos restauran la matriz del tejido conectivo dañado conduciendo a la fibrosis, en tanto que la proliferación de células endoteliales favorece la formación de pequeños capilares (angiogénesis).

Un tipo morfológico de la inflamación crónica es la **inflamación granulomatosa**, caracterizada por una colección organizada de macrófagos, los cuales forman células

epiteliodes o se fusionan formando células gigantes ante la imposibilidad de digerir el agente fagocitado. Independientemente de su causa, los granulomas pueden contener otras células (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos), además de fibrosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). El proceso de formación de granulomas se puede dividir en 4 fases (**iniciación, acumulación, efectora y de resolución**), en las cuales las células T tienen un rol importante. Durante la iniciación, los macrófagos son atraídos por el estímulo inflamatorio y comienza a nuclear la lesión granulomatosa. Durante la acumulación, células T CD4⁺ se acumulan en el sitio y reclutan otras células efectoras, incluyendo células T, más macrófagos y en algunos casos eosinófilos. Durante la fase efectora, las células intentan reducir la carga de patógenos. Por último, una vez que la amenaza del patógeno ha sido reducida o eliminada, la infiltración celular se reduce y se induce la formación del tejido cicatricial (Co *et al.*, 2004). Las infecciones micóticas, la tuberculosis, la lepra y la presencia de cuerpos extraños (talco, suturas, etc.) son algunas de las causas de la inflamación granulomatosa.

En la **inflamación no granulomatosa** las células se encuentran diseminadas. Se caracterizan por la acumulación de linfocitos sensibilizados por antígenos, células plasmáticas y macrófagos. Puede observarse necrosis tisular y fibrosis. Las causas más comunes son las infecciones virales crónicas y las enfermedades autoinmunes, entre otras (Rotelli, 2004).

3.1.4. Proteasas como antiinflamatorios

El rol de las proteasas como agentes antiinflamatorios, especialmente el de la tripsina, es considerado desde la década del 50 en varios estudios (Martin *et al.*, 1954; Cohen *et al.*, 1955). En 1957 Innerfield reporta el efecto antiinflamatorio de la tripsina, administrada intramuscularmente, en pacientes con tromboflebitis con gran componente edematoso. Atribuye a la proteasa un aumento en la permeabilidad tisular, una disminución en la viscosidad de los exudados y la reversión del edema, así como la superación de la isquemia en los tejidos con inflamación aguda al eliminar las barreras exudativas extravasculares al flujo sanguíneo en los pequeños vasos comprimidos.

Un antecedente importante en el estudio de la acción antiedematosa de las proteasas cisteínicas es el trabajo de Netti *et al.* (1972), quienes compararon los efectos de proteasas y agentes antiinflamatorios conocidos sobre edemas inducidos por distintos agentes flogísticos en pata de rata. Los porcentajes de inhibición de edema para ficina, bromelina, al igual que para un concentrado de enzimas proteolíticas pancreáticas, fueron iguales o superiores a los de indometacina, ácido acetilsalicílico y fenilbutazona, mientras que la papaína, a la concentración ensayada, no fue efectiva frente a ningún edema. En los modelos animales la vía de administración de las preparaciones proteolíticas es en su

mayoría oral, aunque la eficacia antiedematosa de la bromelina administrada intraperitonealmente también ha sido comprobada (Smyth *et al.*, 1962; Uhlig & Seifert, 1981).

3.1.4.1. Bromelina

Desde su introducción comercial en 1957, se han publicado resultados científicos que revelan los efectos antitrombótico, fibrinolítico y antiinflamatorio de la bromelina evaluados mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* (Maurer, 2001). Además de los modelos de edema ya mencionados, otros modelos experimentales de inflamación en los que la bromelina ha sido efectiva son los siguientes: encefalomielitis alérgica experimental (un modelo experimental de la esclerosis múltiple humana), asma alérgico, pleuritis inducida por carragenina, enfermedades reumatológicas en ratón, arterioesclerosis inmunológicamente mediada en aloinjertos aórticos de rata y enfermedad inflamatoria intestinal en ratones IL-10^{-/-} (Fitzhugh *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2012).

Una serie de estudios clínicos controlados reportaron la eficacia de la bromelina frente a edema, inflamación, dolor, hematomas, entre otros signos, en: sinusitis aguda, traumatismos en cara, cabeza y extremidades inferiores, tumefacción post-operatoria, inflamación e hinchazón post-traumática y cirugía oral (Maurer, 2001).

El uso de la bromelina como antiinflamatorio o analgésico en la artritis reumatoide fue sugerido por Cohen & Goldman (1964). Más recientemente, la bromelina ha sido evaluada para la artrosis en varios estudios clínicos abiertos o de equivalencia, diseñados para determinar la efectividad comparativa y la seguridad respecto al tratamiento estándar con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Dichos estudios sugieren que la bromelina, sola o en complejos enzimáticos (PHL⁹, WOB¹⁰ y WOB-N¹¹), puede ser beneficiosa o tan eficaz como el tratamiento con AINEs, mostrando buena tolerabilidad y leves reacciones adversas (principalmente síntomas gastrointestinales). Sin embargo, la mayoría de los estudios tienen determinados problemas metodológicos que hacen difícil extraer conclusiones definitivas (Brien *et al.*, 2004, 2006).

En un estudio de nivel II de medicina basada en la evidencia (EBM) se ha demostrado que el tratamiento con bromelina en niños con sinusitis aguda puede ser considerada como segura y beneficiosa (Braun *et al.*, 2005).

El efecto antiinflamatorio de la bromelina puede ser explicado por su acción sobre distintos niveles del complejo proceso inflamatorio, como se señala a continuación.

⁹ PHL: Phlogenzyme, contiene bromelina, tripsina y rutina

¹⁰ WOB: Wobenzyme, contiene bromelina, papaína, tripsina, quimotripsina, pancreatina, lipase y amilasa

¹¹ WOB-N: contiene bromelina, tripsina, papaína, quimotripsina, pancreatina y rutina

3.1.4.1.1. Efecto sobre los componentes de la coagulación

En el modelo edema de pata inducido por carragenina, la acción antiinflamatoria de bromelina fue correlacionado con el aumento de la actividad fibrinolítica sérica (Pirota & Giuli-Morghen, 1978). Además, la bromelina ha mostrado aumentar la concentración de plasmina sérica (Smyth *et al.*, 1962), la activación de plasminógeno a plasmina (Maurer *et al.*, 2000) y disminuir el nivel sérico de fibrinógeno (Livio *et al.*, 1978). Todos estos efectos disminuirían la deposición de fibrina en el área inflamada, produciendo un aumento en la permeabilidad tisular y vascular, lo que promovería la reabsorción del fluido del edema (Maurer, 2001).

3.1.4.1.2. Efecto sobre el sistema de calicreínas

En el modelo de inflamación en ratas "bolsa de aire" inducido por caolín, la bromelina redujo de manera dosis-dependiente el nivel de bradicinina en el sitio de inflamación y el nivel de precalicreína sérica, los que fueron correlacionados con la reducción del exudado plasmático (Kumakura *et al.*, 1988), explicando la acción antiedematosa así como analgésica de la bromelina.

3.1.4.1.3. Efecto sobre las vías de la COX y la NOS

Los niveles de PGE₂, así como de sustancia P (un neuropéptido asociado a la percepción del dolor), se encontraron disminuidos en el exudado inflamatorio generado en ratas por la implantación de esponjas embebidas en carragenina (Gaspani *et al.*, 2002). En otro modelo inflamatorio, la bromelina redujo de manera dosis-dependiente los niveles de PGE₂ y TXs, junto con el volumen de exudado (Vellini *et al.*, 1986). Más recientemente, la bromelina ha mostrado reducir la expresión de la COX-2 y PGE₂ por inhibición en la translocación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) en células tumorales así como en modelos experimentales de cáncer (Chobotova *et al.*, 2010; Bhui *et al.*, 2012).

La administración oral de bromelina mejoró la disminución de la defecación en ratas postoperatorias laparotomizadas, al menos en parte, mediante la inhibición de la sobreexpresión de la i-NOS del colon a través de la ruta del NF-κB (Wen *et al.*, 2006)

3.1.4.1.4. Modulación de moléculas de superficie celular

La bromelina ha mostrado remover moléculas de superficie celular en leucocitos (granulocitos, monocitos y linfocitos) asociadas con la adhesión y la activación leucocitaria (Hale *et al.*, 2002). La reducción de la migración de neutrófilos, en tres modelos murinos de migración leucocitaria en cavidad intraperitoneal inflamada, fue asociada a la remoción de L-selectina y principalmente de CD128 (receptor del quimioattractante IL-8) desde la superficie leucocitaria, lo que llevó a la eliminación de la adhesión de alta afinidad mediada por

integrinas de los vasos sanguíneos del sitio inflamado (Fitzhugh *et al.*, 2008). La bromelina activa proteolíticamente redujo la expresión de CD25 (presente en la superficie de células T activas que actúa como receptor del factor de proliferación IL-2) de manera dosis y tiempo dependiente en ensayos *in vitro* y se propuso como mecanismo el clivaje proteolítico de CD25 desde la superficie celular (Secor *et al.*, 2009). También se ha sugerido que bromelina podría mediar su efecto antiinflamatorio actuando como molécula de señalización sobre los receptores activados por proteasas (PAR) (Engwerda *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2012).

3.1.4.1.5. Activación celular y producción de citoquinas

La bromelina mostró inhibir la transducción de señales (vía MAPK/ERK-2) y la producción de citoquinas (IL-4, IL-2 e IFN- γ) desde células T, acción que fue revertida al inhibir la actividad proteolítica de bromelina (Mynott *et al.*, 1999). En un modelo murino de la enfermedad alérgica respiratoria ya establecida, la bromelina redujo significativamente el contenido de células T (CD4 y CD8) en el lavado bronqueoalveolar (BAL), sin afectar el número de células en el bazo o los ganglios linfáticos hiliares, además de una disminución de IL-4, IL-12, IL-17, así como de IFN- α en el suero (Secor *et al.*, 2012).

La bromelina regula la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6 de forma dependiente de las condiciones inflamatorias. La secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenida de voluntarios sanos, así como de macrófagos de ratón sería estimulada *in vitro* por la bromelina mediante un mecanismo dependiente de IFN- γ . Sin embargo, en situaciones en las que las células inmunes ya han sido estimuladas, la bromelina reduce la producción elevada de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por ejemplo, en presencia de lipopolisacárido (LPS), un inductor de la reacción de inflamación aguda, bromelina reduce la expresión de dichas citocinas desde PBMC (Chobotova *et al.*, 2010). Esta probable dualidad también ha sido observada en modelos *in vivo*, donde la bromelina ha mostrado ser capaz tanto de mejorar como de inhibir las respuestas inmunes dependientes de células T, lo cual podría depender del entorno inmunológico particular en el que se la administra (Engwerda *et al.*, 2001).

Más recientemente, en un ensayo clínico aleatorio controlado con placebo, la bromelina ha mostrado modular las respuestas celulares de linfocitos (cambio significativo en el perfil circadiano de IFN- γ) después de su administración oral en voluntarios sanos (Müller *et al.*, 2012).

Las evidencias experimentales dan cuenta de que la bromelina tendría acción sobre múltiples dianas y si bien su mecanismo antiinflamatorio no ha sido completamente dilucidado, numerosos efectos están mediados por su actividad proteolítica (Pirrotta & Giuli-Morghen, 1978; Hale & Haynes, 1992; Mynott *et al.*, 1999; Hale *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2005; Fitzhugh *et al.*, 2008; Secor *et al.*, 2009)

3.2. Objetivos

Dentro del objetivo general de estudiar el posible efecto antiinflamatorio de los extractos ricos en cisteínendopeptidasas obtenidos de frutos de *Bromelia hieronymi* (Bh), *B. balansae* (Bb) y *Pseudananas macrodentes* (Pm), se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de Bh, Bb y Pm sobre la inflamación aguda y crónica empleando modelos de inflamación en animales.
- Determinar si los efectos medidos tienen relación con la actividad proteolítica de los extractos.
- Comparar los efectos de Bh, Bb y Pm con los medidos para bromelina.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Modelos de inflamación

La respuesta inflamatoria provocada por distintos estímulos (isquemia, agentes infecciosos, injuria química, térmica o mecánica, interacción antígeno-anticuerpo) puede ser medida por los signos clínicos que la acompañan: eritema, edema, dolor e hiperalgesia. Una serie de mecanismos dan lugar a distintas fases en que puede caracterizarse al proceso inflamatorio:

-*Fase aguda transitoria*, caracterizada por vasodilatación local e incremento de la permeabilidad capilar.

-*Fase subaguda*, caracterizada por infiltración de leucocitos y células fagocíticas.

-*Fase crónica proliferativa*, en la cual aparece una degeneración del tejido y fibrosis.

Diferentes modelos desarrollados en animales de experimentación permiten reproducir dichas fases (Vogel, 2002), proporcionando un método necesario para el descubrimiento del uso apropiado de nuevos agentes terapéuticos (Willoughby, 2003).

El efecto antiinflamatorio de los preparados proteolíticos fue evaluado usando modelos de inflamación aguda o subaguda (edema de pata de rata) y un modelo de inflamación crónica proliferativa (test del granuloma).

3.3.1.1. Modelos de inflamación aguda: Edema de pata de rata

Este modelo se basa en medir la capacidad de los agentes antiinflamatorios de inhibir el edema producido en la pata trasera de ratas o ratones luego de la inyección de un agente flogístico. El efecto antiinflamatorio medido así como su duración dependen de la sustancia empleada como agente flogístico (Vogel, 2002).

3.3.1.1.1. *Edema de pata inducido por carragenina*

Los carragenanos son un grupo complejo de polisacáridos formados por la repetición de monómeros de galactosa modificada y son de tres tipos principales: lambda, kappa y iota. En el modelo de edema de pata la carragenina tipo lambda es inyectada subcutáneamente en la pata trasera. La respuesta inflamatoria generada se caracteriza por edema, hiperalgesia y eritema y se cuantifica por el aumento de tamaño de la pata a raíz del edema formado, el cual es máximo alrededor de las 5 h posteriores a la inyección de carragenina (Morris, 2003).

El incremento en el volumen del edema es dependiente del tiempo y su desarrollo ha sido descrito como un proceso bifásico (Vinegar *et al.*, 1969; Salvemini *et al.*, 1996). La fase temprana (0-1 h) se caracteriza por la liberación de histamina e 5-hidroxitriptamina (5-

HT) y le sigue un corto período ($\approx 1,5-2,5$ h) en que se libera bradiginina (Di Rosa *et al.*, 1971), mientras que la fase tardía ($\approx 2,5-10$ h) ha sido correlacionada con la producción de prostaglandinas (PGs), atribuida a la inducción de la ciclooxigenasa inducible (COX-2) (Seibert *et al.*, 1994). La infiltración y activación de neutrófilos contribuye a la respuesta inflamatoria, principalmente de la fase tardía, por liberación de radicales libres derivados del oxígeno (O_2^- , radicales hidroxilo). El óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa constitutiva (c-NOS) en la primera fase y por la óxido nítrico sintasa inducible (i-NOS) en la fase tardía, actúa como un potente vasodilatador y tendría un rol clave en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria tardía al aumentar la producción de PGs por activación de la COX-2 (Salvemini *et al.*, 1996).

La inhibición del edema de pata inducido por carragenina ha demostrado ser altamente predictivo de la acción antiinflamatoria del fármaco en la enfermedad inflamatoria humana y las dosis de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en este modelo se correlacionan bien con la dosis eficaz en los pacientes (Morris, 2003).

3.3.1.1.1. Procedimiento experimental

En la pata trasera izquierda de cada animal se realizó una inyección subplantar de 0,1 mL de carragenina lambda tipo IV (Sigma Aldrich) al 2% en solución fisiológica. Una hora antes, cada lote de animales recibió intraperitonealmente (0,5 mL) los preparados a ensayar. El lote control recibió buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6 y como control positivo se usó 10 mg/ml de indometacina (Sigma Aldrich) o 50 mg/ml de diclofenac sódico (Sigma Aldrich). Los volúmenes de las patas traseras fueron medidos con un pletismómetro a distintos tiempos post-inyección de carragenina (1, 3, 5 y 7 h).

Aquellos preparados que mostraron tener un efecto antiinflamatorio durante la primera hora en el modelo de edema inducido por carragenina, fueron probados en modelos de edema inducido por mediadores de la fase temprana: histamina y serotonina.

3.3.1.1.2. Edema de pata inducido por histamina

La histamina, a través de sus receptores (H) distribuidos en el lecho vascular, produce vasodilatación e hiperpermeabilidad capilar. Luego de ser administrada produce un efecto vasodilatador de muy corta duración, dando lugar a hiperemia, enrojecimiento y edema.

3.3.1.1.2.1. Procedimiento experimental

Los animales recibieron en la pata trasera izquierda una inyección subplantar de 0,1 mL de histamina clorhidrato (Sigma Aldrich) al 0,1% en solución fisiológica. Una hora antes a cada lote se le administró intraperitonealmente 0,5 mL de los preparados a ensayar y el lote control recibió buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6. Mediante la utilización de un

pletismómetro se midió el volumen de edema a los 15, 30 y 60 min después de la administración de histamina (Rotelli, 2004).

3.3.1.1.3. *Edema de pata inducido por serotonina*

En la inflamación aguda la serotonina (o 5-HT) produce vasodilatación e hiperpermeabilidad vascular, aunque con menor potencia que la histamina.

3.3.1.1.3.1. Procedimiento experimental

Cada animal recibió en su pata trasera izquierda una inyección subplantar de 0,1 mL de serotonina clorhidrato (Sigma Aldrich) al 0,01% en solución fisiológica. Una hora antes cada lote recibió intraperitonealmente 0,5 mL de los preparados a ensayar y el lote control recibió buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6. Mediante la utilización de un pletismómetro se midió el volumen de edema a los 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración de la serotonina (Rotelli, 2004).

3.3.1.1.4. *Equipamiento, medidas y cálculo del volumen de edema*

Las medidas del volumen de las patas traseras fueron realizadas mediante el uso de un pletismómetro (Ugo Basile 7140), que consiste en una celda conteniendo líquido en la cual se sumerge la pata y un transductor que transforma el volumen de líquido desplazado en una señal eléctrica, la cual se lee como volumen de la pata con una precisión de 0,01 mL.

La celda está constituida por dos tubos interconectados, en uno de los cuales se sumerge la pata y el desplazamiento de agua producido genera un cambio en el nivel del líquido en el segundo tubo, donde se encuentra el transductor. Este último consiste en dos pares de electrodos de Pt-Ir. Un par de electrodos (electrodo de nivel) mide la conductancia y la conductividad del líquido. Por estar los electrodos parcialmente sumergidos, la conductancia es proporcional al nivel del líquido y por lo tanto al volumen de la pata. Un segundo par de electrodos (electrodos de compensación), por estar totalmente sumergidos, sólo son sensibles a la conductividad y a través de un circuito electrónico corrigen la lectura del electrodo de nivel, de manera que la señal resultante es proporcional a la conductancia y por tanto al volumen sumergido. El líquido contenido en la celda es una solución de NaCl al 5% conteniendo un agente tensioactivo (proporcionado por el fabricante) que minimiza el menisco de lectura¹²

Ambas patas traseras fueron marcadas con una fibra indeleble por encima del maléolo lateral y cada una fue sumergida hasta hacer coincidir la marca con el menisco del líquido, momento en el cual se registró la medida del volumen. Cada volumen fue medido

¹² http://www.ugobasile.com/catalogue/category/pain_and_inflammation/product/37140_plethysmometer.html

por triplicado en todos los tiempos de medida. El volumen de edema fue calculado por la resta de los volúmenes promedio de ambas patas.

3.3.1.2. Modelo de inflamación crónica: test del granuloma

Meier *et al* (1950) demostraron que el implante de algodones estériles en ratas producían granulomas de cuerpo extraño, caracterizados por tejido conectivo no diferenciado, células gigantes e infiltración de fluido. Después de varios días, el incremento del peso del pellet implantado puede ser medido, constituyendo una medida del tejido granulomatoso y por lo tanto de la respuesta inflamatoria (Vogel, 2002). Este método ha demostrado ser útil para la demostración de la actividad farmacológica de los esteroides como antiinflamatorios (Bailey *et al.*, 1982).

El desarrollo del edema implica distintos eventos. Tempranamente, en la vecindad del algodón se producen sustancias quimiotácticas para neutrófilos y monocitos. Durante los primeros 5 días después de la implantación se demostró la continua acumulación de células polimorfonucleares (PMNs), principalmente neutrófilos, que penetraban al algodón desde la periferia. Entre los días 5 y 7 los estudios histológicos mostraron que la amplia vascularización se llevaba a cabo con la formación de una cápsula fibrosa junto con una infiltración masiva de la cápsula por las células mononucleares. El aumento en el peso del granuloma resulta significativo recién a partir del día 5 (Bailey *et al.*, 1982).

3.3.1.2.1. Procedimiento experimental

Ratas hembra fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de una mezcla conteniendo 75 mg/kg de ketamina clorhidrato (Holliday Scott S.A.) y 12 mg/kg de xilacina clorhidrato (Richmond Laboratories Vet Pharma). El granuloma fue inducido por el implante subcutáneo de un pellet de algodón estéril (50 mg) en el área dorsal. Un día después del implante, los animales fueron divididos en lotes de 6 animales e inyectados intraperitonealmente (0,5 mL) con los preparados a ensayar. Como control positivo se usó un lote administrado con dexametasona fosfato sódico (adquirida a Norgreen y a Klonal), en tanto que el lote control recibió buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6. La administración fue repetida diariamente durante los 5 días siguientes. El 7^{mo} día las ratas fueron pesadas y luego de sacrificarlas por dislocación cervical se les extrajo el granuloma, el timo y el bazo, los cuales también fueron pesados. El aumento en el peso del algodón introducido permitió cuantificar el tejido inflamatorio (granulomatoso) depositado en el algodón (Meier *et al.*, 1950).

3.3.1.3. Cálculo del efecto antiinflamatorio y análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA con posterior comparación por las pruebas de Tukey o Dunnett. El grado de significancia de las

diferencias entre los lotes fue evaluado con el parámetro p , considerándose estadísticamente significativo un $p < 0,05$ (*). Para el procesamiento de los datos se empleó el programa GraphPad Prism Version 5.00. En los gráficos y en las tablas los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de la media (SEM). En todos los casos, salvo excepciones que son especificadas, el número de réplicas por experimento (n) fue = 6.

Los porcentajes de inhibición de la inflamación, como una medida de la acción antiinflamatoria, fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - V_T / V_C) \times 100$$

siendo V_C la medida promedio para el lote control (*volumen* para los modelos de edema de pata de rata, *masa* para el test del granuloma) y V_T la medida promedio para el lote que fue tratado con la droga en estudio. La misma fórmula fue usada para calcular los porcentajes de reducción de las masas del timo y del bazo.

3.3.2. Animales

En todos los ensayos de inflamación fueron empleadas ratas Wistar de ambos sexos proporcionadas por el bioterio de la Universidad Nacional de San Luis. En el laboratorio fueron pesadas y distribuidas en lotes de 6, dejadas en jaulas y abastecidas con alimento y agua *ad libitum* durante el período de los ensayos. Para los modelos de inflamación aguda se emplearon animales de entre 170 y 220 g y luego de los ensayos fueron sacrificados mediante una corriente de CO_2 . Los animales usados para los ensayos de inflamación crónica pesaron entre 90 y 140 g y fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

3.3.3. Dosis

Las dosis de Bh, Bb y Pm fueron preparadas resuspendiendo los liofilizados en agua estéril, mientras que para preparar las dosis de bromelina se resuspendió el polvo comercial en buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6. Todas las soluciones fueron preparadas en el momento de administrarlas.

3.3.4. Material vegetal ensayado

En la Tabla 3.2 se presentan los valores de actividad caseinolítica y contenido proteico por mg de liofilizado (UCas/mg y μg proteína/mg, respectivamente), así como la actividad específica (UCas/mg proteína) de los extractos parcialmente purificados obtenidos por precipitación etanólica a partir de frutos de *Bromelia hieronymi* (Bh), *Pseudananas macrodentes* (Pm) y *Bromelia balansae* (Bb). Debido a que se obtuvieron varios extractos

para cada material vegetal (Bh1-5, Bb1-4 y Pm1-4), esto se indica en cada una de las tablas en que se exponen los resultados obtenidos para cada experimento.

Liofilizados	UCas/mg liofilizado	µg proteína/mg liofilizado	UCas/mg proteína
Bh1	0,177 ± 0,004 [†]	18 ± 2 [†]	9,8
Bh2	0,173 ± 0,042 [†]	21 ± 3 [†]	8,2
Bh3	0,19 ± 0,03 [†]	18 ± 2 [†]	10,6
Bh4	0,20 ± 0,02 [†]	21 ± 2 [†]	9,7
Bh5	0,20 ± 0,02	19 ± 2	9
Bh (Promedio total ± DE)	0,19 ± 0,02	20 ± 2	10 ± 1
Bb1	0,161 ± 0,006 [†]	9 ± 1 [†]	17
Bb2	0,164 ± 0,03 [†]	9 ± 1 [†]	17
Bb3	0,135 ± 0,009 [†]	13 ± 1 [†]	10,4
Bb4	0,17 ± 0,01	14 ± 1	12
Bb (Promedio total ± DE)	0,16 ± 0,02	11 ± 3	14 ± 4
Pm1	0,17 ± 0,02	29 ± 4	5,9
Pm2	0,187 ± 0,009	30 ± 3	6
Pm3	0,25 ± 0,03 [†]	32 ± 4 [†]	9
Pm4	0,125 ± 0,013	25 ± 2	5
Pm (Promedio total ± DE)	0,18 ± 0,05	29 ± 3	6 ± 2
Bromelina (Sigma Aldrich)	0,63 ± 0,06	200 ± 20	3,2 ± 0,5

Tabla 3.2 Actividad caseinolítica, contenido proteico y actividad específica de los extractos parcialmente purificados. Media ± DE. [†]Error calculado como $[X_{\text{máximo}} - X_{\text{mínimo}}]/2$, siendo $X_{\text{máximo}}$ y $X_{\text{mínimo}}$ valores promedios (n = 3) máximo y mínimo, respectivamente, obtenidos de dos mediciones independientes. UCas: unidades caseinolíticas (pH 7,5 y 37°C).

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Modelos de inflamación aguda

3.4.1.1. Edema de pata de rata inducido por carragenina

3.4.1.1.1. *Bromelia hieronymi*

En un trabajo previo (Boeris *et al.*, 2004) se encontró que, en el modelo de edema de pata de ratón inducido por carragenina, una dosis de 50 mg/kg de un extracto parcialmente purificado obtenido de frutos de *Bromelia hieronymi* presentaba efecto antiinflamatorio. Esa dosis fue evaluada en ratas como una primera aproximación a la determinación de una dosis efectiva. En la Tabla 3.3 se muestran los volúmenes de edema promedio y los porcentajes de inhibición respecto al lote control medidos a 1, 3, 5 y 7 h post inyección de carragenina de lotes tratados con 50 mg/kg de Bh1 y con 50 mg/kg de bromelina.

Tiempo (h)	Control	Bh1 50 mg/kg		Bromelina 50 mg/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
1	0,25±0,02	0,20±0,02	20 _c	0,29±0,07	-14 _c
3	0,52±0,02	0,23±0,03	56 _a *	0,3±0,1	33 _{ca}
5	1,1±0,1	0,58±0,09	45 _{ca}	0,4±0,2	60 _a *
7	1,27±0,05	1,14±0,06	10 _c	0,5±0,2	60 _a **

Tabla 3.3. Efecto de Bh1 y bromelina en edema de pata de rata inducido por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p< 0,05, ** p< 0,01; las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p< 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

Tanto Bh como bromelina inhibieron significativamente la formación de edema en alguno de los tiempos de medida. Mientras Bh mostró actividad antiinflamatoria a las 3 h, tal como fue reportado (Boeris *et al.*, 2004), bromelina lo hizo a las 5 y 7 h post inyección de carragenina.

A fin de corroborar si al aumentar la dosis de Bh se lograba efecto antiinflamatorio en los otros tiempos de medida, se ensayaron dosis de 100 y 200 mg/kg. Además, puesto que la hipótesis de partida fue que la actividad proteolítica podría ser la responsable de la acción antiinflamatoria de los extractos, se tuvieron en cuenta las UCas/kg administradas. De la Tabla 3.2 puede deducirse que una dosis de 200 mg/kg de Bh1 equivale a un promedio de 35 UCas/kg. Con fines comparativos la dosis de bromelina se llevó a 55 mg/kg (equivalente a 35 UCas/kg).

En los resultados expuestos en la Tabla 3.4 puede observarse que Bh mostró un efecto antiinflamatorio significativo desde la primera hora, en la cual inhibió la formación de edema con una eficacia de alrededor del 35%, alcanzando el máximo valor a las 5 h con un porcentaje de inhibición significativamente similar al de bromelina e indometacina ($\approx 75\%$). Mientras que los porcentajes de inhibición de 100 y 200 mg/kg de Bh fueron significativamente equivalentes a los de la bromelina desde la primera hora hasta las 5 h, a las 7 h sólo la dosis de 200 mg/kg mantuvo un efecto significativamente similar al de bromelina ($\approx 70\%$). Dado que 55 mg/kg de bromelina y 200 mg/kg de Bh son equivalentes en actividad proteolítica (35-36 UCas/kg), los resultados de la Tabla 3.4 están acordes con la hipótesis de que la actividad proteolítica sería responsable de la actividad antiinflamatoria de los preparados enzimáticos. Para fortalecer esta hipótesis se probó el efecto que tiene la inhibición con E-64 de las proteasas cisteínicas sobre la acción antiinflamatoria exhibida por Bh y bromelina.

Tiempo (h)	Control	Bh1 50 mg/kg 9,0 \pm 0,2UCas/kg		Bh1 100 mg/kg 18,0 \pm 0,4UCas/kg		Bh1 200 mg/kg 35,4 \pm 0,8UCas/kg		Bromelina 55 mg/kg 35 \pm 3UCas/kg		Indometacina 10 mg/kg	
		Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
		1	0,34 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	29_{bc}	0,21 \pm 0,03	38_b*	0,22 \pm 0,02	35_b*	0,31 \pm 0,05	9_{bc}
3	0,59 \pm 0,06	0,52 \pm 0,09	12_c	0,27 \pm 0,03	54_{ba}**	0,25 \pm 0,02	58_b**	0,27 \pm 0,05	54_{ba}**	0,50 \pm 0,05	15_{ac}
5	1,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	44_a*	0,29 \pm 0,09	75_b***	0,26 \pm 0,01	78_b***	0,28 \pm 0,03	76_b***	0,40 \pm 0,04	66_{ba}***
7	1,24 \pm 0,09	0,9 \pm 0,1	27_{ac}	0,8 \pm 0,1	40_{ad}**	0,38 \pm 0,06	69_b***	0,32 \pm 0,06	74_b***	0,53 \pm 0,04	57_{bd}***

Tabla 3.4. Efecto de diferentes dosis de Bh1, bromelina e indometacina en edema de pata de rata inducido por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

3.4.1.1.1.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bh y bromelina

En la Tabla 3.5 se muestran los volúmenes de edema y los porcentajes de inhibición respecto al lote control de lotes tratados con 150 mg/kg de Bh4 y 150 mg/kg de Bh4 incubado con E-64 (Bh4/E-64), 50 mg/kg de bromelina y 50 mg/kg de bromelina incubada con E-64 (Bromelina/E-64) y 0,25 μ mol/kg de E-64 (equivalente a los μ moles contenidos en las dosis de Bh4/E-64 y bromelina/E-64).

Tiempo (h)	Control	Bh4 150 mg/kg 30±3 UCas/kg		Bh4/E-64 150 mg/kg 0,9±0,1 UCas/kg		Bromelina 50 mg/kg 32±3 UCas/kg		Bromelina/E-64 50 mg/kg 4±2 UCas/kg		E-64 0,25 µmol/Kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
	1	0,42±0,03	0,22±0,02	48_b***	0,26±0,04	38_b**	0,22±0,03	48_b***	0,28±0,02	33_{ba}*	0,40±0,03
3	0,67±0,07	0,20±0,03	70_b***	0,4±0,1	33_{cb}	0,18±0,02	73_b***	0,5±0,1	25_c	0,62±0,06	7,5_c
5	1,15±0,08	0,33±0,05	71_b***	1,0±0,2	13_c	0,20±0,01	83_b***	0,9±0,2	20_c	1,03±0,07	10_c
7	1,44±0,09	0,9±0,2	34_a*	1,25±0,06	13_{ac}	0,28±0,07	80_b***	1,3±0,2	9_c	1,20±0,07	17_c

Tabla 3.5. Efecto del tratamiento con E-64 de Bh y bromelina sobre la acción inhibitoria de edema de pata de rata inducido por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

Puede observarse que Bh y bromelina tuvieron efecto antiinflamatorio a lo largo de todo el ensayo, mientras que Bh/E-64 y bromelina/E-64 sólo mostraron efecto significativo en la primera h post inyección de carragenina. Aún cuando durante todo el ensayo los porcentajes de inhibición de Bh fueron más altos que los de Bh/E-64, sólo a las 5 h lo fue estadísticamente significativo (71% > 13%, p<0,05). Por su parte los porcentajes de inhibición de bromelina fueron significativamente superiores a los de bromelina/E-64 a las 3, 5 y 7 h post inyección de carragenina. E-64 no mostró efecto antiinflamatorio en ningún tiempo de medida.

Dado que al eliminar la actividad proteolítica de Bh y bromelina se observó una pérdida de actividad antiinflamatoria desde las 3 h, siendo más evidente en los tiempos en que Bh y bromelina muestran los máximos porcentajes de inhibición (a las 5 h para Bh y a las 5 y 7 h para bromelina), se podría suponer que las cisteínendopeptidasas serían las responsables de la actividad antiinflamatoria medida para Bh y bromelina a partir de las 3 h post inyección de carragenina. Por otro lado, teniendo en cuenta el rol secuencial de los distintos mediadores de la inflamación descritos para este modelo, también se podría suponer que las cisteínendopeptidasas de Bh y bromelina inhibirían la infiltración/actividad de neutrófilos o la síntesis/acción de NO y PGs, los cuales alcanzan picos de producción entre las 3 y las 6 h post inyección de carragenina (Salvemini *et al.*, 1996). Tanto la inhibición de la migración de neutrófilos como de la producción de PGs y NO ya han sido demostradas para la bromelina en otros modelos (Gaspani *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2006; Fitzhugh *et al.*, 2008; Kalra *et al.*, 2008; Bhui *et al.*, 2012).

Los bajos porcentajes de inhibición medidos en la primera hora post inyección de carragenina, respecto a los de las siguientes horas, para Bh (Tablas 3.3, 3.4 y 3.5) y para bromelina (Tabla 3.5) estarían indicando que Bh y bromelina tienen un bajo efecto inhibitorio

sobre los mediadores de la primera fase del modelo. Aunque otra explicación posible es que durante la primera hora aún no se haya alcanzado la concentración efectiva de los compuestos activos en el sitio de acción. Sea cual fuere la causa, de la información aportada en la Tabla 3.5 se puede concluir que los efectos antiinflamatorios de Bh y bromelina en la primera hora no dependerían de la actividad proteolítica de las cisteinendopeptidasas.

3.4.1.1.2. *Pseudananas macrodontes*

Los resultados obtenidos para Bh y bromelina fueron tenidos en cuenta para establecer las dosis a ensayar de los extractos obtenidos a partir de frutos de *Pseudananas macrodontes* (Pm). En la Tabla 3.6 se presentan los volúmenes y porcentajes de inhibición de edema inducida por carragenina en el modelo de pata de rata a distintas horas para 90 y 180 mg/kg de Pm1 (equivalentes a 15 y \approx 30 UCas/kg, respectivamente), 50 mg/kg de bromelina y 10 mg/kg de indometacina.

Tiempo (h)	Control	Pm1 90 mg/kg 15 \pm 2 UCas/kg		Pm1 180 mg/kg 31 \pm 4 UCas/kg		Bromelina 50 mg/kg 32 \pm 3 UCas/kg		Indometacina 10 mg/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
1	0,27 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	28_{bc}	0,12 \pm 0,02	55_b***	0,18 \pm 0,02	33_{bc}	0,24 \pm 0,02	11_c
3	0,64 \pm 0,07	0,35 \pm 0,04	45_{ba}**	0,19 \pm 0,02	70_b***	0,29 \pm 0,03	55_b***	0,55 \pm 0,06	14_{ca}
5	1,14 \pm 0,08	0,6 \pm 0,2	46_b**	0,23 \pm 0,02	80_b***	0,28 \pm 0,02	75_b***	0,38 \pm 0,03	67_b***
7	1,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	37_a*	0,20 \pm 0,02	85_b***	0,45 \pm 0,04	65_d***	0,55 \pm 0,04	58_{ad}***

Tabla 3.6. Efecto de diferentes dosis de Pm1, bromelina e indometacina en edema de pata de rata inducido por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

Puede observarse que ambas dosis de Pm tuvieron efecto antiinflamatorio significativo, alcanzando los máximos porcentajes de inhibición de edema entre las 3 y las 5 h para la menor dosis y entre las 5 y las 7 h para la mayor dosis. Por lo tanto Pm es más efectivo en la fase tardía propuesta para el modelo de edema inducido por carragenina.

Si bien en este ensayo bromelina no alcanzó los porcentajes de inhibición medidos en los anteriores experimentos (Tablas 3.4 y 3.5), puede verse que hasta las 5 h fueron significativamente similares a los de Pm (180 mg/kg). Teniendo en cuenta los valores de la Tabla 3.2 se observa que la mayor dosis de Pm (180 mg/kg) es equivalente en UCas (\approx 30 UCas/kg) a las dosis probadas para bromelina y Bh4 (Tabla 3.5), mostrando los tres preparados efectos similares. Por otro lado, los porcentajes de inhibición de la dosis de 90

mg/kg de Pm (equivalente a 15 UCas/kg) y de 100 mg/kg de Bh1 (equivalente a 18 UCas/kg) mostrados en la Tabla 3.4, son similares, a excepción de los medidos a las 5 h.

3.4.1.1.2.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Pm

A fin de poner a prueba la hipótesis de que la actividad proteolítica es necesaria para el efecto antiinflamatorio de Pm, del mismo modo que para Bh y bromelina se midió el efecto antiinflamatorio luego de inhibir las cisteínendopeptidasas con E-64 (Tabla 3.7).

Tiempo (h)	Control	Pm1 180 mg/kg 31±4 UCas/kg		Pm1/E-64 180 mg/kg 0,4±0,2 UCas/kg		E-64 0,2 µmol/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
1	0,38±0,03	0,17±0,03	55 _b **	0,28±0,06	26 _{ba}	0,36±0,03	5 _{ca}
3	0,60±0,07	0,17±0,02	72 _b ***	0,32±0,06	47 _b **	0,56±0,06	7 _c
5	1,04±0,08	0,21±0,03	80 _b **	0,66±0,3	36 _{cb}	0,93±0,07	11 _c
7	1,26±0,1	0,21±0,04	83 _a ***	0,9±0,2	29 _b *	1,08±0,07	14 _{cb}

Tabla 3.7. Efecto del tratamiento con E-64 sobre el efecto antiinflamatorio de Pm en modelo de edema de pata generado por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

En la Tabla 3.7 se puede observar que los porcentajes de inhibición de Pm fueron superiores a los de la misma dosis de Pm tratada con E-64 (Pm/E-64), llegando a ser poco más del doble a las 1, 5 y 7 h post inyección de carragenina, lo cual estaría indicando que las cisteínendopeptidasas contribuyen al efecto antiinflamatorio de Pm. No obstante, esta contribución no parece ser la única, puesto que tanto a las 3 como a las 7 h Pm/E-64 mostró efecto antiinflamatorio significativo, sugiriendo que otro/s componente/s presente/s en Pm estaría/n actuando principalmente sobre la fase tardía.

Ante este resultado se hicieron ensayos posteriores a fin de dilucidar el posible componente con actividad antiinflamatoria de Pm. Si bien las UCas/mg de Pm/E-64 fueron 0,002 ± 0,001 y por tanto la dosis de 180 mg/kg equivalió a 0,4 UCas/kg, la primera posibilidad que se evaluó es que en el caso de Pm/E-64 las proteasas no hubieran sido completamente inhibidas. En ensayos posteriores se evaluó la actividad fibrinolítica (mm²) de Pm1 mediante el ensayo de la placa de fibrina¹³ por tratarse de un método muy sensible (Jespersen & Astrup, 1983) y pudo determinarse que la dosis de Pm1 contenía 65,8 (±0,8) x10³ mm²/kg, mientras que la dosis de Pm1/E-64 contenía 20,6 (±0,4) x10³ mm²/kg, un 31% de la actividad fibrinolítica de Pm1. Por lo tanto no puede descartarse la posibilidad de que

¹³ Ver 4.4.3 (Capítulo Efecto anticoagulante, fibrinogenolítico y fibrinolítico)

las proteasas sean las responsables de la actividad antiinflamatoria de Pm/E-64. De todos modos, dado que al inhibir las proteasas cisteínicas de Pm (llevando la dosis a 0,4 UCas/kg) los porcentajes de inhibición de edema disminuyen aproximadamente un 50% respecto a los de la dosis de 31 UCas/kg de Pm, podría atribuirse actividad antiinflamatoria a las proteasas cisteínicas de Pm. Dilucidar el grado de participación de las mismas en el proceso requerirá ensayos ulteriores.

3.4.1.1.3. *Bromelia balansae*

Siguiendo el mismo razonamiento que para Pm, las dosis a ensayar de los extractos parcialmente purificados obtenidos a partir de frutos de *B. balansae* (Bb) fueron definidas de manera que contuvieran la misma actividad proteolítica que las dosis efectivas de bromelina y Bh (entre 10 y 35 UCas/kg). En un primer ensayo se probó una dosis intermedia, 120 mg/kg de Bb1, equivalente a aproximadamente 20 UCas/kg (Tabla 3.8).

Tiempo (h)	Control	Bb1 120 mg/kg 19±1 UCas/kg		Bromelina 50 mg/kg 32±3 UCas/kg		Indometacina 10 mg/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
1	0,27±0,03	0,22±0,04	19 _c	0,18±0,02	33 _c	0,24±0,02	11 _c
3	0,64±0,07	0,3±0,1	53 _b *	0,29±0,03	55 _b *	0,55±0,06	14 _{cb}
5	1,14±0,08	0,5±0,2	56 _b ***	0,28±0,02	75 _b ***	0,38±0,03	67 _b ***
7	1,3±0,1	0,6±0,2	51 _b **	0,45±0,04	65 _b ***	0,55±0,04	58 _b ***

Tabla 3.8. Efecto de Bb, bromelina e indometacina sobre el edema de pata generado por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media ± SEM (n=6, excepto n=5 para el lote Bb1 a las 5 y 7 h). Test de Tukey: * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p< 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

En este caso, entre las 3 y las 5 h una rata del lote tratado con Bb murió, por lo que a las 5 y 7 h el valor de n fue igual a 5. Como puede verse en la Tabla 3.8, Bb mostró porcentajes de inhibición significativos a las 3, 5 y 7 h post inyección de carragenina, los cuales no se diferenciaron estadísticamente de los de bromelina, así como tampoco de los de indometacina a las 5 y 7 h. A la h post inyección de carragenina ninguno de los compuestos ensayados mostró porcentajes de inhibición significativos.

3.4.1.1.3.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bb

En otro experimento (Tabla 3.9) se probaron dos dosis de Bb2, 100 y 200 mg/kg, equivalentes aproximadamente a 15 y 30 UCas/kg, respectivamente, así como 200 mg/kg de Bb2 tratado con E-64 (Bb2/E-64).

La dosis de 200 mg/kg de Bb2 fue antiinflamatoria sólo a las 7 h post inyección de carragenina, mostrando un porcentaje de inhibición significativamente similar al de diclofenac sódico (50 mg/kg). La misma dosis de Bb tratada con E-64 (Bb2/E-64) no mostró efecto antiinflamatorio, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de Bb2 y Bb2/E-64. Las dosis de 100 mg/kg de Bb2 y E-64 (0,25 µmol/kg) no mostraron efecto significativo en ningún tiempo de medida.

Tiempo (h)	Control	Bb2 100 mg/kg 16±3 UCas/kg		Bb2 200 mg/kg 33±6 UCas/kg		Bb2/E-64 200 mg/kg 0,5±0,1 UCas/kg		E-64 0,25 µmol/kg		Diclofenac sódico 50 mg/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
1	0,33±0,03	0,28±0,04	15_c	0,33±0,08	0_c	0,43±0,05	-30_c	0,31±0,07	6_c	0,24±0,03	27_c
3	0,7±0,1	0,9±0,2	-19_c	0,5±0,1	32_c	0,9±0,1	-32_c	0,6±0,2	14_c	0,35±0,05	52_c
5	1,4±0,1	1,1±0,3	24_{bc}	0,8±0,3	48_{bc}	1,1±0,2	23_{bc}	0,9±0,2	34_{bc}	0,44±0,07	69_b*
7	1,5±0,1	1,1±0,2	30_{bc}	0,8±0,2	48_b*	0,99±0,07	35_{bc}	1,0±0,2	33_{bc}	0,73±0,08	52_b*

Tabla 3.9. Efecto de diferentes dosis de Bb y Bb/E-64 sobre el edema de pata generado por carragenina. Los volúmenes de edema son expresados como la media ± SEM (n = 6, excepto n=5 para el lote Bb2/E-64 a partir de las 5 h). Test de Tukey: * p< 0,05, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p< 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

Al comparar los resultados de la Tabla 3.9 con los de la Tabla 3.8 puede observarse que si bien el efecto antiinflamatorio se sigue manifestando en la fase tardía propuesta para este modelo, la dosis de 200 mg/kg (33 ± 6 UCas/kg) de Bb2 fue menos efectiva que la de 120 mg/kg (19 ± 1 UCas/kg) de Bb1, lo cual no sería lo esperado si tenemos en cuenta la actividad proteolítica de ambas. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor E-64 produjo una pérdida del efecto antiinflamatorio de Bb2, concordante con la hipótesis de que la actividad de las proteasas presentes en Bb es la causante de tal efecto. Una característica común de los valores de las Tablas 3.8 y 3.9 es la alta dispersión de los volúmenes medidos para los lotes tratados con Bb, hecho que no se observa en los valores de los lotes controles, así como tampoco en lotes tratados con diclofenac sódico e indometacina.

Por otro lado, es necesario mencionar que otros ensayos con Bb presentaron cierta dificultad en relación a una posible toxicidad. En un ensayo el 50% de los animales que recibieron una dosis de Bb (Bb3, Tabla 3.2) equivalente a 35 UCas/kg murieron entre las 3 y las 6 h post inyección de carragenina. En otro ensayo en que se probaron dosis equivalentes a 10, 20 y 30 UCas/kg, varios animales de los tres lotes tratados mostraron signos típicos de toxicidad (pasividad motora, alteración respiratoria, erección pilomotor y extremidades cianóticas) a partir de la primera hora post inyección de carragenina y entre las 4 y 5 h murieron. Por lo expuesto no debería descartarse la posibilidad de que Bb

presente cierta toxicidad a las dosis ensayadas, hecho que deberá comprobarse mediante futuros ensayos de toxicidad.

Sin dejar de lado las dificultades señaladas, de los resultados obtenidos se puede concluir que Bb muestra efecto antiinflamatorio significativo sólo sobre la fase tardía del modelo de edema de pata (Di Rosa *et al.*, 1971; Salvemini *et al.*, 1996), mostrando menores porcentajes de inhibición que dosis equivalentes en actividad proteolítica de Bh, Pm y bromelina. Además, el efecto antiinflamatorio de Bb podría estar relacionado con la actividad proteolítica de sus cisteinendopeptidasas.

3.4.1.2. Otros modelos de inflamación aguda

Como ya se ha mencionado, la primera fase (0-1 h) del desarrollo de edema de pata inducido por carragenina es mediada principalmente por histamina y serotonina (Di Rosa *et al.*, 1971; Salvemini *et al.*, 1996). Para corroborar si el efecto inhibitorio de edema observado en la primera h para Bh, Pm y bromelina se debía a un efecto inhibitorio sobre alguno de estos mediadores, se evaluaron las dosis efectivas de dichos preparados a esa h en los modelos de edema de pata inducidos por histamina y por serotonina.

3.4.1.2.1. Edema de pata inducido por histamina en ratas

En la Tabla 3.10 se consignan los volúmenes de edema y los respectivos porcentajes de inhibición de edema a los 15, 30 y 60 min post inyección de histamina. Se evaluaron dosis de Bh, Pm y bromelina cuyos contenidos en UCas fueran equivalentes a las de las dosis que en el modelo de edema inducido por carragenina fueron efectivas en la primera hora, esto es: 200 mg/kg de Bh2 (equivalente a 35 ± 8 UCas/kg), 170 mg/kg de Pm2 (equivalente a 32 ± 2 UCas/kg) y 55 mg/kg de bromelina (equivalente a 35 ± 3 UCas/kg).

Tiempo (min)	Control	Bh2 200 mg/kg 35±8 UCas/kg		Pm2 170 mg/kg 32±2 UCas/kg		Bromelina 55 mg/kg 35±3 UCas/kg	
		Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
15	0,39±0,03	0,46±0,03	-18 _c	0,38±0,03	2,5 _c	0,45±0,02	-15 _c
30	0,34±0,03	0,41±0,03	-21 _c	0,34±0,03	0 _c	0,44±0,03	-30 _c
60	0,32±0,03	0,33±0,04	-3 _c	0,31±0,03	3 _c	0,42±0,04	-31 _c

Tabla 3.10. Efecto de Bh, Pm y bromelina sobre el edema inducido histamina. Los volúmenes de edema son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con $p < 0,05$, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a $p < 0,05$.

Puede observarse que ninguno de los compuestos probados fue efectivo a las dosis probadas. Por tanto, es lícito suponer que los efectos antiinflamatorios medidos para Bh, Pm y bromelina en la primera hora post inyección de carragenina no se deben a la inhibición de la acción de la histamina.

La bibliografía en relación al efecto de la bromelina sobre la inflamación mediada por histamina es escasa. Según Kumakura *et al.* (1988), dosis crecientes de bromelina administradas intravenosamente aumentaban el exudado plasmático inducido por histamina a los 30 min en el modelo de “bolsa de aire” en ratas.

3.4.1.2.2. Edema de pata inducido por serotonina en ratas

3.4.1.2.2.1. *Bromelia hieronymi*

En la Tabla 3.11 se exponen los volúmenes de edema y los porcentajes de inhibición de edema a los 30, 60 y 120 min post inyección de serotonina para 100 y 200 mg/kg de Bh2 (equivalentes a 17 ± 4 y 35 ± 8 UCas/kg, respectivamente) y para 55 mg/kg de bromelina (equivalente a 35 ± 3 UCas/kg).

Tiempo (min)	Control	Bh2 100 mg/kg 17±4 UCas/kg		Bh2 200 mg/kg 35±8 UCas/kg		Bromelina 55 mg/Kg 35±3 UCas/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
30	1,22±0,05	1,18±0,05	3,3_c	0,8±0,1	37_a**	0,60±0,09	51_a***
60	1,09±0,04	1,16±0,05	-6_c	0,8±0,1	28_a*	0,63±0,08	42_a**
120	0,83±0,04	0,70±0,03	16_{ac}	0,66±0,07	20_{ac}	0,57±0,07	31_a*

Tabla 3.11. Efecto de Bh2 y bromelina sobre el edema inducido por serotonina. Los volúmenes de edema son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con $p < 0,05$, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a $p < 0,05$.

El efecto medido para bromelina es concordante con el reportado por Netti *et al.* (1972), quienes midieron un porcentaje de inhibición de $\approx 40\%$ a los 60 min post inyección de serotonina en ratas que recibieron por vía oral bromelina (100 mg/animal) 4 h previas a la inyección de serotonina.

Bh exhibió porcentajes de inhibición significativos a los 30 y 60 min sólo con la dosis de 200 mg/kg. Si bien dichos valores fueron inferiores a los de la bromelina, no fueron significativamente diferentes. Estos resultados estarían indicando que la inhibición que ejercen Bh y bromelina sobre el edema inducido por carragenina estaría, al menos en parte, mediada por un efecto inhibitor de la acción de la serotonina.

3.4.1.2.2.2. *Pseudananas macrodontes*

En la Tabla 3.12 se muestra el efecto de una dosis de Pm2 (170 mg/kg) equivalente a 32 ± 2 UCas/kg sobre el edema de pata inducido por serotonina. Pm mostró un porcentaje de inhibición significativo sólo a los 30 min. Por lo tanto, así como en el caso de Bh y bromelina, parte del efecto antiinflamatorio evaluado a la hora post inyección de carragenina se podría deber a un efecto inhibitorio sobre la acción de la serotonina.

Tiempo (min)	Control	Pm2 170 mg/kg 32±2 UCas/kg		Bromelina 50 mg/kg 32±3 UCas/kg	
	Edema (mL)	Edema (mL)	Inhibición (%)	Edema (mL)	Inhibición (%)
30	1,05±0,07	0,8±0,1	29 _a *	0,52±0,03	50 _a ***
60	0,87±0,07	0,7±0,1	22 _{ca}	0,50±0,04	42 _a *
120	0,67±0,06	0,6±0,1	20 _c	0,46±0,04	31 _c

Tabla 3.12. Efecto de Pm2 sobre el edema inducido por serotonina. Los volúmenes de edema son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p< 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

3.4.2. Modelo de inflamación crónica: test del granuloma

Como primera aproximación, en el modelo de inflamación crónica se probaron las dosis de los preparados que mostraron efecto antiinflamatorio sobre el edema de pata inducido por carragenina.

Como control positivo se utilizó dexametasona, la cual posee, entre otros efectos adversos típicos de los glucocorticoides, efectos inmunosupresor y catabólico. Con el objetivo de comparar dichos efectos con los de los preparados proteolíticos se calcularon, como una medida del efecto inmunosupresor, los porcentajes de reducción de las masas del timo y del bazo (Ben Rhouma & Sakly, 1994; Hori *et al.*, 1996); mientras que el efecto catabólico fue medido calculando la pérdida de masa corporal (se pesaron los animales antes y después del tratamiento y la diferencia de peso corporal fue comparada con los controles).

3.4.2.1. *Bromelia hieronymi*

En la Tabla 3.13 se exponen los resultados obtenidos para 90 y 180 mg/kg de Bh3 (equivalentes a 17 ± 3 y 34 ± 5 UCas/kg, respectivamente), 55 mg/kg de bromelina (equivalente a 35 ± 3 UCas/kg) y dexametasona (3 mg/kg) en el test del granuloma inducido por pellet de algodón.

	Granuloma		Timo		Bazo	
	Peso (g)	Inhibición (%)	Peso (g)	Reducción (%)	Peso (g)	Reducción (%)
Control	0,54±0,06		0,43±0,02		0,78±0,09	
Bh3 (90 mg/kg- 17±3 UCAs/kg)	0,47±0,02	13_c	0,35±0,02	18_{bc}	0,9±0,1	-9_c
Bh3 (180 mg/kg- 34±5 UCAs/kg)	0,32±0,01	41_b**	0,31±0,02	28_b**	0,7±0,1	7_c
Bromelina (55 mg/kg- 35±3 UCAs/kg)	0,36±0,05	34_b**	0,31±0,02	28_b**	0,77±0,08	1_c
Dexametasona (3 mg/kg)	0,24±0,01	55_a***	0,11±0,02	74_a***	0,40±0,04	49_b*

Tabla 3.13. Efecto de Bh3, bromelina y dexametasona sobre el granuloma inducido por pellet de algodón y sobre los pesos de timos y bazos. Los pesos son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

La dosis de 180 mg/kg de Bh, bromelina (55 mg/kg) y dexametasona (3 mg/kg) resultaron antiinflamatorias. Bh (180 mg/kg) y bromelina mostraron porcentajes de inhibición de granuloma significativamente similares, pero ambos fueron significativamente inferiores al de dexametasona. En relación al efecto inmunosupresor, mientras dexametasona causó significativa reducción del peso de bazos y timos, Bh (180 mg/kg) y bromelina sólo redujeron el peso de los timos mostrando porcentajes iguales (28%) aunque significativamente inferiores al de dexametasona (74%). Por otra parte la dosis de 90 mg/kg de Bh no fue antiinflamatoria pero tampoco redujo los pesos de los bazos y los timos.

En la Figura 3.1 se muestran los cambios de peso corporal

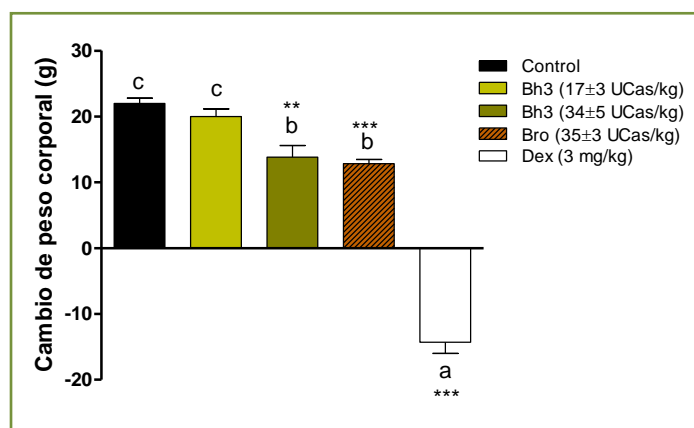


Figura 3.1. Efecto de Bh3, bromelina (Bro) y dexametasona (Dex) sobre los pesos corporales de las ratas tratadas durante el ensayo del test de granuloma. Los valores (diferencia de pesos antes y después del tratamiento) son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con p < 0,05, la letra “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

Bh (180 mg/kg) y bromelina no provocaron pérdida de masa corporal, aun cuando la ganancia en masa corporal (14 y 13 g, respectivamente) fuera significativamente más baja que la del lote control (22 g). En cambio, dexametasona provocó una significativa pérdida de masa corporal (-14 g) respecto al control. El lote tratado con la dosis de 90 mg/kg de Bh no mostró cambios respecto al lote control.

Por lo tanto, si bien Bh (180 mg/kg) y bromelina (55 mg/kg) fueron menos efectivas que dexametasona (3 mg/kg) para inhibir la formación del granuloma, también mostraron menos efectos sobre bazo, timos y masa corporal.

Debido a la similitud en el contenido de UCas (≈ 35 UCas/kg) de las dosis de Bh (180 mg/kg) y de bromelina (55 mg/kg) que mostraron similares efectos en el test del granuloma, se probó si dichos efectos dependían de la acción de proteasas cisteínicas.

3.4.2.1.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bh y bromelina en el test del granuloma

A fin de determinar si la actividad proteolítica de Bh y bromelina es causa de la acción antiinflamatoria evaluada en el test del granuloma, se ensayaron Bh y bromelina con y sin actividad proteolítica (luego de inhibir con E-64). Los resultados se muestran en la Tabla 3.14.

	Granuloma		Timo		Bazo	
	Peso (g)	Inhibición (%)	Peso (g)	Reducción (%)	Peso (g)	Reducción (%)
Control	0,36 \pm 0,02		0,43 \pm 0,03		0,53 \pm 0,08	
Bromelina (55 mg/kg- 35 \pm 3 UCas/kg)	0,272 \pm 0,006	24_a**	0,33 \pm 0,02	23_a*	0,8 \pm 0,2	-42_c
Bromelina/E-64 (55 mg/kg- 2 \pm 3 UCas/kg)	0,39 \pm 0,04	-8_c	0,46 \pm 0,03	-7_c	0,65 \pm 0,09	-23_c
Bh5 (180 mg/kg- 36 \pm 4 UCas/kg)	0,39 \pm 0,01	-8_c	0,42 \pm 0,01	2_c	0,82 \pm 0,2	-55_c
Bh5/E-64 (180 mg/kg- 1 \pm 2 UCas/kg)	0,40 \pm 0,03	-11_c	0,40 \pm 0,02	7_{ca}	0,6 \pm 0,1	-19_c
E-64 (0,3 μ mol/kg)	0,39 \pm 0,04	-8_c	0,421 \pm 0,009	2_c	0,6 \pm 0,1	-15_c
Dexametasona (3 mg/kg)	0,230 \pm 0,006	36_a***	0,042 \pm 0,003	90_b***	0,33 \pm 0,08	38_c

Tabla 3.14. Efecto de Bh5 y bromelina con actividad proteolítica y sin actividad proteolítica (Bh5/E-64 y bromelina/E-64), E-64 y dexametasona sobre el granuloma inducido por pellet de algodón y sobre los pesos de timos y bazo. Los pesos son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

En el caso de bromelina puede observarse que al inhibir sus cisteínendopeptidasas con E-64 pierde su efecto antiinflamatorio: el porcentaje de inhibición cambia de 24% a -8%, dejando de ser significativo. Lo mismo sucede con el efecto reductor sobre el peso de los

timos: el porcentaje de reducción para bromelina es de 23%, mientras que para bromelina/E-64 es de -7%. Por tanto, las cisteínendopeptidasas no sólo estarían actuando como antiinflamatorias sino también ejerciendo un leve efecto reductor sobre el peso de los timos. En este ensayo el porcentaje de reducción del peso de los timos provocado por bromelina fue aproximadamente 1/4 del de dexametasona, mientras que los porcentajes de inhibición del granuloma de ambas fueron significativamente similares. E-64 (0,3 µmol/kg) no tuvo efecto sobre los granulomas, así como tampoco sobre los pesos de los timos y los bazos.

Los resultados obtenidos para Bh no permiten sacar ninguna conclusión respecto al rol que tendrían sus cisteínendopeptidasas como antiinflamatorias puesto que, a diferencia de los datos consignados en la Tabla 3.13, Bh no tuvo efecto inhibitor significativo de los granulomas, así como tampoco efecto reductor de los timos, además de no encontrarse diferencia significativa entre Bh y Bh/E-64. Los efectos de Bh y Bh/E-64 fueron ensayados una vez más, pero no pudieron extraerse resultados concluyentes. Una posible explicación a la dificultad en la reproducibilidad de los resultados para Bh probablemente obedezca a la poca sensibilidad que el test de granuloma inducido por algodón tiene, especialmente para antiinflamatorios no esteroideos (Bailey *et al*, 1982).

En relación al efecto sobre el peso corporal, no se observaron diferencias significativas respecto al control para bromelina y para bromelina inhibida con E-64. El E-64 produjo una ganancia de masa corporal significativamente mayor que la de los controles. Pero ninguno de los compuestos probados, a excepción de dexametasona, produjeron pérdida de masa corporal (Figura 3.2).

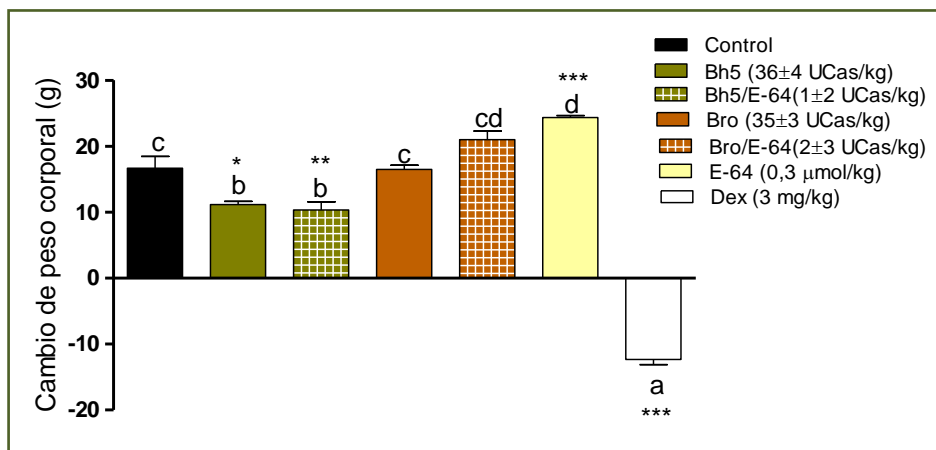


Figura 3.2. Efecto de Bh5, bromelina (Bro) y Bh5 y bromelina inhibidas con E-64 (Bh5/E-64 y Bro/E-64, respectivamente), E-64 y dexametasona (Dex) sobre los pesos corporales de las ratas tratadas durante el ensayo del test del granuloma. Los valores (diferencia de pesos antes y después del tratamiento) son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con p< 0,05, la letra “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

3.4.2.2. *Pseudananas macrodentes* y *Bromelia balansae*

En un mismo ensayo se probaron dosis equivalentes en actividad proteolítica (≈ 30 UCas/kg) de Pm y Bb, cuyos efectos fueron comparados con los de bromelina (50 mg/kg equivalente a ≈ 30 UCas/kg) y dexametasona (3 mg/kg). Como en todos los ensayos, los lotes estuvieron conformados por 6 animales, excepto en el caso de Pm, donde los datos provienen de 4 animales, ya que dos de ellos murieron luego de la tercera y cuarta dosis. Puede observarse en la Tabla 3.15 que Pm y Bb mostraron porcentajes de inhibición del granuloma similares a los de bromelina. Los porcentajes de reducción del timo para Pm y Bb fueron significativamente similares entre sí y, si bien mayores, no se diferenciaron significativamente de los de bromelina.

	Granuloma		Timo		Bazo	
	Peso (g)	Inhibición (%)	Peso (g)	Reducción (%)	Peso (g)	Reducción (%)
Control	0,54 \pm 0,03		0,38 \pm 0,03		0,71 \pm 0,07	
Pm3 (130 mg/kg- 33 \pm 4 UCas/kg)	0,36 \pm 0,02	33_{ab}**	0,20 \pm 0,01	47_b***	0,8 \pm 0,1	-8_c
Bb 4 (180 mg/kg- 31 \pm 2 UCas/kg)	0,41 \pm 0,04	24_a*	0,21 \pm 0,01	45_b***	0,52 \pm 0,07	27_{cb}
Bromelina (50 mg/kg- 32 \pm 3 UCas/kg)	0,36 \pm 0,02	33_{ab}**	0,28 \pm 0,02	26_b**	0,70 \pm 0,07	1_c
Dexametasona (3 mg/kg)	0,24 \pm 0,01	56_b***	0,10 \pm 0,02	74_a***	0,36 \pm 0,04	49_b*

Tabla 3.15. Efecto de Pm3, Bb4, bromelina y dexametasona sobre el granuloma inducido por pellet de algodón y sobre los pesos de timos y bazos. Los pesos son expresados como la media \pm SEM (n = 6, excepto para Pm n=4). Test de Tukey: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

Los porcentajes de reducción de los timos de los preparados proteolíticos fueron significativamente menores al de dexametasona y, a diferencia de ésta, no mostraron efecto reductor significativo sobre el peso de los bazos.

En la Figura 3.3 pueden observarse los cambios en los pesos corporales de los animales tratados. Si bien los animales de los lotes tratados con los preparados proteolíticos no aumentaron de peso en la misma cantidad que los del lote control, no padecieron pérdida de masa corporal, como sí ocurrió con los del lote tratado con dexametasona.

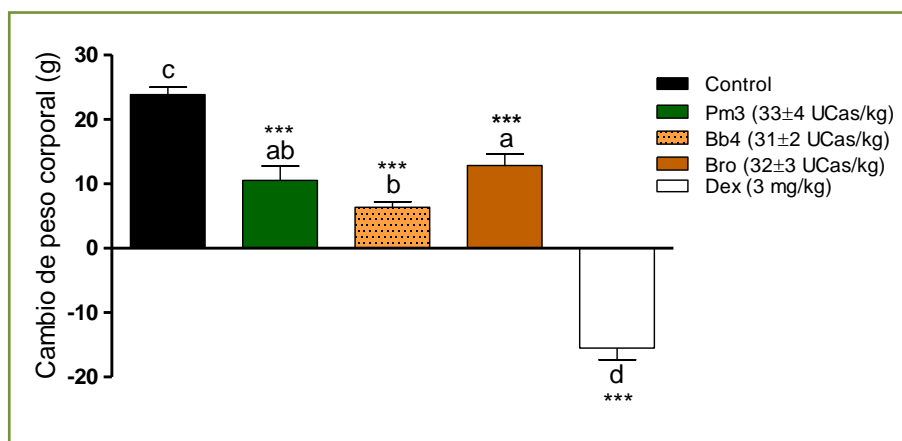


Figura 3.3. Efecto de Pm, Bb, bromelina (Bro) y dexametasona (Dex) sobre los pesos corporales de las ratas tratadas durante el ensayo del test de granuloma. Los valores (diferencia de pesos antes y después del tratamiento) son expresados como la media \pm SEM (n=6, excepto para Pm, n=4). Test de Tukey: *** p < 0,001, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con p < 0,05, la letra “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

Los efectos de Pm y Bb sobre los distintos parámetros evaluados en este modelo fueron similares a los de Bh3 (Tabla 3.13). Sin embargo, la muerte de dos animales del lote tratado con Pm podría estar indicando un efecto tóxico del preparado.

3.4.2.2.1. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Bb en el test del granuloma

En la Tabla 3.16 se exponen los resultados obtenidos para 180 mg/kg de Bb2 equivalente a 30 UCAs/kg y para 180 mg/kg de Bb2 tratada con E-64 (Bb2/E-64). Puede observarse que Bb no mostró efecto inhibitor significativo sobre los granulomas y su porcentaje de inhibición no se diferenció significativamente del de Bb/E-64. Tampoco se observaron efectos significativos de Bb y Bb/E-64 sobre el peso de los timos.

	Granuloma		Timo		Bazo	
	Peso (g)	Inhibición (%)	Peso (g)	Reducción (%)	Peso (g)	Reducción (%)
Control	0,50±0,03		0,36±0,02		0,68±0,03	
Bb 2 (180 mg/kg 30±5 UCAs/kg)	0,52±0,08	-4_c	0,36±0,03	0_c	0,98±0,05	-44_a***
Bb2/E-64 (180 mg/kg 0,06±0,01 UCAs/kg)	0,39±0,05	22_c	0,28±0,03	22_c	0,95±0,08	-40_a**
Dexametasona (3 mg/kg)	0,230±0,005	54_a***	0,050±0,004	86_a***	0,34±0,01	50_b***

Tabla 3.16. Efecto de Bb2 con actividad proteolítica y sin actividad proteolítica (Bb2/E-64) y dexametasona sobre el granuloma inducido por pellet de algodón y sobre los pesos de timos y bazos. Los pesos son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: ** p < 0,01, *** p < 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p < 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p < 0,05.

A diferencia de lo observado para los preparados en los anteriores ensayos del test del granuloma, los bazos aumentaron significativamente de peso. Este efecto fue independiente de la actividad proteolítica de Bb.

En la Figura 3.4 se muestran los efectos de Bb y Bb/E-64 sobre los pesos corporales de los animales. Si bien los animales del lote tratado con Bb proteolíticamente activo no aumentaron de peso en la misma cantidad que los del lote control, no mostraron pérdida de masa corporal, como sí ocurrió con los del lote tratado con dexametasona.

Siendo que la dosis de Bb2 tiene el mismo contenido de UCas (30) que la dosis de Bb4 que sí mostró efecto antiinflamatorio (Tabla 3.15), pudo existir algún otro factor que no se ha controlado y afectó a las medidas, conduciendo a los resultados contradictorios de las Tablas 3.15 y 3.16. Como se mencionó anteriormente, la falta de reproducibilidad podría deberse a la baja sensibilidad del test del granuloma para compuestos no esteroideos (Bailey *et al.*, 1982). Por otro lado, Bb2 es el mismo preparado que mostró bajo porcentaje de inhibición en el modelo de edema de pata inducido por carragenina (Tabla 3.9). El aumento en el tamaño de los bazos podría estar relacionado con el posible efecto tóxico que ha sido detectado en algunos de los ensayos en que se probó Bb y que podría enmascarar su acción antiinflamatoria.

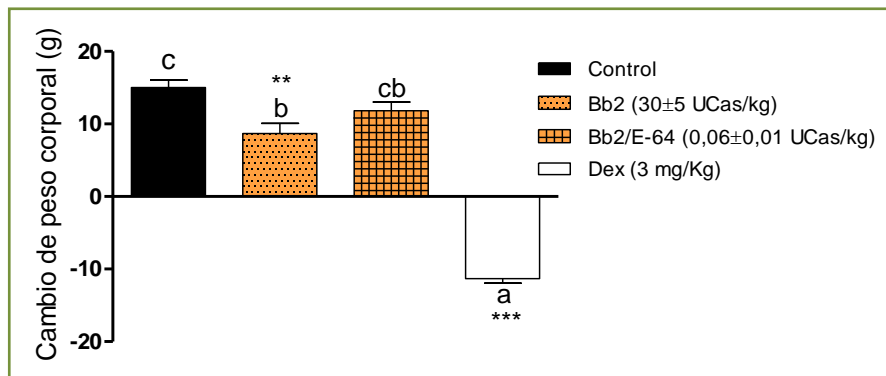


Figura 3.4. Efecto de Bb y Bb inhibida con E-64 (Bb/E-64) y dexametasona (Dex) sobre los pesos corporales de las ratas tratadas durante el ensayo del test de granuloma. Los valores (diferencia de pesos antes y después del tratamiento) son expresados como la media \pm SEM (n=6). Test de Tukey: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con $p < 0,05$, la letra "c" indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a $p < 0,05$.

3.4.2.2.2. Efecto de E-64 sobre la actividad antiinflamatoria de Pm en el test del granuloma

Debido a que la dosis de 30 UCas/kg de Pm parecía mostrar cierta toxicidad (además del ensayo cuyos resultados se exponen en Tabla 3.15, en otro ensayo también murió 1/3 de los animales), se decidió bajar la dosis a 1/3 (equivalente a 10 UCas/kg). Al igual que para Bh y bromelina se ensayó el efecto que tiene la inhibición de las cisteínendopeptidasas presentes en Pm sobre su efecto antiinflamatorio en el test del granuloma. En la Tabla 3.17 se muestran los resultados obtenidos para 90 mg/kg de Pm4, 90 mg/kg de Pm4 inhibido con E-64 (Pm4/E-64) y dexametasona (3 mg/kg).

	Granuloma		Timo		Bazo	
	Peso (g)	Inhibición (%)	Peso (g)	Reducción (%)	Peso (g)	Reducción (%)
Control	0,50±0,03		0,36±0,02		0,68±0,03	
Pm4 (90 mg/kg 11±1 UCas/kg)	0,37±0,02	26_a**	0,26±0,02	28_b*	0,8±0,1	-23_c
Pm4/E-64 (90 mg/kg 0,2±0,1 UCas/kg)	0,417±0,009	17_{ac}	0,31±0,03	14_{cb}	0,62±0,07	9_c
Dexametasona (3 mg/kg)	0,230±0,005	54_b***	0,05±0,004	86_a***	0,34±0,01	50_b***

Tabla 3.17. Efecto de Pm4 con y sin actividad proteolítica (Pm4/E-64) y dexametasona sobre el granuloma inducido por pellet de algodón y sobre los pesos de timos y bazos. Los pesos son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: * p< 0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001, las medias con al menos una letra subíndice común no son significativamente diferentes con p< 0,05, el subíndice “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

Las dosis ensayadas de Pm en esta oportunidad no provocaron la muerte de los animales tratados. Si bien los porcentajes de inhibición de granuloma de Pm y de Pm/E-64 no se diferenciaron significativamente entre sí, el porcentaje de Pm fue estadísticamente significativo, pero no así el de Pm/E-64, lo cual estaría indicando que las cisteínendopeptidasas de Pm tendrían un rol antiinflamatorio en este modelo. Pm/E-64 no mostró actividad fibrinolítica en el ensayo de la placa de fibrina⁶.

De igual modo que para bromelina, al inhibir las proteasas de Pm con E-64 no sólo se pierde el efecto antiinflamatorio sino también el efecto reductor sobre el peso de los timos. Si bien los porcentajes de reducción del peso de los timos de Pm y de Pm/E-64 no se diferencian significativamente, el porcentaje de reducción respecto al control de Pm es significativo mientras que el de Pm/E-64 no.

Por otro lado, Pm y Pm/E-64 no redujeron significativamente los pesos de los bazos, al igual que todos los preparados proteolíticos ensayados previamente.

En la Figura 3.5 se observa que Pm y Pm/E-64 no afectaron significativamente la ganancia de masa corporal de los animales tratados respecto a los del lote control.

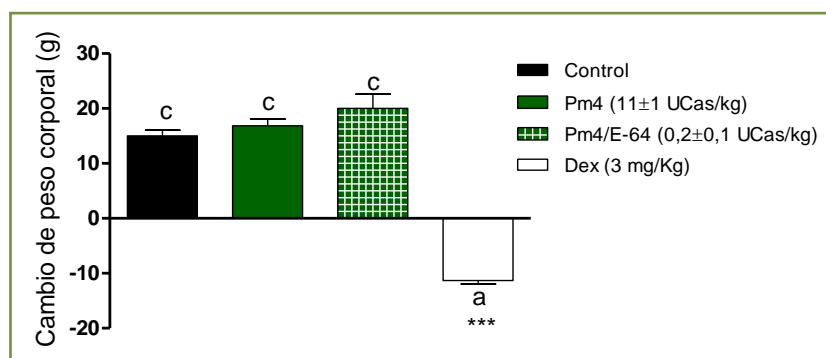


Figura 3.5. Efecto de Pm4, Pm4 inhibida con E-64 (Pm/E-64) y dexametasona (Dex) sobre los pesos corporales de las ratas tratadas durante el ensayo del test de granuloma. Los valores (diferencia de pesos antes y después del tratamiento) son expresados como la media ± SEM (n=6). Test de Tukey: *** p< 0,001, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con p< 0,05, la letra “c” indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a p< 0,05.

Pm4 mostró efectos similares a los de bromelina con una dosis que contuvo 3 veces menos UCAs que la dosis de bromelina usada como referencia (50-55 mg/kg equivalente a 30-35 UCAs/kg). Para verificar si bromelina alcanza su efecto máximo con una dosis de 10 UCAs/kg se evaluó la acción antiinflamatoria de dosis equivalentes a 11 ± 1 , 31 ± 3 y 94 ± 9 UCAs/kg. Simultáneamente se midieron los porcentajes de reducción de los pesos de los timos y los bazos y se registró la ganancia de peso corporal. Los resultados se muestran en la Figura 3.6, excepto los porcentajes de reducción de los pesos de los bazos y los cambios de peso corporal, ya que no fueron estadísticamente significativos para ninguna de las dosis.

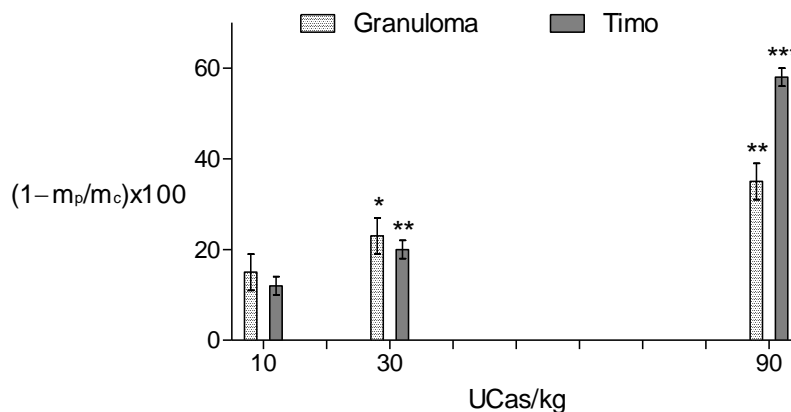


Figura 3.6. Porcentajes de inhibición de granuloma y porcentajes de reducción de timos para 17, 50 y 150 mg/kg de bromelina equivalentes a 11, 31 y 94 UCAs/kg. mp: masa del granuloma o timo del animal tratado con el preparado; mc: masa del granuloma o timo del animal del lote control. Test de Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Media \pm SEM.

Como puede observarse en la figura 3.6, la dosis de bromelina equivalente a 11 ± 1 UCAs/kg mostró un porcentaje de inhibición de 15% que no resultó ser estadísticamente significativo, mientras que la dosis equivalente a 31 ± 3 UCAs/kg mostró un porcentaje de inhibición similar a los de ensayos anteriores (25-30%). Queda de este modo comprobado que las dosis equivalentes en UCAs de Pm4 y bromelina no muestran efectos antiinflamatorios equivalentes.

La UCAs es una medida de la actividad hidrolítica de la proteasa frente a la caseína, un sustrato con múltiples puntos de corte. Igual cantidad de UCAs significa igual intensidad de eficacia proteolítica, pero nada indica acerca de la especificidad de la enzima activa. Probablemente, la dosis de Pm con igual UCAs que la de bromelina tiene más especificidad hacia los blancos involucrados en el mecanismo de inflamación que subyacen en el modelo del granuloma.

3.4.2.3. Posible relación entre la actividad proteolítica-acción antiinflamatoria-modulación sobre población linfocitaria T

En la Figura 3.6 también se puede observar que el aumento en el porcentaje de inhibición del granuloma se acompaña de un aumento en el porcentaje de reducción del peso de los timos.

Para todos los preparados en que se detectó efecto antiinflamatorio significativo también se acompañó de un efecto significativo sobre el peso de los timos y para Pm y bromelina ambos dependieron de la actividad proteolítica. A modo de resumen, en la Figura 3.7 se muestran graficados los pesos de granulomas en función de los pesos de los timos de los animales tratados con los preparados así como con dexametasona (3 mg/kg) a lo largo del presente trabajo.

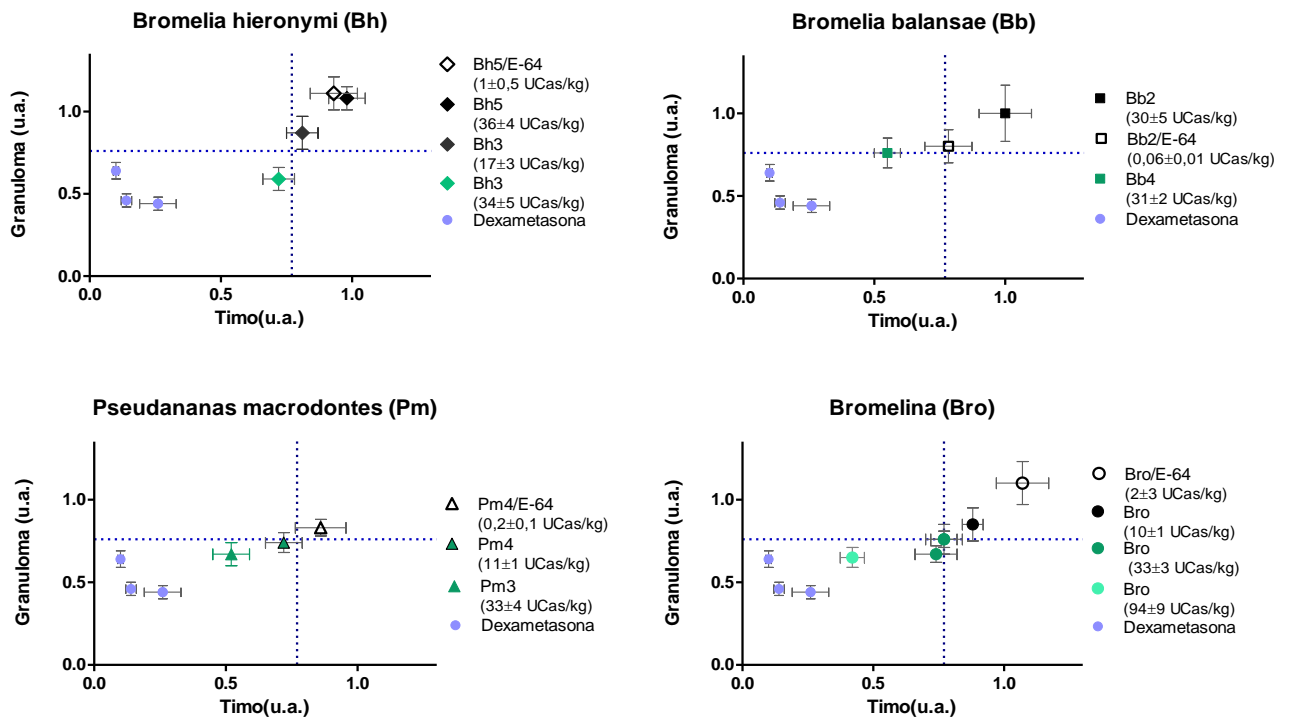


Figura 3.7. Relación peso del granuloma - peso del timo para todos los preparados ensayados. Los valores fueron calculados dividiendo el peso promedio del granuloma o timo del lote tratado por el peso promedio del granuloma o timo, respectivamente, del lote control y expresados como la media \pm SEM. Unidades arbitrarias (u.a.). Las líneas de puntos representan el límite por debajo del cual los valores se diferencian estadísticamente de los controles (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Puede observarse más claramente que sólo los preparados que redujeron significativamente el peso de los granulomas (valores por debajo de la línea de puntos horizontal) disminuyeron significativamente el peso de los timos (valores a la izquierda de la línea de puntos vertical).

A partir de dichas observaciones se podría considerar que parte del mecanismo de acción antiinflamatorio involucraría la acción moduladora sobre la población de linfocitos T, siendo dependiente de la actividad proteolítica para Pm y bromelina.

Además de los efectos directos de bromelina sobre los linfocitos T ya mencionados, tales como la inhibición en la transducción de señales (Mynott *et al.*, 1999) y la regulación en la activación mediado por la remoción de moléculas de la superficie celular (Hale *et al.*, 2002), en varios modelos animales la acción reguladora sobre la población linfocitaria T ha sido asociado al efecto antiinflamatorio de la bromelina. En un modelo murino de asma alérgica inducida por ovoalbúmina, la bromelina administrada intraperitonealmente pudo atenuar el desarrollo de la enfermedad disminuyendo significativamente las células T CD4⁺ activadas, en particular CD4⁺CD25⁺, las células T CD8⁺ y la relación CD4⁺/CD8⁺ en el BAL (Secor *et al.*, 2005). Luego se demostró *in vitro* que bromelina cliva proteolíticamente CD25 desde la superficie de los linfocitos T activos (Secor *et al.*, 2009). Por su parte Targoni *et al.* (1999) reportan que una mezcla de enzimas que contiene bromelina inhibe la encefalomiелitis alérgica experimental murina, un modelo de enfermedad autoinmune mediada por células T. Este efecto se atribuyó a la escisión proteolítica de las moléculas accesorias CD4, CD44, y CD80 que median las interacciones de células T y células presentadoras de antígenos. En una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo*, Engwerda *et al.* (2001) concluyen que la bromelina puede simultáneamente mejorar e inhibir las respuestas mediadas por linfocitos T a través de una acción estimulante sobre las células accesorias y una acción inhibitoria directa sobre las células T.

Es sabido que en el timo los progenitores linfoides tímicos maduran y se diferencian en linfocitos T inmunocompetentes a través de un proceso complejo mediado por quimocinas, interleucinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y, fundamentalmente, por la interacción entre las células del estroma intratímico (células epiteliales, células dendríticas interdigitadas y macrófagos) y los linfocitos (Fainboim & Geffner, 2008). Durante su paso por el timo, el precursor pasa por distintos estadios de diferenciación que se reflejan por la expresión de distintas moléculas de superficie, entre ellas CD25 y CD44, las cuales han mostrado ser sensibles a la acción de la bromelina como ya se ha mencionado. Por otro lado, los timocitos proliferan activamente durante la diferenciación, sin embargo, mediante el proceso de selección tímica sólo aproximadamente un 2% de los timocitos originados en el timo murino son rescatados de la apoptosis y pueden emigrar a la periferia como linfocitos T maduros (Kanwar *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta: 1) que la bromelina es capaz de afectar la población linfocitaria T y que esto sería mediado por su acción proteolítica sobre las moléculas de superficie celular, 2) que se ha postulado para la bromelina la capacidad de modular la relación entre células accesorias y linfocitos T, 3) que el proceso de maduración de los timocitos es

mediado por diferentes moléculas de superficie celular en su interacción con el estroma tímico, 4) que una intensa proliferación linfocitaria acompaña el proceso de diferenciación y 5) la asociación entre el efecto antiinflamatorio y efecto reductor del peso del timo medidos para los preparados, en especial la posible dependencia entre dichos efectos y la actividad proteolítica de Pm y bromelina, se podría interpretar que los preparados alterarían los complejos mecanismos de interacción celular entre las células del estroma tímico y los timocitos afectando la proliferación de los linfocitos T y dando lugar a una población linfocitaria T periférica deficiente cuali y/o cuantitativamente para intervenir en la respuesta inflamatoria.

Sin embargo, esta hipótesis es débil dada las escasas evidencias sobre las que se sustenta. Por empezar, un cambio en el peso del timo no indica cuáles son los tejidos afectados, por lo que una evaluación histológica permitiría determinar si la disminución del peso se debe a la reducción en la población de células linfoideas, además de identificar alteraciones en la arquitectura del órgano. Por otro lado, no es claro el rol que tendrían los linfocitos T en la inflamación que se desarrolla en el modelo del granuloma inducido por el pellet de algodón. Si bien el desarrollo de la inflamación granulomatosa es en general un proceso en el que los linfocitos T tendrían un rol predominante, los granulomas generados por cuerpo extraño, como es el caso del pellet de algodón, están compuestos casi exclusivamente por macrófagos, al menos durante las fases de iniciación y acumulación (Co *et al.*, 2004), siendo muy escasas las células linfocíticas (Ohtani, 2013).

Dado el perfil de actividad de múltiples blancos que caracteriza a la bromelina (Müller *et al.*, 2012; Chobotova *et al.*, 2010) y probablemente a los preparados proteolíticos ensayados en el presente trabajo, es muy posible que los efectos antiinflamatorio y sobre el peso de los timos sean independientes entre sí, aunque ambos dependientes de la actividad proteolítica tanto en el caso de Pm como de bromelina.

Dado que los mecanismos de acción que subyacen a los efectos medidos no han sido objeto de estudio del presente trabajo doctoral, futuras investigaciones permitirían profundizar el conocimiento del rol que cumplen las proteasas de bromelina y especialmente de Pm, que hasta entonces no habían sido estudiadas farmacológicamente.

3.5 Conclusiones

- Bh, Bb, Pm y bromelina mostraron efecto antiinflamatorio frente a la inflamación aguda (edema de pata de rata inducido por carragenina).
- Dosis de Bh, Pm y bromelina equivalentes en actividad proteolítica mostraron porcentajes de inhibición de edema similares entre sí y con el de indometacina (10 mg/kg), actuando predominantemente sobre la fase tardía (3-7h) propuesta para el modelo edema de pata inducido por carragenina.
- Bb actuó sólo sobre la fase tardía propuesta para el modelo edema de pata de rata inducido por carragenina, mostrando porcentajes de inhibición de edema inferiores a los de dosis de Bh, Pm y bromelina con equivalente actividad proteolítica.
- Proteasas cisteínicas de Bb, Pm y principalmente de Bh y bromelina serían las causales del efecto antiinflamatorio sobre la inflamación aguda (edema de pata de rata inducido por carragenina) y actuarían sobre la fase tardía del modelo (3-7h).
- En algunos de los ensayos de edema de pata de rata, Bb mostró signos de toxicidad.
- Bh, Pm y bromelina mostraron efecto antiinflamatorio frente al modelo de inflamación aguda edema de pata de rata inducido por serotonina.
- A las dosis ensayadas, Bh, Pm y bromelina no inhibieron el edema de pata de rata inducido por histamina.
- Una dosis de Pm con 3 veces menos de actividad proteolítica que una dosis de bromelina mostraron efectos antiinflamatorios significativamente similares sobre el modelo de inflamación crónica test del granuloma inducido por algodón.
- Los efectos antiinflamatorios de Pm y bromelina en el test del granuloma inducido por algodón dependerían de la actividad proteolítica de sus proteasas cisteínicas.
- Los efectos antiinflamatorios de dosis equivalentes a 30 UCas/kg de Bh y Bb no fueron reproducibles en el modelo de inflamación crónica.
- Los efectos antiinflamatorios medidos para los preparados proteolíticos en el modelo del test del granuloma inducido por algodón fueron acompañados de un significativo y leve efecto reductor del peso del timo de los animales tratados.
- Los efectos reductores del peso del timo fueron dependientes de la actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas de Pm y de bromelina.
- Los efectos antiinflamatorios de los preparados proteolíticos fueron significativamente menores al de dexametasona (3 mg/kg).
- A diferencia de la dexametasona, ninguno de los preparados redujo significativamente el peso del bazo como tampoco produjeron pérdida de masa corporal, mientras que los porcentajes de reducción del peso del timo fueron significativamente menores al de dexametasona.

3.6. Referencias

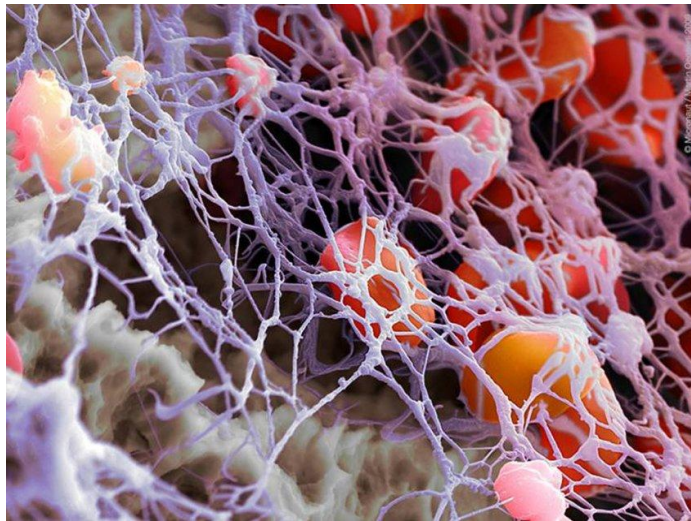
- Bailey, P.J., A. Sturm & B. Lopez-Ramos (1982) A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexamethasone and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 1213-1218.
- Ben Rhouma, K. & M. Sakly (1994) Involution of rat thymus: characterization of cytoplasmic glucocorticoid receptors, evidence of glucocorticoid resistant dexamethasone receptor-positive cells. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **102**: 97-102.
- Benoist, C. & D. Mathis (2002) Mast cells in autoimmune disease. *Nature* **420**: 875-878.
- Bhui, K., S. Tyagi, A.K. Srivastava, M. Singh, P. Roy, R. Singh, *et al.* (2012) Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G(2)/M arrest to apoptosis. *Mol. Carcinog.* **51**: 231-243.
- Boeris, M.A., M.L. Skliar, M.A. Bruno, L.M.I. López & N.O. Caffini (2004) Actividad Antiinflamatoria de Extractos de *Bromelia hieronymi* Mez. VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Buenos Aires, Argentina.
- Brash, A.R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **274**: 23679-23682.
- Braun, J.M., B. Schneider & H.J. Beuth (2005) Therapeutic use, efficiency and safety of the proteolytic pineapple enzyme bromelain-pos® in children with acute sinusitis in Germany. *In Vivo* **19**: 417-421.
- Brien, S., Lewith, A. Walker, S.M. Hicks & D. Middleton (2004) Bromelain as a treatment for osteoarthritis: a review of clinical studies. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **1**: 251-257.
- Brien, S., G. Lewith, A.F. Walker, R. Middleton, P. Prescott & R. Bundy (2006) Bromelain as an adjunctive treatment for moderate-to-severe osteoarthritis of the knee: a randomized placebo-controlled pilot study. *QJM* **99**: 841-850.
- Brunton, L.L. J.S. Lazo & K.L. Parker (2006) Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11^a edición Mc.Graw-Hill.
- Chobotova, K., A.B. Vernallis & F.A.A. Majid (2010) Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters* **290**: 148-156.
- Co, D.O., L.H. Hogan, I.-K. Shin & M. Sandor (2004) T-cell contributions to the different phases of granuloma formation. *Immunol. Lett.* **92**: 135-142.
- Cohen, A. & J. Goldman (1964) Bromelain therapy in rheumatoid arthritis. *Penn. Med. J.* **67**: 27-30.
- Cohen, H., M. Graff & W. Kleinberg (1955) Inhibition of dextran edema by proteolytic enzymes. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **88**: 517-519.
- Di Rosa, M., P.J. Giroud & D.A. Willoughby (1971) Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* **101**: 15-29.
- Engwerda, C.R., D. Andrew, A. Ladhams & T.L. Mynott (2001) Bromelain modulates T cell and B cell immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Cell. Immunol.* **210**: 66-75.
- Fainboim, L. & J. Geffner (2008) *Introducción a la Inmunología Humana*. 5^a Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina
- Fitzhugh, D.J., S. Shan, M.W. Dewhirst & L.P. Hale (2008) Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clin. Immunol.* **128**: 66-74.
- García Barreno, P. (2008) Inflamación. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* **102**: 91-159.

- Gaspani, L, E. Limiroli, P. Ferrario & M. Bianchi (2002) In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* **65**: 83-86.
- Hale, L.P. & B.F. Haynes (1992) Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/ LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. *J. Immunol.* **149**: 3809-3816.
- Hale, L.P., P.K. Greer & G.D. Sempowski (2002) Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. *Clin. Immunol.* **104**: 183-190.
- Hale, L.P., P.K. Greer, C.T. Trinh & M.R. Gottfried (2005) Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10- deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clin. Immunol.* **116**: 135-142.
- Hori, Y., D.E. Hu, K. Yasui, R.L. Smither, G. Austin Gresham & T.-P.D. Fan (1996) Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants. *Br. J Pharmacol.* **118**: 1584-1591.
- Innerfield, I (1957) The antiinflammatory effect of parenterally administered proteases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **68**: 167-177.
- Jespersen, J. & T. Astrup (1983) A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. Optimal conditions, reproducibility and precision. *Haemostasis* **13**: 301-315.
- Kalra, N., K. Bhui, P. Roy, S. Srivastava, J. George, S. Prasad, *et al.* (2008) Regulation of p53, nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**: 30-7.
- Kanwar, N., A. Fayyazi, B. Backofen, M. Nitsche, R. Dressel & G.F. von Mollard (2008) Thymic alterations in mice deficient for the SNARE protein VAMP8/endobrevin. *Cell Tissue Res.* **334**: 227-242.
- Kumakura, S., M. Yamashita & S. Tsurufuji (1988) Effect of bromelain on kaolininduced inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* **150**: 295-301.
- Kumar, V.; AK. Abbas, N. Fausto & J. Aster (2009) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th Edition, Ch. 2 Acute and chronic inflammation». Saunders (Elsevier).
- Livio, M, M.P. Bertoni, G. De Gaetano & M.B. Donati (1978) Effects of bromelain on fibrinogen level, pothrombin complex and platelet aggregation in the rat -a preliminary report. *Drugs Exp. Clin. Res.* **4**: 49-53.
- Martin, G.J., R. Brendel & J.M. Beiler (1954) Inhibition of egg white edema by proteolytic enzymes. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **88**: 636-638.
- Maurer, H.R., K. Eckert, E. Grabowska & K. Eschmann (2000) Use of bromelain proteases for inhibiting blood coagulation. Patent WO PCT/EP 98/04406.
- Maurer, H.R. (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Review. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1234-1245.
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428-435.
- Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**: 771-776.
- Meier, R, W. Schuler & P. Desaulles (1950) Zur frage des mechanismus der hemmung des bindegewebswachstums durch cortisone. *Experientia* **6**: 469-471.
- Morris, C.J. (2003) Carragenan-induced paw edema in rat and mouse. *Meth.Mol. Biol.* **225**: 115-121

- Mukhopadhyay, S., C.F. Farver, L.T. Vaszar, O.J. Dempsey, H.H. Popper, H. Mani, *et al.* (2012). Causes of pulmonary granulomas: a retrospective study of 500 cases from seven countries. *J Clin Pathol* **65**: 51–57.
- Müller, S., R. März, M. Schmolz, B. Drewelow, K. Eschmann & P. Meiser (2012) Placebo-controlled randomized clinical trial on the immunomodulating activities of low- and high-dose bromelain after oral administration - new evidence on the antiinflammatory mode of action of bromelain. *Phytother Res.* **27**: 199-204
- Mynott, T.L., A. Ladhams, P. Scarmato & C.R. Engwerda (1999) Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in Tcells. *J. Immunol.* **163**: 2568-2575.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev. Immunol.* **6**: 173-182.
- Netti, C., G.L. Bandi & A. Pecile (1972) Antiinflammatory action of proteolytic enzymes administered orally compared with antiphlogistic compounds. *Farmaco. Ed. Pr.* **27**: 453-466.
- Ohtani, H. (2013) Granuloma cells in chronic inflammation express CD205 (DEC205) antigen and harbor proliferating T lymphocytes: Similarity to antigen-presenting cells. *Pathol. Int.* **63**: 85-93
- Pirotta, F. & C. de Giuli-Morghen (1978) Bromelain: anti-inflammatory and serum fibrinolytic activity after oral administration in the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.* **4**: 1-20.
- Roitt, I. (2003) *Inmunología: Fundamentos*, 10ª Edición, Ed. Médica Panamericana.
- Rotelli, A. (2004) *Estudios sobre los efectos antiinflamatorios en procesos crónicos y agudos de principios naturales aislados de plantas*. Tesis doctoral. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis.
- Salvemini, D., T.P. Misko, J.L. Masferrer, K. Seibert, M.G. Currie, & P. Needleman (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7240-7244.
- Salvemini, D., Z.Q. Wang, P.S. Wyatt, D.M. Bourdon, M.H. Marino, P.T. Manning, *et al.* (1996) Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 829-838.
- Secor Jr., ER, W.F. Carson IV, M.M. Cloutier, L.A. Guernsey, C.M. Schramm, C.A. Wu, *et al.* (2005) Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cell Immunol.* **237**: 68-75.
- Secor Jr., E.R., A. Singh, L.A. Guernsey, J.T. McNamara, L. Zhan, N. Maulik, *et al.* (2009) Bromelain treatment reduces CD25 expression on activated CD4+ T cells *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.* **9**: 340-346.
- Secor Jr, E.R., S.J. Shah, L.A. Guernsey, C.M. Schramm & R.S. Thrall (2012) Bromelain limits airway inflammation in an ovalbumin-induced murine model of established asthma. *Altern Ther. Health Med.* **18**: 9-17.
- Seibert, K., Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, W Perkins, *et al.* (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12013-12017.
- Smyth, R.D., R. Brennan & G.J. Martin (1962) Systemic biochemical changes following the oral administration of a proteolytic enzyme, bromelain. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **136**: 230-236.

- Targoni, O.S., M. Tary-Lehmann & P.V. Lehmann (1999) Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. *J. Autoimmun.* **12**: 191-198.
- Uhlig, G. & I. Seifert (1981) Die Wirkung proteolytischer Enzyme auf das posttraumatische Syndrom. *Fortschritte der Medizin* **15**: 554-556.
- Vellini, M., D. Desideri, A. Milanese, C. Omini, L. Daffonchio, A. Hernandez *et al.* (1986) Possible involvement of eicosanoids in the pharmacological action of bromelain. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* **36**: 110-112.
- Vinegar, R., W. Schreiber and R. Hugo (1969) Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **166**: 96-103.
- Vogel, H.G. (2002) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Wen, S., T.H.W. Huang, G.Q. Li, J. Yamahara, B.D. Roufogalis & Y. Li (2006) Bromelain improves decrease in defecation in postoperative rats: modulation of colonic gene expression of inducible nitric oxide synthase. *Life Sci.* **78**: 995-1002.
- Willoughby, D.A. In vivo models of inflammation. Introduction Part 2. (2003) *Meth. Mol. Biol.* **225**: 109-113.
- Woolf, N., A. Wotherspoon & M. Young (2002) *Essentials of Pathology*. W.B. Saunders, Edinburgh, New York.

4. EFECTO ANTICOAGULANTE, FIBRINOGENOLÍTICO Y FIBRINOLÍTICO



Sangre humana 120 segundos después del inicio del proceso de coagulación (*)

(*) Martin Oeggerli, disponible en <http://www.micronaut.ch/shop/blood-clotting/>

4.1. Hemostasia

En los vertebrados la sangre fluye, con una presión relativamente elevada, por conductos que conforman un compartimento cerrado. Sin embargo, frente a una injuria vascular la pérdida de sangre desde dicho compartimento es limitada. El conjunto de mecanismos fisiológicos que mantienen la sangre fluida e impiden su fuga se denomina **hemostasia**. En ella intervienen la **pared de los vasos sanguíneos**, componentes celulares (**plaquetas**) y solubles (**factores plasmáticos de la coagulación**) de la sangre, el flujo sanguíneo y, de manera indirecta, el almohadillado celuloadiposo y conjuntivo que rodeando el aparato vascular lo protege por fuera (Castillo *et al.*, 1994).

Se denomina *hemostasia correctora* a la que actúa evitando la pérdida de sangre cuando una lesión afecta la integridad de la pared vascular y puede dividirse en cuatro fases:

1. Vasoconstricción localizada
2. Formación de un agregado plaquetario sobre el área lesionada
3. Coagulación (formación de fibrina)
4. Fibrinólisis (degradación y remodelación del coágulo de fibrina)

Puesto que parte de los objetivos de esta tesis se refieren al efecto de los preparados proteolíticos sobre las fases 3 y 4, las fases 1 y 2 sólo serán someramente expuestas.

4.1.1. Vasoconstricción

Luego de la lesión vascular se produce una vasoconstricción en el área afectada que conduce al enlentecimiento del flujo sanguíneo. Esto favorece la interacción entre las plaquetas y los factores de la coagulación con el endotelio, iniciando las fases 2 y 3. Inicialmente y durante los primeros segundos la vasoconstricción es debida a una estimulación simpática en la musculatura lisa del vaso y es sostenida probablemente por la serotonina, la adrenalina y el tromboxano A₂ (TXA₂) liberados desde las plaquetas activadas (Castillo *et al.*, 1994).

4.1.2. Formación del trombo plaquetario

En condiciones fisiológicas el trombo plaquetario se forma en el área lesionada y consta de varias etapas que involucran la adhesión, la activación y la agregación plaquetaria.

Las plaquetas se adhieren a la pared vascular a través del subendotelio que queda expuesto por la lesión. Las proteínas que median la unión son fundamentalmente el colágeno subendotelial, el factor de von Willebrand (FvW) y la fibronectina, mientras que los receptores plaquetarios involucrados son glicoproteínas de membrana: la GPVI, las integrinas GPIa/IIa

($\alpha_2\beta_1$) y GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) y el complejo Ib-V-IX. La consecuencia inmediata de la adhesión es la activación plaquetaria, que se caracteriza por: a) cambio de forma discoide a esférica con emisión de pseudópodos y b) contracción dependiente de Ca^{+2} intracitoplasmático, la cual determina el proceso de agregación plaquetaria. Durante el proceso de activación se desencadenan reacciones metabólicas, así como se generan y/o liberan agonistas que amplifican el proceso tales como ADP y TXA_2 . Algunos agonistas de la activación plaquetaria son el colágeno, la adrenalina, la noradrenalina, la serotonina y el PAF (Castillo *et al.*, 1994).

El ADP es liberado desde los gránulos densos, junto a la serotonina, al medio extracelular e induce la activación de plaquetas por unión a receptores de membrana. El TXA_2 , sintetizado a partir del ácido araquidónico (AA) por las vías de la ciclooxigenasa (COX) y la tromboxano sintetasa, es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor. El AA es liberado desde la membrana plaquetaria por la fosfolipasa A_2 activada por la unión de agonistas a sus receptores. Otros agonistas desencadenan el *metabolismo del fosfatidilinositol*, conduciendo a la activación de proteincinasa C (PKC), que junto a otras cinasas intervienen en varios procesos de la activación plaquetaria (Martinuzzo *et al.*, 2003).

La agregación plaquetaria consiste en la unión de plaquetas entre sí, iniciada por la unión de plaquetas circulantes a las plaquetas ya adheridas al subendotelio. Esta unión es mediada por el FvW y el fibrinógeno; el receptor plaquetario es la integrina GPIIb/IIIa, que es expresada en la membrana luego de cambios conformacionales dependientes de Ca^{+2} y fosforilaciones mediadas por cinasas (Martinuzzo *et al.*, 2003). La *trombina* induce la activación y la agregación plaquetaria provocando la liberación de ADP y la síntesis de TXA_2 (Castillo *et al.*, 1994). Una consecuencia de la activación plaquetaria es la exposición de fosfolípidos aniónicos en la membrana, cruciales para el proceso de coagulación (Martinuzzo *et al.*, 2003).

4.1.3. Coagulación

La coagulación plasmática consiste en la transformación, catalizada por la **trombina**, del **fibrinógeno** soluble en una red de fibras (**fibrina**), proceso que intensifica y asegura la hemostasia temporal iniciada con la vasoconstricción y desarrollada por las plaquetas. Se produce como resultado de una **serie de reacciones en cascada** en la que sucesivamente una proenzima inactiva (zimógeno) es convertida en enzima activa, la cual a su vez activa otra proenzima. Los componentes de esta cascada son denominados **factores de coagulación** (Tabla 4.1) y se clasifican en tres grupos: dependientes de la vitamina K, sensibles a trombina y de contacto. Los factores dependientes de la vitamina K se caracterizan por poseer un aminoácido particular, el ácido γ -carboxiglutámico, obtenido por la carboxilación del ácido glutámico mediada por la vitamina K (Castillo *et al.*, 1994).

Factor	Nombre, sinónimos	Peso molecular (kDa)	Vida media (h)	Grupo
FI	Fibrinógeno	340	100-150	T
FII	Protrombina	72	50-80	K
FIII	Factor tisular (FT), tromboplastina tisular	44		
FIV	Calcio			
FV	Proacelerina	290-400	24	T
FVII	Proconvertina	63	6	K
FVIII	Factor antihemolítico A	240	12	T
FIX	Factor antihemolítico B	55,4	24	K
FX	Factor Stuart	55	25-60	K
FXI	Antecedente tromboplastínico del plasma (PTA)	160	40-80	C
FXII	Factor Hageman	90	50-70	C
FXIII	Factor estabilizante de la fibrina	320	150	T
Precalicroína		88	35	C
cininógeno de alto peso molecular (HMWK)		120	150	C
FvW	Factor de von Willebrand	500-20000	24	

Tabla 4.1. Factores de coagulación. Pesos moleculares, vida media en plasma y grupo al que pertenecen: K, vitamina K-dependientes; T, trombina sensibles; C, de contacto.

La cascada de coagulación fue clásicamente descrita como dos vías de activación de zimógenos que confluían activando el FX y una vía común en la que el FX convertía la protrombina en trombina y ésta el fibrinógeno en fibrina (Figura 4.1). En este modelo, la vía intrínseca es desencadenada por contacto del FXII con una superficie cargada negativamente (por exposición de un epitelio distinto al vascular) e involucra además a los factores FXI, FIX, FVIII, precalicroína y HMWK. La vía extrínseca, desencadenada por la exposición del FT (por una lesión tisular) a la circulación, involucra a FVII (Castillo *et al.*, 1994). Las plaquetas activadas intervienen aportando su superficie fosfolipídica (factor plaquetario III), que actúa como catalizador en la etapa final de la vía intrínseca y en la vía común.

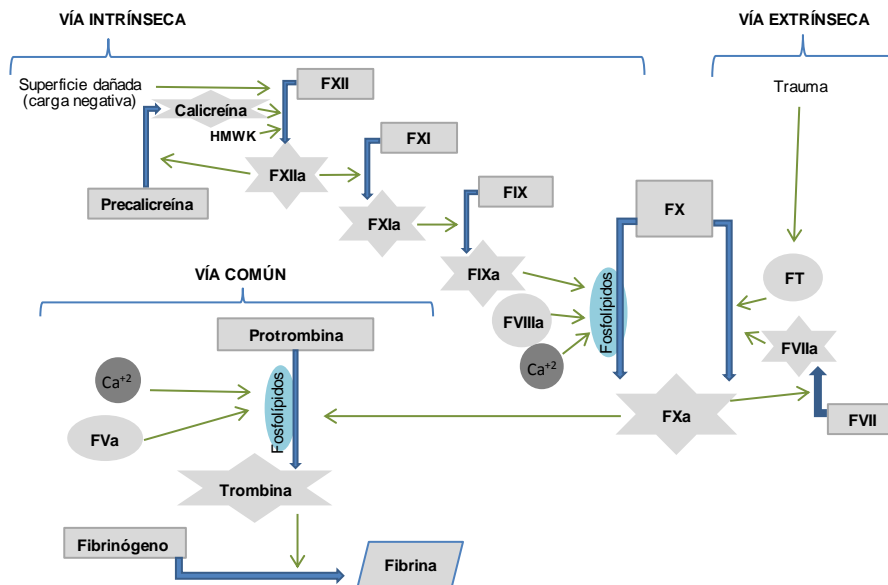


Figura 4.1. Modelo clásico de la cascada de coagulación. La coagulación se puede iniciar con la liberación del FT (Vía extrínseca) y/o con el contacto del FXII con una superficie cargada negativamente (Vía intrínseca). Ambas vías confluyen activando el FX a FXa, el que desencadena la vía común que finaliza con la formación de fibrina. Los factores representados como círculos actúan como cofactores para los factores que actúan como enzimas (estrellas) en las reacciones señaladas. La superficie fosfolípida es representada como un óvalo celeste.

Más recientemente se ha propuesto otro modelo de coagulación, en el cual: a) el FT es el principal desencadenante de la coagulación, b) la amplificación generada por la trombina es considerada esencial para el desarrollo del coágulo estable y c) existe interdependencia entre los factores plasmáticos y los elementos celulares (Figura 4.2). En este modelo la cascada de coagulación es vista como un proceso gradual y superpuesto de activaciones proteolíticas en tres fases: inicial, de amplificación y de propagación, en cuyas dos últimas fases la superficie celular es fundamental para localizar la formación del coágulo sobre la superficie dañada. Las dos vías clásicas se unen a través del complejo FT:FVIIa (vía extrínseca), el cual es capaz de activar el factor de la vía intrínseca FIX (Adams & Bird, 2009).

4.1.3.1. Fase inicial

La exposición del FT a la sangre, por daño o activación del endotelio, actúa como desencadenante de la coagulación, activando el FVII circulante a FVIIa junto con el cual forma el complejo tenasa del factor extrínseco (FT:FVIIa) sobre la superficie fosfolípida de la membrana celular. Este complejo activa el FX a FXa y el FIX a FIXa (Adams & Bird, 2009). Si el FXa permanece en la superficie puede unirse al FVa y activar el FII, generando cantidades picomolares de trombina (FIIa) (Martinuzzo *et al.*, 2003).

La duración de esta fase depende de la concentración del complejo FT:FVIIa y del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el cual forma un complejo FT:FVIIa:FXa:TFPI capaz

de limitar la formación de FXa. La expresión del FT también puede ser inducido en plaquetas y monocitos, así como en micropartículas circulantes (MP) derivadas de las células en las que se expresa (Adams & Bird, 2009).

Resulta importante señalar que la fase de contacto de la vía intrínseca, en la que intervienen el FXII, la precalicreína y el HMWK, no es requerida para iniciar la cascada, si bien es fundamental para los estudios *in vitro* de la coagulación (Furie & Furie, 2008).

4.1.3.2. Fase de amplificación

Las pequeñas cantidades generadas de trombina pueden activar al FV y al FVIII, los cuales actúan como cofactores de los complejos protrombinasa (FVa:FXa) y tenasa intrínseca (FVIIIa:FIXa) formados, junto a Ca^{+2} , sobre superficies fosfolípídicas pertenecientes principalmente a las plaquetas. La amplificación de la coagulación está dada por el incremento en la producción del FXa por parte del complejo tenasa intrínseca (entre 50 y 100 veces más que la generada por el complejo FT:FVIIa) y de trombina (Adams & Bird, 2009). El FVIII se asocia al FvW, el que mediante su interacción con la glicoproteína Ib-V-IX se une a la plaqueta, haciendo más eficiente la activación del FVIII por la trombina (Martinuzzo *et al.*, 2003).

Otro efecto amplificador es la activación del FXI a FXIa por parte de la trombina en presencia de Ca^{+2} y protrombina, lo que permite al FXIa localizarse en la superficie plaquetaria y activar más FIX. La trombina activa las plaquetas mediante la unión al PAR-1 (receptor activado por proteasas), lo que a su vez induce la degranulación de gránulos α , la expresión de FVa sobre la membrana y la activación de GPIIb/IIIa, estimulando la agregación plaquetaria y activando la superficie plaquetaria al inducir la exposición de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilserina) sobre la misma. Las plaquetas activadas por trombina muy probablemente sean las activadas por colágeno durante la adhesión plaquetaria y tienen una gran afinidad para unir en su superficie los complejos protrombinasa y tenasa intrínseca (Adams & Bird, 2009)

4.1.3.3. Fase de propagación

Durante la fase de amplificación se generan plaquetas activadas capaces de unir los complejos catalíticos más eficientes para la producción de trombina, la cual a su vez activa a las plaquetas y a los factores y cofactores que componen esos complejos. La fase de propagación se basa en el reclutamiento de esas plaquetas activadas en el sitio de injuria. El resultado de estas reacciones es la producción “explosiva” de trombina, suficiente como para transformar el fibrinógeno en fibrina y generar un coágulo estable (Adams & Bird, 2009).

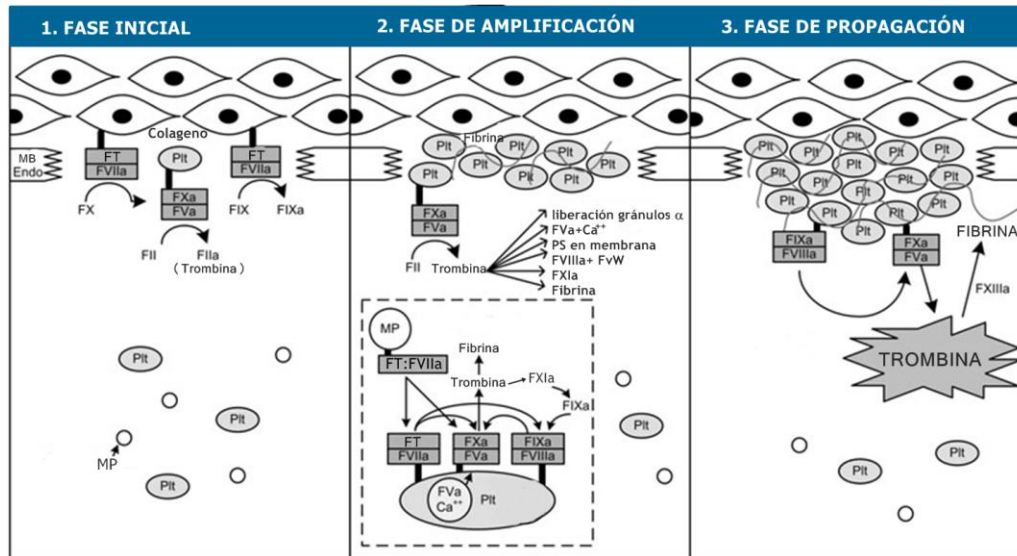


Figura 4.2. Modelo de la coagulación con base celular. 1. La coagulación se inicia sobre la célula portadora del FT originando pequeñas cantidades de trombina; MP: micropartículas circulantes, MB: membrana basal del endotelio; Plt: plaquetas. 2. La pequeña cantidad de trombina generada permite activar cofactores, plaquetas y FXI, formándose sobre las plaquetas los efectivos complejos tenasa intrínseco (FVIIIa:FIXa) y protrombinasa (FVa:FX) que amplifican las reacciones productoras de trombina; PS: fosfatidilserina. 3. Durante la fase de propagación la cantidad de trombina requerida para la formación del coágulo se forma desde la superficie de las plaquetas localizadas en el sitio de injuria. (Modificado de Adams & Bird, 2009)

4.1.3.4. Formación de la fibrina

Puesto que la fibrina se construye a partir de los cambios estructurales que produce la trombina sobre el fibrinógeno, es conveniente describir brevemente la estructura de este último. El fibrinógeno es una glicoproteína fibrosa de gran tamaño (340 kDa) compuesta por un dímero de tres cadenas polipeptídicas: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ y γ , unidas por 29 puentes disulfuro (Figura 4.3). En cuanto a su estructura terciaria se pueden identificar una región nodular central (E) y dos regiones nodulares finales (D).

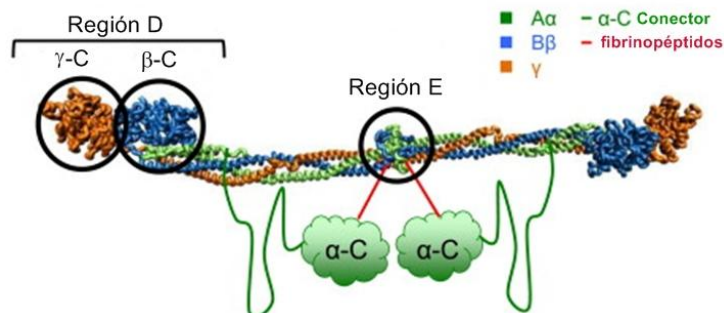


Figura 4.3. Estructura molecular del fibrinógeno humano basado en la estructura cristalográfica obtenida por rayos X (Kollman *et al.*, 2009), las regiones α -C y sus cadenas conectoras no pueden ser resueltas por cristalografía de rayos X, por lo que se muestran esquemáticamente. Los fibrinopéptidos son esquematizados para destacar su interacción con α -C. (Tomado de Guthold & Cho, 2011 y parcialmente modificado)

La región E está formada por los extremos amino terminal, unidos por puentes disulfuro, de las seis cadenas. Las regiones D están formadas por los extremos globulares carboxilo terminales de las cadenas B β (β -C) y γ (γ -C), los que a su vez están formados por tres dominios. Los extremos carboxilo terminales de las cadenas A α (α -C) se extienden desde el extremo de la molécula e interactúan entre sí y con el centro (Weisel, 2005). Los segmentos centrales de las tres cadenas se enroscan formando una triple α -hélice (región *coiled-coil*), que proporciona flexibilidad y estabilidad mecánica a la molécula, uniendo las regiones D a la región E (Lauricella, 2007).

Se han identificado funciones para varias de las regiones del fibrinógeno: la región E posee sitios de unión de diferentes afinidades para la trombina; el extremo carboxilo terminal de una variante de la cadena γ (γ') une trombina y FXIII; la región D aporta sitios DD que contribuyen a la alineación de los monómeros de fibrina y sitios D_A (en γ -C) o D_B (en β -C) donde se insertarán los sitios A y B (región E), respectivamente, de monómeros vecinos (Figura 4.4); finalmente, el sitio γ_{XL} de la cadena γ interviene en el ensamblado de la fibrina y facilita la acción del FXIII (Lauricella, 2007).

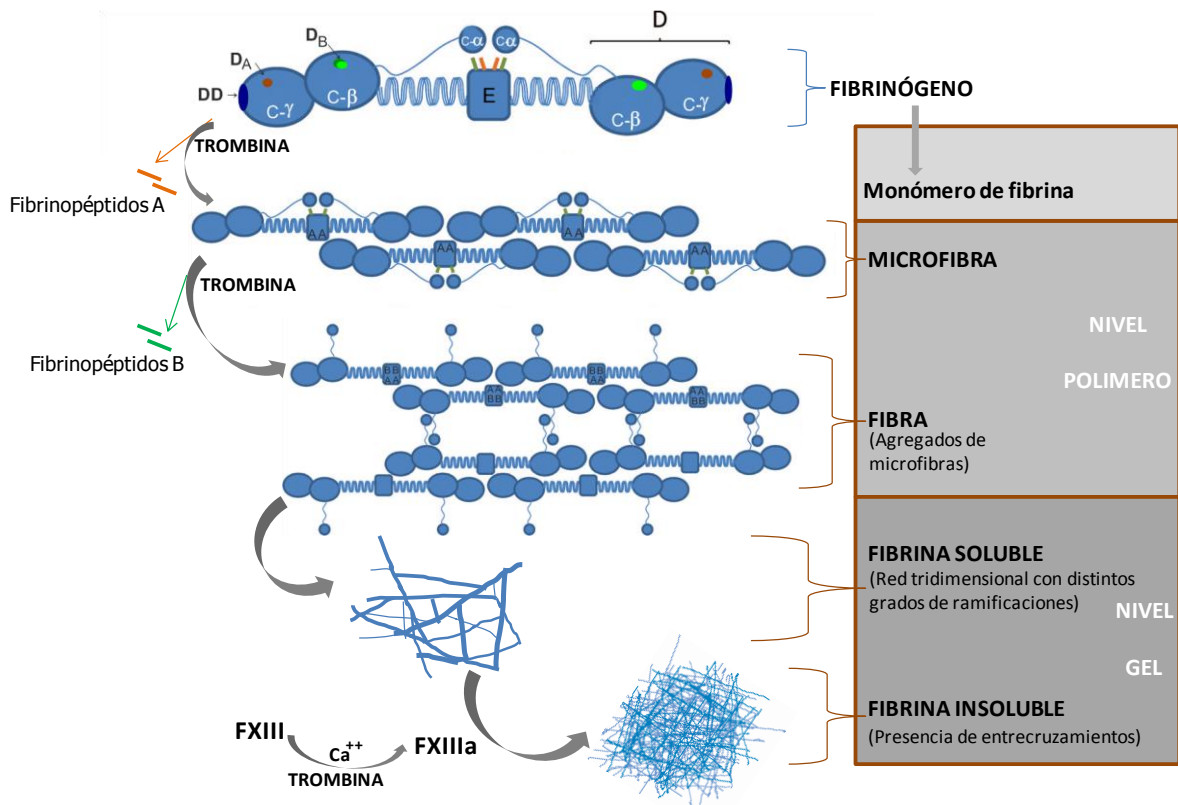


Figura 4.4. Formación de fibrina. Esquemas de la molécula de fibrinógeno y de la formación de los distintos niveles estructurales de la fibrina (Tabla de la derecha) luego de la acción de la trombina y del FXIIIa. (Estructuras de fibrinógeno y fibras parcialmente modificadas de Undas & Ariëns, 2011)

La trombina cliva cuatro enlaces específicos Arg-Gly de los extremos amino terminales de A α y B β , en la región E, desde los cuales se liberan los fibrinopéptidos A y B, respectivamente, y se exponen nuevos sitios (A y B, respectivamente) en las cadenas clivadas del ahora monómero de fibrina.

La polimerización ocurre en varias etapas conduciendo a distintos niveles estructurales. La unión entre monómeros por interacciones de sus sitios A y B (región E) con sitios D_A y D_B (regiones D) de otros monómeros, así como las interacciones entre regiones D (a través de los sitios DD) de monómeros contiguos, que contribuyen a la elongación del polímero, da lugar a la formación de microfibras (o protofibras) estabilizadas por interacciones E-D (Lauricella, 2007). La liberación del fibrinopéptido B produce tal cambio conformacional que los dominios α -C se disocian de la región E y quedan disponibles para las interacciones intermoleculares que favorecen la agregación bilateral de las microfibras, dando lugar a fibras más gruesas, además de contribuir a la estabilidad y a las propiedades mecánicas del coágulo (Weisel, 2007; Zhmurov *et al.*, 2011). A su vez, las fibras se asocian generando ramificaciones que conforman una red tridimensional (fibrina soluble). La red es finalmente estabilizada (fibrina insoluble) por el FXIIIa, una transglutaminasa activada por trombina en presencia de Ca⁺². El FXIIIa forma puentes amida entre un grupo amino de residuos de lisina y un grupo carbonilo de residuos de glutamina dando lugar a entrecruzamientos en la red, que pueden ser entre dos cadenas γ , dos A α o una γ con una A α . La fibrina estabilizada es más resistente a la fibrinólisis (Lauricella, 2007).

4.1.3.5. Regulación de la coagulación

Numerosas proteínas cumplen con la función regulatoria de la coagulación actuando en los distintos niveles. El FT es regulado por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el que es expresado por el endotelio y las plaquetas, así como por otras células, y circula unido a LDL. TFPI también neutraliza la actividad del FXa e inhibe el complejo FT:FVIIa.

La antitrombina, el principal inhibidor de la coagulación, es un inhibidor de serinoproteasas tales como FXa, FXIa, FIXa y calicreína y se sintetiza en el endotelio. Por actuar preferencialmente sobre las enzimas libres contribuye a limitar la coagulación en la región de lesión (Adams & Bird, 2009).

El cofactor II de heparina es un inhibidor de trombina que requiere la presencia de dermatán sulfato o heparina para acelerar su reacción. Los FVa y FVIIIa son inactivados por la proteína C activa (APC) actuando como cofactor la proteína S. La activación de la proteína C es llevada a cabo por la trombina unida a la trombomodulina del endotelio, mientras que la APC es inhibida por α_1 -antitripsina (α_1 -AT) y por α_2 -macroglobulina (α_2 -MG), así como por el inhibidor de proteína C (PCI). La α_1 -AT inhibe también FXIa, calicreína y trombina. La α_2 -MG es un inhibidor

de amplio espectro, ya que inhibe la plasmina, la tripsina, la calicreína y la elastasa, entre otras, además de trombina. El FXa y el FXIa son inhibidos por el inhibidor de proteasas dependiente de proteína Z (ZPI), una proteína K-dependiente, usando como cofactor la proteína Z (Martinuzzo *et al.*, 2003).

El endotelio actúa regulando la hemostasia, manteniendo las características no trombogénicas de la cara luminal en contacto con la sangre, a través de la síntesis de heparán y dermatán sulfato, componentes del sistema de la proteína C, antiagregantes plaquetarios como prostaciclina G₂ (PGI₂) y óxido nítrico (NO), entre otros. Mientras que ante estímulos trombogénicos se sintetizan factores prohemostáticos (FvW, FT, FV).

4.1.4. Fibrinólisis

La deposición de fibrina induce el sistema fibrinolítico, que de manera controlada remueve o remodela el coágulo a través de la fibrinólisis evitando el depósito indeseado de fibrina. El sistema fibrinolítico está compuesto por zimógenos, activadores e inhibidores y a través de diferentes mecanismos activa el plasminógeno (Plg) a plasmina, que actúa proteolíticamente sobre la fibrina. La fibrinólisis está regulada por la concentración de los activadores de Plg, los cuales tienen una lenta difusión a coágulos ya formados, por lo que es importante su presencia durante la formación de la red de fibrina de manera que queden incorporados al coágulo. Los principales activadores del Plg son: el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador de tipo uroquinasa (u-PA), además de algunos activadores exógenos como la estreptoquinasa generada por estreptococos β-hemolíticos. (Martinuzzo *et al.*, 2003).

El t-PA es sintetizado en el endotelio y liberado en respuesta a trombina, histamina, bradicinina, interleucinas, estrés y éstasis venoso (Martinuzzo *et al.*, 2003), entre otros. La baja afinidad del t-PA circulante por el Plg aumenta en presencia de fibrina, que es capaz de fijarlo, al igual que al Plg, sobre su estructura. Así, la fibrina promueve la formación de plasmina sobre su superficie favoreciendo una lisis local y no una generalizada.

El u-PA es secretado por células endoteliales, renales y tumorales. Se sintetiza en forma de simple cadena (scu-PA) conocida como prouroquinasa (activa el Plg sobre la fibrina), que puede ser activada a su forma de doble cadena (tcu-PA) por acción de la plasmina o por los factores de la fase de contacto (precalicreína, HMWK, FXII) siendo capaz de actuar sobre el Plg en fase fluida (Martinuzzo *et al.*, 2003).

La plasmina degrada la fibrina (estabilizada por el FXIIIa) liberando fragmentos de distintos pesos moleculares que en su mayoría incluyen al dímero DD (contiene las regiones D de monómeros contiguos unidos covalentemente). La acción de la plasmina sobre el fibrinógeno

produce fragmentos X, Y, D y E, similares a los que genera al actuar sobre la fibrina no estabilizada, salvo por la ausencia de los fibrinopéptidos A y B (Figura 4.5).

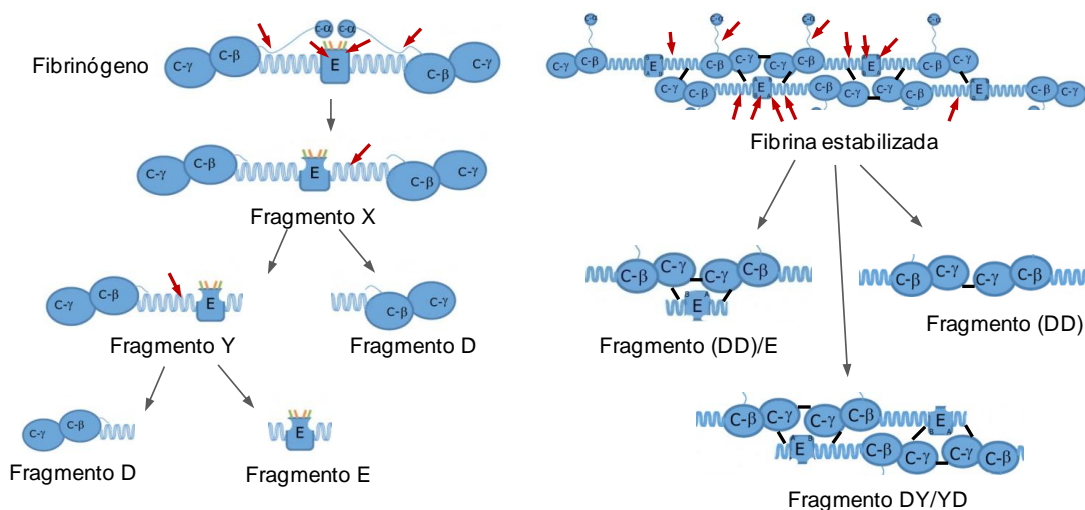


Figura 4.5. Productos de degradación del fibrinógeno y de la fibrina. Las flechas rojas indican puntos de corte de la plasmina, las barras negras representan los entrecruzamientos en la fibrina formados por el FXIIIa. (Estructuras de fibrinógeno y fibrina parcialmente modificadas de Undas & Ariëns, 2011)

La plasmina también es capaz de degradar otras proteínas plasmáticas como el FII, el FV, el FVIII, cininas, componentes del complemento, así como también activar metaloproteasas que intervienen en la degradación de la matriz extracelular. Por esto es importante la regulación de la fibrinólisis, que se da tanto a nivel de la plasmina como de los activadores del Plg (Martinuzzo *et al.*, 2003).

La plasmina circulante es inhibida por unión de la α_2 -antiplasmina (α_2 -AP), que no sólo afecta el sitio activo sino también los sitios de unión a la fibrina. Los inhibidores de los activadores de Plg (PAI) se encuentran en altas concentraciones en sangre y actúan formando complejos covalentes, ya sea con el t-PA como con el u-PA.

Por su parte la trombina inhibe la fibrinólisis mediante la activación del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). El TAFIa remueve residuos Lys de la fibrina, eliminando los sitios de unión al Plg requeridos para la activación por el t-PA (Adams & Bird, 2009).

4.2. Trombosis (Korin, 2003)

La trombosis es la presencia intravascular de material fibrino-plaquetario con variable contenido de hematíes y leucocitos y puede ser una respuesta fisiológica (trombo hemostático),

tal como ya ha sido descrito, o ser la consecuencia de una activación patológica e inapropiada del sistema de coagulación.

El trombo patológico puede ser parcial o totalmente oclusivo, hecho que puede llevar a una isquemia de grado variable y consecuente pérdida de la función vital del órgano, además de la posibilidad de embolización distal y la consecuente embolia pulmonar. Según donde se asienten los trombos se dividen en venosos, arteriales, cardíacos y de microcirculación.

La **trombosis venosa** se caracteriza por la presencia de trombos compuestos principalmente por **hematíes** y **fibrina** (trombos rojos). Los factores desencadenantes más importantes son la disminución de la velocidad del flujo sanguíneo (anestesia, incapacidad motora, aumento de viscosidad sanguínea, etc.) y cambios en los sistemas de coagulación y fibrinólisis (descenso de inhibidores, aumento en la concentración de factores, hipofunción fibrinolítica, etc.). Así, actúan como factores de riesgo los estados post-operatorios, las neoplasias, las plejías, los estados trombofílicos y la edad creciente. Cuando la trombosis se localiza en el sistema venoso profundo suele estar asociada con el riesgo de embolia pulmonar y constituyen los polos clínicos del **tromboembolismo venoso** (TEV).

El TEV es tratado y prevenido con anticoagulación (heparinas no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular o dicumarínicos). Casos de TEV severos requieren de un tratamiento trombolítico.

La **trombosis arterial** se produce en zonas de alta velocidad de flujo sanguíneo y los trombos se componen fundamentalmente de **agregado plaquetario** y **fibrina** y en menor medida de hematíes y leucocitos (trombos blancos). Es consecuencia de alteraciones en la pared vascular (placas ateromatosas) y puede conducir a accidentes cerebrovasculares y síndromes coronarios agudos, entre otras complicaciones.

Los factores que pueden desencadenar la trombosis arterial son: un endotelio disfuncional, alteraciones en el flujo sanguíneo y la activación del sistema de coagulación mediado por la exposición del FT. Paralelamente se produce reclutamiento, activación y agregación plaquetaria, así como la activación del sistema fibrinolítico, el que es regulado por el PAI-1 depositado en la placa, además del TAFI y la α_2 -AP. La trombogenicidad de una placa es una función del contenido de FT, el cual determina la velocidad de producción de trombina. El FT presente en las placas proviene de las micropartículas (MP) derivadas de macrófagos, linfocitos y células musculares lisas activadas por citoquinas, así como de las membranas de neutrófilos y monocitos que invaden la placa por quimiotaxis y adhesión, todo ello favorecido por el endotelio disfuncional. Así, el nivel de inflamación también contribuye al desarrollo de la trombosis arterial. Por otro lado, el colágeno presente en la placa es un desencadenante de la activación plaquetaria. El tratamiento depende de la localización y compromiso del órgano

afectado, para lo cual se usan heparinas, aspirina, inhibidores de la GPIIb/IIIa y trombolíticos, entre otros. Dado que la aterotrombosis es una enfermedad multifactorial y multigénica, se asocian múltiples factores de riesgo que deben ser tenidos en cuenta para un tratamiento más adecuado. A los factores de riesgo clásicos (diabetes, obesidad, tabaquismo, hiperlipidemia, etc.) se han empezado a evaluar otros tales como niveles altos de fibrinógeno, indicadores de inflamación, variantes de glicoproteínas plaquetarias, niveles de PAI-1 y polimorfismos de APO, entre otros.

4.2.1. Agentes para el tratamiento de la trombosis

El tratamiento de los desórdenes trombóticos requieren de tres grupos de fármacos: anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios y fibrinolíticos (Tabla 4.2). Dado que los blancos de acción son componentes del sistema hemostático, la desventaja que comparten es el riesgo a la hemorragia. El antitrombótico ideal sería aquel que inhibe la trombosis y evita el riesgo de hemorragia (Furie & Furie, 2008).

Anticoagulantes	Antiagregantes plaquetarios	Fibrinolíticos
Heparina no fraccionada (HNF)	Aspirina	Estreptoquinasa
Heparina de bajo peso molecular (HBPM)	Inhibidores de GPIIb/IIIa (ej., abciximab, eptifibatide, tirofiban)	Activadores del plasminógeno tisular recombinantes (r-TPAs)
Inhibidores de trombina (ej. argatroban, bivalirudina, hirudina)	Bloqueador del receptor de ADP (ej. Ticlopidina, clopidogrel)	
Anticoagulantes orales	Inhibidores de TXA ₂ sintasa	
	Antagonistas de TXA ₂	

Tabla 4.2. Agentes para el tratamiento de la trombosis

Los desórdenes cardiovasculares representan la principal causa de muerte en el mundo, así como en la Argentina (WHO). Aunque la trombosis sigue siendo la vía final de enfermedad y muerte en algunas de las enfermedades más comunes, tales como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y cáncer, todos los agentes farmacológicos disponibles para su prevención o tratamiento han estado en uso durante décadas o han sido reemplazados con nuevas variantes que ofrecen una modesta mejora incremental (Furie & Furie, 2008).

En los últimos años, una serie de combinaciones de anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios y agentes fibrinolíticos se han probado en ensayos clínicos en pacientes con síndromes coronarios agudos, dando lugar a cambios en la práctica clínica y mejoras en la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Merli, 2007).

En cuanto a los agentes fibrinolíticos, la estreptoquinasa sigue siendo un medicamento efectivo para disolver coágulos, estando indicada en el tratamiento de algunos casos de infarto de miocardio (Sikri & Bardia, 2007). Sin embargo, la estreptoquinasa y la u-PA activan no sólo el Plg unido a fibrina sino también el Plg circulante generando plasmina libre, la cual es capaz de degradar otras proteínas plasmáticas, además de contribuir a eventos proinflamatorios (Syrovets *et al.*, 2012). Durante la última década, la atención se ha centrado en la mejora de la potencia, eficacia y facilidad de administración de los agentes fibrinolíticos. En este sentido, se han desarrollado variantes recombinantes de los PAs que preferencialmente activan el Plg unido a fibrina (Collen, 1996).

La búsqueda de enzimas fibrinolíticas alternativas llevó hace 70 años al descubrimiento de los venenos de serpiente como agentes de disolución intravascular para coágulos. La alfineprasa, una variante recombinante del veneno, se caracteriza por tener un efecto directo sobre la fibrina y es rápidamente inhibida al ser unida por α_2 -MG (Anónimo, 2008).

4.2.1.1. Proteasas vegetales como antitrombóticos

La bromelina ha mostrado ser un agente fibrinolítico *in vivo* e *in vitro*, no sólo actúa directamente sobre la fibrina, también activa el Plg y aumenta la concentración de plasmina. Por otro lado y en relación a su efecto antimetastásico, es capaz de disminuir la expresión de uPAR (receptor de u-PA) en células tumorales (Maurer, 2001). En un modelo inflamatorio animal bromelina incrementó la actividad fibrinolítica sérica de manera dosis dependiente (Pirota & de Giuli-Morghen, 1978).

En un modelo de trombosis *in vivo* la administración oral de esta proteasa disminuyó la formación de trombos (13% en arteriolas y 5% en vénulas), mientras que *in vitro* redujo la adhesión al endotelio de plaquetas humanas activadas por trombina. Por otro lado, el tratamiento de plaquetas humanas con bromelina redujo la agregación inducida por trombina (Metzig *et al.*, 1999) y por ADP (Gläser & Hilberg, 2006).

El tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) fueron prolongados significativamente luego de la administración oral de bromelina en ratas (Livio *et al.*, 1978). En el mismo estudio se observó inhibición en la agregación plaquetaria. La administración oral de bromelina durante 10 días en personas sanas no afectó el TP, aunque sí levemente el TTPa, pero dentro de rangos normales (Eckert *et al.*, 1999).

Más recientemente Bilheiro *et al.* (2013) reportaron que una fracción rica en cisteínendopeptidasas aislada del látex de *Carica candamarcensis* manifestó efecto fibrinolítico, fibrinogenolítico y trombolítico, actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria

inducida por ADP, así como la prolongación del TP, TT y TTPa. Todos estos efectos fueron dosis dependiente y cesaron al agregar inhibidores de cisteínproteasas.

4.3. Objetivos

Dentro del objetivo general de investigar la posible aplicación como agentes para el tratamiento de la trombosis de los extractos parcialmente purificados obtenidos de frutos de *Bromelia hieronymi* (Bh), *B. balanasae* (Bb) y *Pseudananas macrodentes* (Pm), se plantearon como objetivos específicos:

- Evaluar y comparar los posibles efectos de Bh, Bb y Pm sobre la coagulación sanguínea, el fibrinógeno y la fibrina.
- Determinar si los efectos medidos tienen relación con la actividad proteolítica de los extractos.
- Comparar los efectos de Bh, Bb y Pm con los medidos para bromelina.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Efecto anticoagulante

Para medir el efecto de los preparados sobre la coagulación sanguínea se realizaron dos pruebas globales de la coagulación: el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Las pruebas globales se caracterizan por ser rápidas y sencillas y aunque sus resultados pueden indicar una alteración, no identifican el componente afectado (Duboscq, 2003).

Los valores del TP y del TTPa se obtuvieron a partir de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* se realizaron midiendo el TP y el TTPa de un pool de plasma humano pobre en plaquetas antes y después de ser incubado con distintas concentraciones de los preparados proteolíticos, mientras que los ensayos *in vivo* consistieron en medir el TP y el TTPa de plasmas obtenidos de ratas Wistar tratadas con los preparados proteolíticos.

4.4.1.1. Ensayos *in vitro*

4.4.1.1.1. Pool de plasma pobre en plaquetas

El pool fue elaborado con 15 muestras de plasma pobre en plaquetas (ppp) obtenidas de dadores voluntarios adultos de entre 30 y 65 años que no hubieran consumido aspirina u otros fármacos con acción anticoagulante en los 10 días previos. El ppp fue obtenido del sobrenadante luego de centrifugar sangre anticoagulada con citrato de sodio al 3,8% (relación

sangre:citrato de sodio = 9:1) durante 10 min a 3000 g. El pool fue conservado en freezer a -20 °C durante su elaboración (1 semana) y una vez terminado fue fraccionado en tubos de plástico y conservado a -80 °C hasta su uso (2 meses).

4.4.1.1.2. Tiempo de protrombina (TP)

El TP o tiempo de Quick se basa en la medida del tiempo de coagulación de un plasma decalcificado en presencia de tromboplastina tisular y Ca^{+2} . El término tromboplastina tisular hace referencia a una mezcla de tromboplastina o factor tisular (FT) y fosfolípidos (Duboscq, 2003).

Esta prueba permite evaluar la vía extrínseca del modelo clásico de la coagulación, ya que es sensible a cambios en los niveles del FVII, además de los otros factores vitamina K-dependientes (FII y FX) y del FV. El nivel de fibrinógeno debe estar muy disminuido (menos del 50% de la concentración normal en plasma) para alterar el TP. Es un ensayo esencial para el monitoreo de pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes orales (Duboscq, 2003).

Para la medida del TP se usó el kit comercial Soluplastin (Wiener lab Group), que contiene tromboplastina tisular de cerebro de conejo. En la Tabla 4.3 se esquematiza el protocolo seguido, el cual fue adaptado del procedimiento establecido por el kit.

Mezcla de reacción (MR) 100 µL de ppp + 10 µL de muestra ¹ en tubo de plástico	Reactivo (Tromboplastina, CaCl ₂ , NaCl) 200 µL en tubo de hemólisis
1. Incubación a 37 °C (diferentes tiempos)	Incubación a 37 °C durante 2 min
2. Agregar 100 µL de MR al tubo con reactivo y en simultáneo iniciar el cronometraje	
3. Medir el tiempo transcurrido hasta la detección del coágulo	

Tabla 4.3. Protocolo experimental para la medida del TP. ¹ Preparado proteolítico o solución control (buffer fosfato sódico 0,1M, pH 6)

El coágulo fue detectado "pescándolo" mediante un ansa de acero inoxidable; los valores de TP medidos para el pool de ppp tratado con los distintos preparados proteolíticos (TP_p) fueron expresados en s y se compararon con los medidos para los controles (TP_c) obtenidos al mezclar el pool de ppp con buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6 (buffer de resuspensión de la bromelina y de los precipitados etanólicos de cada uno de los extractos ensayados).

En cuanto a los valores de referencia, según información del proveedor del reactivo, el intervalo de los valores de TP de individuos normales adultos oscila entre 10 y 14 s, aunque dichos valores dependen de los reactivos y del procedimiento. Tiempos prolongados indican un estado de hipocoagulabilidad, por deficiencia tanto de factores de la vía extrínseca como de

vitamina K y por presencia de inhibidores, mientras que tiempos acortados se asocian a estados de hipercoagulabilidad. Altas concentraciones (> 50 µg/mL) de productos de degradación de fibrina así como enfermedad hepática son algunas causas de prolongados valores de TP (Duboscq, 2003).

4.4.1.1.3. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

El ensayo consiste en medir el tiempo de coagulación del plasma decalcificado en presencia de un exceso de tromboplastina parcial, un activador y Ca⁺². El término tromboplastina parcial se refiere a la porción fosfolipídica en la que se encuentra anclada la tromboplastina (o FT). El activador proporciona la superficie cargada negativamente desencadenante de la fase de contacto, generalmente tierra de diatomeas, celite o caolín (Duboscq, 2003).

Esta prueba sirve para detectar anomalías en la vía intrínseca del modelo clásico, ya sea por deficiencia de factores procoagulantes como por la presencia de inhibidores, por ser sensible frente a deficiencias de los factores FXII, FXI, FIX y FVIII como también frente a deficiencias severas de fibrinógeno, FII, FV y FX. Es usada para monitorear el tratamiento terapéutico con heparina no fraccionada y con acenocumarol (Duboscq, 2003).

Se utilizó el kit comercial APTTest (Wiener lab Group), que utiliza cefalina como tromboplastina parcial y tierra de diatomeas como activador. En la Tabla 4.4 se esquematiza el protocolo seguido en los ensayos, el cual fue adaptado del procedimiento establecido por el kit.

Mezcla de reacción (MR)	Reactivo
100 µL de pool de ppp + 10 µL de muestra ¹ en tubo de plástico	(Cefalina + tierra de diatomeas) 100 µL en tubo de hemólisis
1. Incubar de MR a 37 °C (diferentes tiempos)	
2. Agregar 100 µL de MR al tubo con reactivo e incubar a 37 °C durante 3 min	
3. Agregar 100 µL de CaCl ₂ 0,025 mol/L (precalentado a 37 °C), iniciar simultáneamente el cronometraje y homogeneizar	
4. Medir el tiempo transcurrido hasta la detección del coágulo	

Tabla 4.4. Protocolo experimental para la medida del TTPa.¹ Preparado proteolítico o control (buffer fosfato sódico 0,1 M, pH 6).

El coágulo fue detectado "pescándolo" mediante un ansa de acero inoxidable. Los tiempos de tromboplastina parcial activada medidos para el pool de ppp tratado con las distintas preparaciones proteolíticas (TTPa_p) fueron expresados en s y se compararon con los medidos

para los controles (TTPa_c), los que se obtuvieron al mezclar el pool de ppp con buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6.

Los valores de TTPa dependen fuertemente de los reactivos y del sistema de detección utilizado, por lo cual es importante comparar los resultados obtenidos de la muestra ensayada con la de un control usando un mismo lote de reactivo. Según información del proveedor del reactivo, el intervalo de los valores de TTPa de individuos normales adultos oscila entre 33 y 48 s y los tiempos que se diferencian en más de 6 s de un plasma control deberán ser considerados anormales. Tiempos prolongados indican un estado de hipocoagulabilidad (deficiencia de factores o presencia de inhibidores), en tanto que los tiempos acortados corresponderían a un estado de hipercoagulabilidad, aunque en este caso es aconsejable tomar una nueva muestra pues la muestra podría haber sido activada *in vitro* (Duboscq, 2003).

4.4.1.1.4. Efecto de la inhibición de la actividad proteolítica sobre la acción anticoagulante

Las soluciones de Bh, Bb, Pm y bromelina que extendieron el TP y el TTPa del pool de ppp por encima de 180 s fueron incubadas durante 30 min a 37 °C con 0,35 mM de E-64. Luego de verificar la pérdida de la actividad proteolítica de dichas soluciones se volvió a determinar los valores de TP y de TTPa siguiendo los protocolos de las tablas 3.3 y 3.4, respectivamente. La solución control para ambos ensayos fue buffer fosfato sódico 0,1M de pH 6 conteniendo 0,35 mM de E-64.

4.4.1.1.5. Análisis de los datos obtenidos y expresión de resultados

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA y posterior test de Dunnett. Cuando se compararon sólo dos grupos se utilizó la prueba t (no pareada). Un $p < 0,05$ (*) fue considerado significativo. Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPadPrism version 5.0.

Para todos los preparados proteolíticos, las soluciones y diluciones ensayadas fueron elaboradas n veces (indicado en cada caso) y a cada una de ellas se les midió el TP y el TTPa por duplicado (intraensayo). Los resultados son expresados como el promedio de los valores promedio intraensayo \pm desviación estándar (DE).

4.4.1.2. Ensayos *in vivo*

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se usaron para estimar las dosis que pudieran resultar efectivas como anticoagulantes en los ensayos *in vivo*. Para estos ensayos, ratas Wistar de ambos sexos y pesos entre 150 y 240 g fueron divididas en lotes de 6 animales (3 hembras y 3 machos). Cada lote recibió intraperitonealmente los preparados proteolíticos; el

lote control no recibió tratamiento. Previo a la extracción sanguínea, los animales fueron anestesiados con una mezcla de 75 mg/kg de ketamina clorhidrato (Holliday Scott S.A.) y 12 mg/kg de xilacina clorhidrato (Richmond Laboratories Vet Pharma) administrada intraperitonealmente. La extracción fue realizada por punción cardíaca y la sangre obtenida fue mezclada con citrato sódico al 3,8% en una relación sangre:anticoagulante = 9:1, se centrifugó durante 10 min a 3000 g y el sobrenadante (ppp) fue separado en tubos de plástico que se almacenaron en freezer a -20 °C hasta el momento de medida del TP y del TTPa. En la tabla 4.5 se esquematiza el protocolo seguido para las determinaciones del TP y del TTPa del ppp de cada animal según indicaciones de los respectivos kits comerciales (Wiener lab Group).

TP	
Plasma pobre en plaquetas (ppp) 100 µL en tubo de plástico	Reactivo (Tromboplastina, CaCl ₂ , NaCl) 200 µL en tubo de hemólisis
1. Incubación a 37 °C durante 2 min	
2. Agregar 100 µL de ppp al tubo con reactivo y en simultáneo iniciar el cronometraje	
3. Medir el tiempo transcurrido hasta la detección del coágulo	
TTPa	
Plasma pobre en plaquetas (ppp) 100 µL	Reactivo (Cefalina + tierra de diatomeas) 100 µL en tubo de hemólisis
1. Agregar 100 µL de ppp al tubo con reactivo e incubar a 37 °C durante 3 min	
2. Agregar 100 µL de CaCl ₂ 0,025 mol/l (precalentado a 37 °C), en simultáneo iniciar el cronometraje y homogeneizar	
3. Medir el tiempo transcurrido hasta la detección del coágulo	

Tabla 4.5. Protocolos experimentales para las medidas del TP y del TTPa.

Tanto el TP como el TTPa de cada animal corresponden al promedio de los valores obtenidos en dos determinaciones.

4.4.1.2.1. Análisis de los datos obtenidos y expresión de resultados

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA seguido por el test de Tukey y las diferencias entre los grupos fueron consideradas significativas para un $p < 0,05$ (*). Los cálculos fueron efectuados con el programa GraphPadPrism version 5.0. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM.

4.4.2. Efecto fibrinogenolítico

El efecto de los preparados proteolíticos sobre el fibrinógeno fue evaluado mediante el registro electroforético, por la técnica de tricina-SDS-PAGE, de los hidrolizados obtenidos al incubar las mezclas de dichos compuestos.

4.4.2.1. Hidrolizados

Se utilizó como sustrato proteico el fibrinógeno bovino (F8630, Sigma Aldrich) solubilizado en buffer Tris-HCl 0,025M, pH 8. Las mezclas de reacción se hicieron de manera que la concentración final de fibrinógeno fuera mayor o igual a 1 mg/mL, a fin de poder detectar la proteína remanente tras el desarrollo de la electroforesis, mientras que las concentraciones de los preparados proteolíticos se fueron variando en función de los perfiles obtenidos. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante diferentes tiempos y las reacciones fueron finalizadas por el agregado de ácido iodoacético (inhibidor de cisteínendopeptidasas) y de buffer de muestra (BM). Finalmente fueron llevadas a ebullición durante 5 min. El procedimiento se resume en la Tabla 4.6 y la composición del buffer de muestra en la Tabla 4.7.

Tratamiento de los hidrolizados	
1) Hidrolizados	25 µL
2) Acido iodoacético (11 mM)	5 µL
3) BM	25 µL
4) Llevar a ebullición 5 min	

Tabla 4.6. Finalización de la reacción y preparación de los hidrolizados resultantes para la corrida electroforética.

Buffer de muestra	
Tris	1,57 g
SDS	4 g
Glicerol	16 mL
Azul de bromofenol	4 mg
β-mercaptoetanol*	2,5 µL
Llevar a pH 6,8 con HCl 1M	
AD, c.s.p	100mL

Tabla 4.7. Composición del buffer de muestra (BM). AD: agua destilada. * β-mercaptoetanol fue agregado en el momento de tratar los hidrolizados

Para los blancos de reacción se respetaron las mismas cantidades de la Tabla 4.6 pero se cambió el orden en que se agregaron los reactivos (Tabla 4.8).

Blancos de reacción	
1) Volumen de solución del preparado proteolítico	E μ L
2) Acido iodoacético (11 mM)	5 μ L
3) BM	25 μ L
4) Volumen de solución de fibrinógeno	S μ L
5) Llevar a ebullición 5 minutos	

Tabla 4.8. Procedimiento para la preparación de blancos de reacción. Los volúmenes de la solución del preparado proteolítico (E) y del fibrinógeno (S) fueron tales que S+E = 25 μ L.

Las muestras resultantes se conservaron en freezer a -20°C hasta el momento de la siembra.

4.4.2.2. Tricina-SDS-PAGE

Esta técnica electroforética es muy adecuada para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 1 a 100 kDa y es la preferida para la resolución de proteínas con pesos moleculares más pequeños que 30 kDa (Schägger, 2006). La tricina es utilizada como ion de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a concentraciones menores de acrilamida que en el caso del buffer Tris-glicina utilizado en la técnica ideada por Laemmli (1970). La electroforesis con tricina permite una mejor resolución de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 y 20 kDa, sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987).

Para el moldeado de geles y la corrida electroforética se empleó el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Debido a que el PM de la cadena más grande del fibrinógeno ($A\alpha$) es de alrededor de 65 kDa, se eligió el sistema de geles que permite resolver mezclas proteicas en el rango 5-100 kDa, que consiste en un gel de resolución con 10% de T¹⁴ y 3% de C¹⁵ y en un gel de apilamiento con 4% de T y 3% de C (Tabla 4.9).

Las muestras obtenidas según lo indicado en 4.4.2.1 fueron centrifugadas durante 10 min a 16000 g y el sobrenadante fue sembrado (5 μ L) sobre el buffer catódico (Tris 0,1M, Tricina 0,1M, SDS 0,1%) contenido en las calles.

¹⁴ %T= (g acrilamida+g bisacrilamida) x 100 / volumen total.

¹⁵ %C= g bisacrilamida x 100 / (g acrilamida+g bisacrilamida).

Reactivos	Gel de apilamiento 4%T y 3%C	Gel de resolución 10%T y 3%C
Acril:Bis (48:1,5)	0,6 mL	2 mL
Buffer del gel	1,00 mL	3,3 mL
H ₂ O	3,4 mL	4,7 mL
PSA 10%	40 µL	50 µL
TEMED	4 µL	5 µL

Tabla 4.9. Sistema de geles empleado (rango 5-100kDa). Buffer del gel: Tris-HCl 3M, pH 8,45 conteniendo SDS 0,3 %. PSA: persulfato de amonio. TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

En los reservorios anódicos y catódicos de la celda electroforética se colocaron buffer anódico (Tris-HCl 0,2M, pH 8,9) y buffer catódico, respectivamente.

La electroforesis fue desarrollada sin refrigeración. El voltaje inicial fue de 30 V y se mantuvo constante durante el paso de las muestras por el gel de apilamiento; cuando las muestras entraron al gel de resolución se lo aumentó a 100 V, valor que se mantuvo constante hasta que el frente de colorante alcanzó el fondo del gel. Inmediatamente después los geles fueron removidos de las placas y las bandas proteicas visualizadas mediante tinción con Coomassie, para lo cual los geles se dejaron durante 30 min en solución fijadora (10% v/v de ácido acético, 50 % v/v de metanol). Luego fueron coloreados con solución colorante (10% v/v de ácido acético, 40% v/v de metanol y 100 mg de Coomassie Brilliant Blue R-250) y decolorados con una solución de ácido acético al 10% v/v. Una vez secos fueron escaneados y las imágenes reducidas a un tamaño y resolución adecuados en un programa de procesamiento de imágenes (Adobe Photoshop y Aldus Photostyler). Luego se utilizó un software especial (Scion Image, 1998; URL: <http://www.scioncorp.com>) que convierte la intensidad de color de las bandas presentes en los geles en datos numéricos, permitiendo realizar densitogramas de las calles sembradas.

4.4.3. Efecto fibrinolítico

4.4.3.1. Placa de fibrina

A fin de evaluar la actividad fibrinolítica de los preparados proteolíticos se desarrolló el ensayo de la placa de fibrina. Este ensayo, altamente reproducible y sensible, consiste en depositar gotas de la solución en ensayo sobre un coágulo de fibrina formado en una placa de Petri y determinar la cantidad de fibrina degradada, midiendo las áreas de las zonas lisadas después de incubar la placa a 37 °C sobre una superficie nivelada en una cámara húmeda (Jespersen & Astrup, 1983).

Se siguió la técnica desarrollada por Dametto *et al.* (2000), con algunas modificaciones, según la cual 4 mL de fibrinógeno al 0,5% en el buffer de reacción (barbital 0,045 M, pH 7,75

conteniendo CaCl_2 1,66 mM, MgCl_2 0,7 mM y NaCl 92 mM) fueron mezclados con 4 mL de una solución de agarosa al 2% preparada en el mismo buffer y 0,2 mL de 20 unidades NIH/mL de trombina, todos a 42 °C. La mezcla fue depositada en una placa de Petri (1,5 x 9 cm), homogeneizada mediante movimientos circulares y dejada 1 h a temperatura ambiente para permitir la correcta formación y estabilización de la fibrina. Sobre la superficie del coágulo se sembraron 10 μL por muestra y luego de incubar en atmósfera húmeda a 37°C durante 14 h, se midieron 2 diámetros perpendiculares para cada área de lisis.

Se utilizó fibrinógeno bovino (F8630, Sigma Aldrich) y trombina bovina (T7513, Sigma Aldrich), mientras que como control se empleó plasmina humana (P1867, Sigma Aldrich). La concentración de trombina usada en el ensayo fue obtenida por dilución de una solución stock de trombina (100 unidades NIH/mL en solución de 0,9% de NaCl y 0,1% de seroalbúmina bovina) con el buffer de reacción.

4.4.3.2. Cálculos y análisis de resultados

El área de la zona circular lisada durante el período de incubación es proporcional a la cantidad de producto (fibrina lisada) formado enzimáticamente y por tanto una medida de la actividad fibrinolítica de la solución sembrada, la cual fue estimada como el producto de 2 diámetros perpendiculares (mm^2) de la zona lisada (Jespersen & Astrup, 1983). La relación entre la concentración de la enzima (C) y la actividad fibrinolítica (A) tal como fue definida, es:

$$A = k \cdot C^a \quad \text{siendo } k \text{ y } a \text{ constantes}$$

Puesto que a es diferente de 1, esta relación no es una función lineal. Sin embargo, aplicando logaritmos a ambos miembros de la relación se obtiene:

$$\log A = b + a \cdot \log C \quad \text{siendo } b = \log k$$

Lo cual permite estimar los parámetros k y a de forma más precisa, mejorando la precisión del ensayo. El parámetro b expresa la actividad fibrinolítica (como $\log k$) cuando la concentración es 1, mientras que el parámetro a expresa implícitamente el mecanismo del ensayo (Jespersen & Astrup, 1983).

La actividad fibrinolítica fue medida por triplicado para una serie de diluciones de cada preparado proteolítico y se graficaron las relaciones doble logarítmicas entre A y C . Los parámetros de correlación calculados mediante el programa GraphPadPrism versión 5.0 sirvieron para comparar las actividades fibrinolíticas de los distintos preparados además de

encontrar una correlación entre la actividad caseinolítica y la actividad fibrinolítica para cada una de ellas.

4.4.4. Material vegetal

El contenido proteolítico (UCas/mg) y proteico (μg proteína/mg), así como la actividad específica (UCas/mg proteína) de los extractos utilizados, se presenta en la Tabla 4.10.

Liofilizados	UCas/mg	μg proteína/mg	UCas/mg proteína
Bh	$0,275 \pm 0,005$	27 ± 2	10
Pm	$0,166 \pm 0,009$	34 ± 3	5
Bb	$0,155 \pm 0,008$	11 ± 1	14
Bromelina (Sigma Aldrich)	$0,68 \pm 0,04$	205 ± 2	3,3

Tabla 4.10. Contenido proteolítico (UCas/mg), proteico (μg proteína/mg) y actividad específica (UCas/mg proteína) de los extractos ensayados. UCas: unidades caseinolíticas (pH 7,5 y 37°C). Media \pm DE.

Para todos los ensayos las soluciones de los extractos fueron preparadas por resuspensión de los liofilizados en agua destilada, mientras que la bromelina fue redisuelta en buffer fosfato sódico 0,1 M de pH 6.

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Efecto anticoagulante

4.5.1.1. Ensayos *in vitro*

Con el objetivo de determinar las concentraciones, tiempos y volúmenes a incubar se realizaron ensayos preliminares con un único ppp, a partir de cuyos resultados (no mostrados) se decidió que el tiempo de incubación fuera de 2 min. Durante los ensayos con el pool de ppp, las concentraciones que no mostraron resultados concluyentes a los 2 min también fueron ensayadas incubando durante 10 min.

Debido a que no todas las concentraciones fueron replicadas en igual número, éste (n) se indica en la tabla junto con el valor de la desviación estándar (DE). Como se mencionó, cada replicado corresponde a un ensayo independiente y es el promedio de dos medidas realizadas dentro de cada ensayo. Cuando el coágulo no fue detectado dentro de los 180 s desde el inicio del cronometraje, dichas medidas (indicadas como nc) no fueron tenidas en cuenta para el análisis estadístico y por tanto no se contabilizaron dentro del valor de n ; se decidió considerar este tiempo como un efecto máximo.

En las tablas aparecen las concentraciones finales, es decir referidas al volumen de mezcla (pool de ppp + preparado proteolítico).

En la mayoría de los casos, además de diferencias significativas de los valores de TP y de TTPa respecto a los del control, se detectaron coágulos con una consistencia diferente a la del coágulo obtenido a partir del pool de ppp sin tratamiento proteolítico. Por este motivo se elaboró una escala que contempla las diferentes características de los coágulos formados (Tabla 4.11). En algunos casos se observó que el tiempo en que se detecta el hilo de fibrina (primer indicio de la formación de fibrina) difiere más del 5% del tiempo en que se detecta el coágulo de fibrina. En este caso se tomó como tiempo de coagulación el promedio de ambos tiempos y el hecho fue indicado con la letra D.

Característica del coágulo	Número de referencia asignado
Filamentoso (carece del volumen y del aspecto “gelatinoso” del coágulo normal)	I
Muy fraccionado (más de 6 “subcoágulos”)	II
Fraccionado (menos de 6 “subcoágulos”)	III
Coágulo único pero de menor solidez que el del pool de ppp no tratado (imposibilidad de levantarlo con el ansa)	IV

Tabla 4.11. Escala en que fueron agrupados los coágulos con características diferentes de los normales

4.5.1.1.1. Tiempo de Protrombina (TP)

En la Tabla 4.12 se exponen los valores de TP de un pool de ppp luego de incubarlo con distintas concentraciones de bromelina a 37 °C durante 2 min.

Bromelina				
Concentración (mg/mL)	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo
1,4	>180	2		
1,3	82	2	37	I (2/3), nc (1/3)
1,1	61,5***	4	8	D (2/4)
0,9	38**	4	8	D (2/4)
0,65	20	3	1	
0	16,5	4	0,5	

Tabla 4.12. TP para ppp incubado durante 2 min con distintas concentraciones bromelina. Resultados del test de Dunnett: ** p<0,01; *** p<0,001. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo: número de referencia asignado (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); nc, TP>180 s; D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo.

La prolongación significativa del TP fue acompañada con alteración ya sea en el intervalo de detección del coágulo (D) como en la característica del coágulo (I).

En la tabla 4.13 se muestran los valores de TP del pool de ppp después de incubarlo con distintas concentraciones de Bh a 37 °C. Luego de incubar el pool de ppp con 3,5 mg/mL durante 2 min se obtuvieron valores y características de coágulo muy dispares entre los replicados. Por esta razón se ensayó también el tiempo de incubación de 10 min para 3,5 mg/mL y 2,5 mg/mL suponiendo que quizás Bh requiriera mayor tiempo para llegar a un equilibrio.

Concentración (mg/mL)	Bh (Incubación 2 min)				Bh (Incubación 10 min)			
	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo
5,5	62	2	23	I (2/3), nc (1/3)				
3,5	43,7**	4	13	I (2/4),IV (2/4),D	34,5**	3	9	I (1/3)
2,5	20	3	3,5	IV	22	3	3	IV
1,5	17,5	3	2					
0	16,7	3	0,6		16,5	3	0,6	16,5

Tabla 4.13. TP para ppp incubado durante 2 y 10 min con distintas concentraciones de Bh. Resultados test de Dunnett: ** $p < 0,01$. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo: número de referencia asignado (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); nc, TP>180 s; D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo.

Sin embargo, puede observarse que no ha habido variación significativa luego de incubar 10 min respecto de los valores obtenidos al incubar 2 min. Al igual que lo observado para bromelina, la prolongación significativa del TP fue acompañado por una alteración en la característica del coágulo.

En la tabla 4.14 se muestran los valores de TP del pool de ppp luego de incubarlo con distintas concentraciones de Bb a 37 °C.

Concentración (mg/mL)	Bb (Incubación 2 min)				Bb (Incubación 10 min)			
	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo
8,5	58	2	0	I (2/3), nc (1/3)				
7,5	58	1	0	I (1/3), nc (2/3)				
7,3	43,7***	3	5,5		46***	3	4	I (1/3)
6,5	29*	3	4					
0	15	3	1		16	3	0,6	

Tabla 4.14. TP para ppp incubado durante 2 y 10 min con distintas concentraciones de Bb.. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo: número de referencia asignado (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); nc, TP>180 s. Resultados test de Dunnett (Bb incubación 2 min): * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Resultado t-test (Bb incubación 10 min): *** $p < 0,001$.

No se observan cambios significativos entre los valores de TP del pool de ppp incubado a 2 y 10 min para una misma concentración. Sin embargo, hay un gran cambio en relación a la característica del coágulo cuando se varía muy poco la concentración (de 7,3 a 7,5 mg/mL). En este caso sí hay una concentración que varía significativamente el TP, sin alterar (al menos visiblemente) la característica del coágulo.

En la tabla 4.15 se exponen los valores de TP del pool de ppp luego de incubarlo con Pm durante 2 min a 37 °C. No se ha observado alteración visible en la característica del coágulo, aunque sí en el intervalo de detección del coágulo (D) y al igual que ocurre con Bb, existe una concentración que provoca una variación significativa del TP sin alterar la característica del coágulo.

Pm				
Concentración (mg/mL)	TP (s)	n	DE	Característica del coágulo
9	>180	2		
8	55,1***	5	10	D (4/5)
7,8	56,3***	4	4,5	D (3/4)
6,5	32,3*	3	3,5	
5,5	21,5	2	0,5	
0	15,3	3	0,7	

Tabla 4.15. TP para ppp incubado durante 2 min con distintas concentraciones de Pm. Resultados test de Dunnett: * p < 0,05, ***p < 0,001. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo: D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada).

4.5.1.1.2. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

Los valores de TTPa del pool de ppp luego de incubarlo durante 2 min a 37 °C con distintas concentraciones de bromelina se muestran en la Tabla 4.16. La concentración a partir de la cual se observa una prolongación significativa del TTPa es similar a la mínima concentración que prolonga el TP (\approx 0,9 mg/mL). Si bien se observaron diferencias entre el tiempo en que se detecta el hilo y el coágulo (D), no se visualizaron cambios en la característica del coágulo respecto a la de un coágulo normal.

Bromelina				
Concentración (mg/mL)	TTPa (s)	n	DE	Característica del coágulo
1,0	>180	2		
0,85	52,3***	6	8	D (2/6)
0,50	34,3	3	0,7	
0	36,4	5	3	

Tabla 4.16. TTPa para ppp incubado durante 2 min con distintas concentraciones de bromelina. Resultados test de Dunnett: *** p < 0,001. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo.

El TTPa del pool de ppp incubado con distintas concentraciones de Bh durante 2 min a 37 °C (Tabla 4.17) fue prolongado significativamente con concentraciones similares a las que prolongaron el TP. Al igual que lo observado en el ensayo para determinar el TP, las concentraciones que prolongaron el TTPa también produjeron cambios visibles en la característica del coágulo.

Bh (Incubación 2 min)				
Concentración (mg/mL)	TTPa (s)	n	DE	Característica del coágulo
3,8	>180	3		
3,5	74***	4	8	II (3/4), I (1/4)
3,3	53,4***	5	3	IV, D (3/5)
3	45,7	3	9	IV
0	39,7	3	0,6	

Tabla 4.17. TTPa para ppp incubado durante 2 min con distintas concentraciones de Bh. Resultado test de Dunnett: ***p < 0,001. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo.

En la tabla 4.18 se presentan los valores de TTPa del pool de ppp luego de incubarlo con distintas concentraciones de Bb durante 2 y 10 min. En comparación con los resultados del ensayo de medida de TP puede observarse que las concentraciones que prolongaron significativamente los TTPas están dentro del rango de concentraciones que prolongaron los TPs. Sin embargo, se observó cambio en la característica del coágulo cuando hubo prolongación significativa de los tiempos.

Concentración (mg/mL)	Bb (Incubación 2 min)				Bb (Incubación 10 min)			
	TTPa (s)	n	DS	Característica del coágulo	TTPa (s)	n	DS	Característica del coágulo
8,5	76,5	2	5	I, nc (1/3)	70	2	9	I, nc (1/3)
7,5	58**	3	7	III, D (2/3)	60*	3	9	II, D (1/3)
6,5	45	1		IV				
5,5	40,7	3	3	IV				
0	40,3	3	2		40,3	3	2	

Tabla 4.18. TTPa para ppp incubado durante 2 y 10 min con distintas concentraciones de Bb. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); nc, TTPa > 180 s; D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo. Bb (Incubación 2 min): ** p<0,01 (Dunnett). Bb (Incubación 10 min): * p<0,05 (t-test).

Los tiempos medidos a los 2 y 10 min no fueron significativamente diferentes, mientras que las características de los coágulos formados apenas variaron (de III a II).

Luego de incubar el pool con diferentes concentraciones de Pm durante 2 min no se encontró una concentración que prolongara significativamente el TTPa antes de que lo hiciera con un TTPa > 180 s. Sí se observaron cambios en la característica de los coágulos formados luego de incubar el pool con cada concentración ensayada (Tabla 4.19). Cuando se incubó durante 10 min, la concentración de 4,5 mg/mL prolongó significativamente el TTPa, que resultó ser mayor al TTPa luego de incubar el pool durante 2 min con la misma concentración. Si se comparan las tablas 4.15 y 4.19 se puede observar que la concentración que prolongó más allá de 180 s el TP fue aproximadamente dos veces mayor que la necesaria para prolongar a más de 180 s el TTPa, lo cual estaría indicando una mayor especificidad de Pm hacia alguno de los componentes de la vía intrínseca que de la extrínseca.

Concentración (mg/mL)	Pm (Incubación 2 min)				Pm (Incubación 10 min)			
	TTPa (s)	N	DE	Característica del coágulo	TTPa (s)	n	DE	Característica del coágulo
5	60	2	0	I, nc (1/3)				
4,5	43,3	3	4	III, D (2/3)	75,7*	3	13	II, D (2/3)
4	36,2	3	3	IV, D (2/3)				
2,5	36,2	2	0,4	D				
0	41	3	0,6		41	3	0,7	

Tabla 4.19. TTPa para ppp incubado durante 2 y 10 min con distintas concentraciones de Pm. Resultados t- test: * p < 0,05. n: número de replicados. DE: desviación estándar. Característica del coágulo (entre paréntesis se indica la frecuencia observada de la característica mencionada); nc, TTPa > 180 s; D, diferencia temporal entre aparición de hilo y coágulo.

Para facilitar la comparación de los efectos de los preparados proteolíticos sobre el TP y el TTPa, se graficaron las relaciones TP_p/TP_c y $TTPa_p/TTPa_c$ en función de la actividad proteolítica (UCas) de los preparados (Figura 4.6).

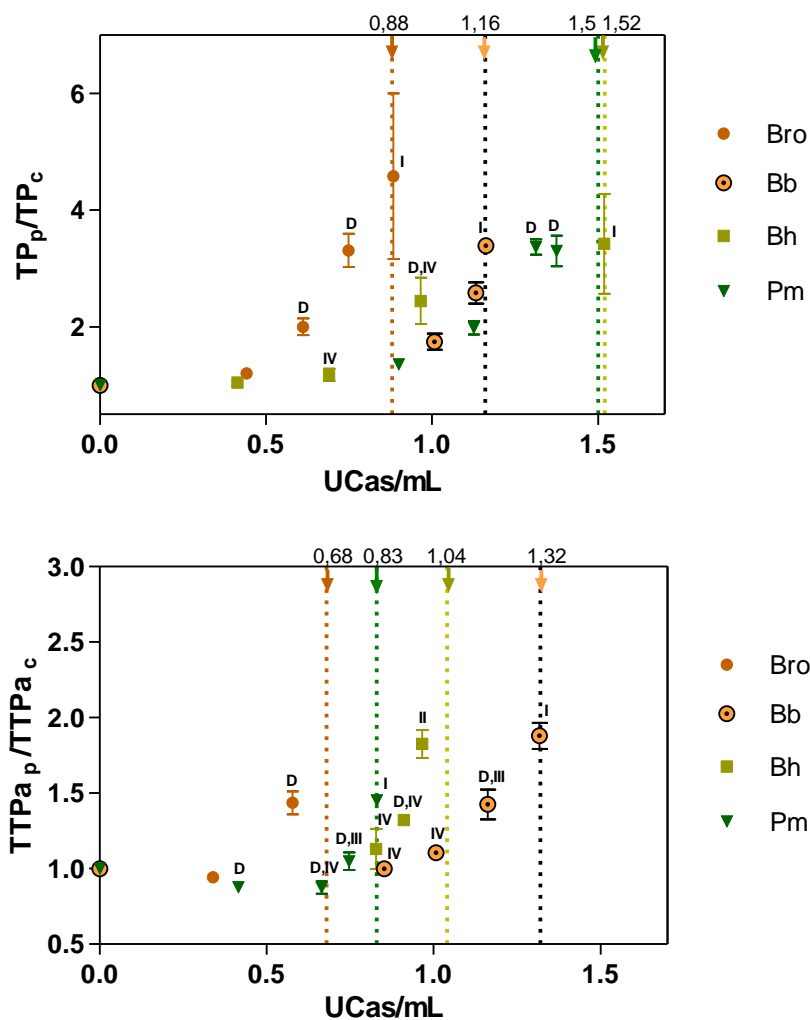


Figura 4.6. Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) del pool de ppp luego de incubarlo con los preparados (TP_p , $TTPa_p$, respectivamente) respecto a los tiempos del control (TP_c , $TTPa_c$, respectivamente) en función de las UCas/mL de bromelina (Bro) y de los preparados de *Bromelia balanse* (Bb), *B. hieronymi* (Bh) y *Pseudananás macrodentes* (Pm). Media \pm SEM. Las líneas verticales con la flecha correspondiente indican la mínima concentración del preparado respectivo en que no se detecta el coágulo antes de 180 s.

El hecho de que la característica del coágulo (I, II, III, IV) variara en relación a la concentración y al preparado con el cual se incubó, además de la alteración en el intervalo de detección del coágulo (D), dificultó las medidas de los tiempos y aportó una variabilidad cualitativa que afectó la variabilidad de los tiempos, principalmente cuando fueron cercanos al *nc*. Esto dificultó la comparación entre los efectos de los preparados así como establecer

concentraciones efectivas, pero de todos modos no impidió obtener algunas conclusiones, tal como se indica a continuación.

En todos los casos, de un corto rango de concentraciones que alteraron progresivamente la característica normal del coágulo se pasó bruscamente a TP y TTPa prolongados a más de 10 y 4 veces, respectivamente.

Para todos los preparados hubo alguna concentración que, además de prolongar el TP y el TTPa, modificó la característica del coágulo o afectó el intervalo de detección del mismo (D). Esto podría estar indicando un efecto directo sobre la estructura de la fibrina y/o, puesto que ésta depende fuertemente de la concentración así como de la estructura del fibrinógeno (Lauricella, 2007), también sobre la del fibrinógeno. Dado que la creciente evidencia apoya el concepto de que las características estructurales de la fibrina pueden representar un nuevo factor de riesgo para el tromboembolismo arterial y venoso (Undas & Ariëns, 2011), el acompañamiento de alteraciones en el coágulo al efecto anticoagulante puede resultar una desventaja. De todos modos, esto sólo podrá ser determinado mediante estudios que empleen modelos de trombosis.

Otra información que se puede obtener de la Figura 4.6 es que, teniendo en cuenta las actividades proteolíticas de cada preparado, la bromelina ha sido la más potente. Se requirieron 0,88 (\pm 0,05), 1,16 (\pm 0,06), 1,5 (\pm 0,08) y 1,52 (\pm 0,03) UCas/mL de bromelina, Bb, Pm y Bh, respectivamente, para prolongar el TP a más de 180 s y/o producir un coágulo Tipo I. En tanto que para prolongar el TTPa a más de 180 s (y/o coágulo Tipo I) se requirieron 0,68 (\pm 0,04), 0,83 (\pm 0,04), 1,04 (\pm 0,02) y 1,32 (\pm 0,07) UCas/mL de bromelina, Pm, Bh y Bb, respectivamente. Parecería existir cierta especificidad de cada preparado proteolítico hacia una u otra vía del modelo clásico de la coagulación. Por ejemplo, 0,83 UCas/mL de Pm son suficientes para prolongar el TTPa a más de 180 s, mientras que el mismo efecto sobre el TP requirió 1,52 UCas/mL de Pm. Algo similar ocurre para los demás preparados.

Probablemente estas diferencias se pudieron deber a componentes diferentes a las proteasas cisteínicas presentes en los preparados. Para poner a prueba dicha suposición y determinar si el efecto anticoagulante es debido a la acción de proteasas cisteínicas, se determinó el TP y el TTPa del pool de ppp luego de incubarlo con soluciones de los preparados tratados y no tratados con E-64.

4.5.1.1.3. Efecto de la inhibición de las proteasas cisteínicas de los preparados proteolíticos sobre su efecto anticoagulante

En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestran el TP y el TTPa, respectivamente, del pool de ppp luego de incubarlo durante 2 min a 37 °C con las soluciones de bromelina, Bh, Bb y Pm antes y

después de inhibir sus cisteínendopeptidasas. Las concentraciones ensayadas fueron un 10% mayor que aquellas que prolongaban el TP y el TTPa por encima de 180 s. En la Tabla 4.20 se muestran los valores de actividad caseinolítica de las soluciones de bromelina, Bh, Pm y Bb antes y después de tratarlas con E-64 (0,35 mM). El TP y el TTPa del control fue obtenido luego de incubar durante 2 min a 37 °C 100 μ L del pool de ppp con 10 μ L de 0,35 mM de E-64 en buffer fosfato sódico 0,1M, pH 6.

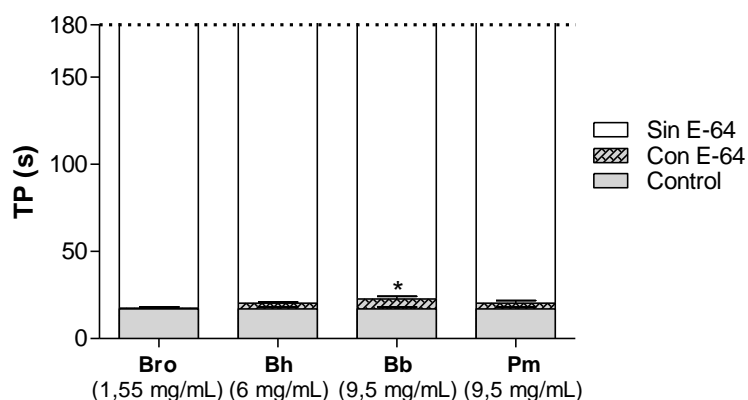


Figura 4.7. TP de un pool de ppp luego de incubarlo durante 2 min con Bro (1,55 mg/mL), Bh (6 mg/mL), Bb (9,5 mg/mL) y Pm (9,5 mg/mL) inactivas (Con E-64) y activas (Sin E-64) proteolíticamente. Valores expresados como la media \pm DE (n = 3), excepto para los grupos Sin E-64 cuyos TP fueron mayores a 180 s. Resultado test de Dunnett entre el grupo Con E-64 y el grupo Control: *p < 0,05

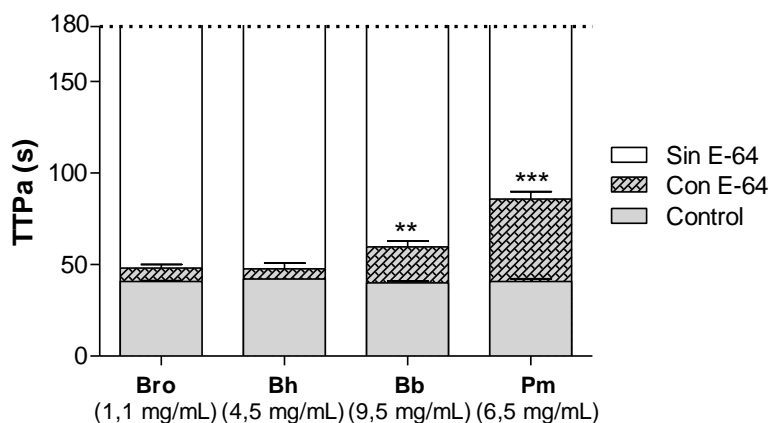


Figura 4.8. TTPa de un pool de ppp luego de incubarlo durante 2 min con Bro (1,1 mg/mL), Bh (4,5 mg/mL), Bb (9,5 mg/mL) y Pm (6,5 mg/mL) inactivas (Con E-64) y activas (Sin E-64) proteolíticamente. Valores expresados como la media \pm DE (n=3), excepto para los grupos Sin E-64 cuyos TTPa fueron mayores a 180 s. Resultado test de Dunnett entre el grupo Con E-64 y el grupo Control: ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Puede observarse que la prolongación del TP y del TTPa del pool de ppp luego de incubarlo con cada preparado es debida, preponderantemente, a la actividad proteolítica de proteasas cisteínicas. Sin embargo, el efecto anticoagulante de Bb y Pm no revirtió completamente cuando sus proteasas fueron inhibidas, lo cual podría indicar la presencia de otro componente anticoagulante presente en los preparados. Esto es más notable para el TTPa medido luego de incubar el pool con Pm sin actividad proteolítica ($TTPa_p/TTPa_c$ igual a 2,15), lo cual, sumado a que el TP no es afectado por Pm inhibido es coherente con el hecho de que se requiere mayor UCas/mL para prolongar el TP que para prolongar el TTPa. Bb inhibido también prolongó significativamente el TP y el TTPa, aunque las relaciones TP_p/TP_c y $TTPa_p/TTPa_c$ fueron más bajas (1,3 y 1,4, respectivamente). Un dato importante es que la característica de los coágulos formados a partir del pool tratado con los preparados inhibidos no mostró diferencias respecto a la característica de un coágulo normal. Esto estaría indicando que las alteraciones observadas (I, II, III, IV, D) en los coágulos formados desde el pool tratado con los preparados se debieron a la acción de las proteasas.

Liofilizados	Solución (mg/mL)	Sin E-64 (UCas/mL)	Con E-64 (UCas/mL)
Bro	20,4	14 ± 0,2	-0,45 ± 0,27
Bh	100	27,3 ± 0,4	-0,3 ± 0,2
Bb	160	24,4 ± 0,6	-0,6 ± 0,3
Pm	100	16,5 ± 0,1	-0,2 ± 0,1

Tabla 4.20. Actividad proteolítica, frente al sustrato caseína, de las soluciones de Bro, Bh, Bb y Pm antes (Sin E-64) y después (Con E-64) de ser tratadas con 0,35 mM de E-64 durante 30 min a 37°C. Los valores son expresadas como la media ± DE (n = 3). UCas: unidades caseinolíticas a 37 °C en buffer Tris-ClH 0,1M pH 7,5.

Otra causa posible que pudiera explicar el efecto anticoagulante de los preparados tratados con E-64 es que haya quedado una actividad proteolítica remanente que no haya sido detectada por el ensayo de actividad caseinolítica. Puesto que la técnica de la placa de fibrina es muy sensible, también se evaluó la actividad fibrinolítica de las soluciones de bromelina, Bh, Bb y Pm inhibidas con E-64. Sin embargo, tampoco pudo detectarse actividad frente a fibrina.

4.5.1.2. Ensayos *in vivo*

Las dosis de bromelina, Bh, Bb y Pm administradas a los animales fueron estimadas teniendo en cuenta los resultados de los ensayos *in vitro* y la relación plasma/peso corporal establecida para ratas Wistar por Bijsterbosch *et al.* (1981), según la cual:

$$\text{volumen de plasma (mL)} = 0,0291 \cdot \mathbf{PC}(\mathbf{g}) + 2,54, \text{ donde } \mathbf{PC} \text{ es el peso corporal.}$$

Como primera aproximación se definió una misma dosis en UCas/kg de bromelina, Bh, Bb y Pm a fin de poder compararlas. La dosis que se eligió fue aquella que en los ensayos *in vitro*, para todos los preparados evaluados, prolongara el TP y el TTPa más de 180 s. De la información provista por la figura 4.6 se puede concluir que a partir de la concentración de 1,55 UCas/mL de plasma se cumple con dicho requisito. Por tanto se optó por una dosis de 2 UCas/mL de plasma, equivalente a 63,3 UCas/kg de animal (aplicando la ecuación antes mencionada), que fue redondeada a 65 UCas/kg.

En la Figura 4.9 se exponen los valores de TP y de TTPa de ppp extraídos luego de 4 h de la administración intraperitoneal de los preparados proteolíticos. El tiempo de 4 h fue establecido de experimentos previos con bromelina.

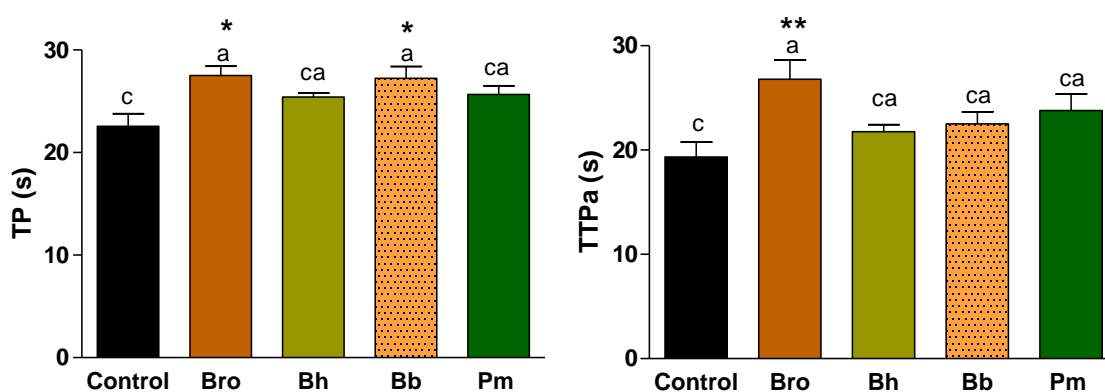


Figura 4.9. TP y TTPa de ppp obtenido de ratas Wistar luego de 4h de la administración intraperitoneal de 65 UCas/kg de bromelina (Bro), Bh, Bb y Pm. Valores expresados como la media \pm SEM. Número de replicados (n): 6 (Control, Bh, Pm), 5 (Bro y Bb). Tukey's test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, las medias con al menos una letra común no son significativamente diferentes con $p < 0,05$, la letra "c" indica que la media no es significativamente diferente del grupo control a $p < 0,05$.

Aunque todos los lotes tratados con los preparados proteolíticos mostraron valores prolongados de TP y de TTPa respecto a los de los lotes controles, sólo fueron significativos ($p < 0,05$) los tiempos de los lotes tratados con bromelina y el TP del lote tratado con Bb, los cuales significaron alrededor de un 20 % de los tiempos del lote control. Por otra parte, los tiempos de los lotes tratados con los preparados proteolíticos no se diferenciaron significativamente entre sí. Tampoco se detectaron alteraciones en los coágulos durante las medidas de TP y de TTPa.

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* e *in vitro* (Figura 4.6) coinciden en que la bromelina ha sido la más efectiva frente a TTPa y a TP y en que Bb es más efectivo para prolongar el TP que el TTPa. De todos modos, debe tenerse en cuenta que estos resultados sólo sirven como una primera aproximación en la determinación de dosis efectivas.

4.5.2. Efecto fibrinogenolítico

En la Figura 4.10 se muestran las electroforesis, junto al densitograma respectivo, de los hidrolizados obtenidos luego de incubar 200 μL de fibrinógeno bovino 1,2 mg/mL con 0,75 μL de cada preparado proteolítico equivalente a 1 UCas/mL, durante 2, 30, 60, 90, 120 y 180 min a 37 °C. El tiempo 0 min corresponde al blanco de reacción, resultante de inactivar el preparado proteolítico con iodoacético y buffer de muestra antes de mezclarlo con la solución de fibrinógeno.

La similitud entre los perfiles electroforéticos obtenidos con todos los preparados estaría indicando una similar actividad proteolítica frente al fibrinógeno, ya sea por la preferencia de sustrato como por la velocidad de reacción. La primera subunidad en ser degradada completamente fue $\text{A}\alpha$, hecho observado para todos los preparados a los 2 min de incubación. Le siguió $\text{B}\beta$ a los 30 min, mientras que la subunidad γ fue la más resistente, permaneciendo intacta durante 180 min de incubación con cada preparado. Otra característica común observada en todas las electroforesis fue la presencia de un polipéptido de alrededor de 30 kDa, aunque en menor cantidad luego de incubar con Bh, que probablemente sea producto de degradación de la subunidad $\text{B}\beta$, puesto que aparece luego de su desaparición.

Para determinar si la resistencia de la subunidad γ a ser degradada por los preparados es absoluta, se incubó el fibrinógeno con una concentración mayor de cada preparado de manera de aumentar en 100 veces la relación enzima/sustrato. Los perfiles electroforéticos obtenidos luego de incubar 68 μL de fibrinógeno 3,4 mg/mL con 7 μL de 10 UCas/mL de cada preparado, durante 10 y 120 min a 37 °C se muestran en la Figura 4.11.

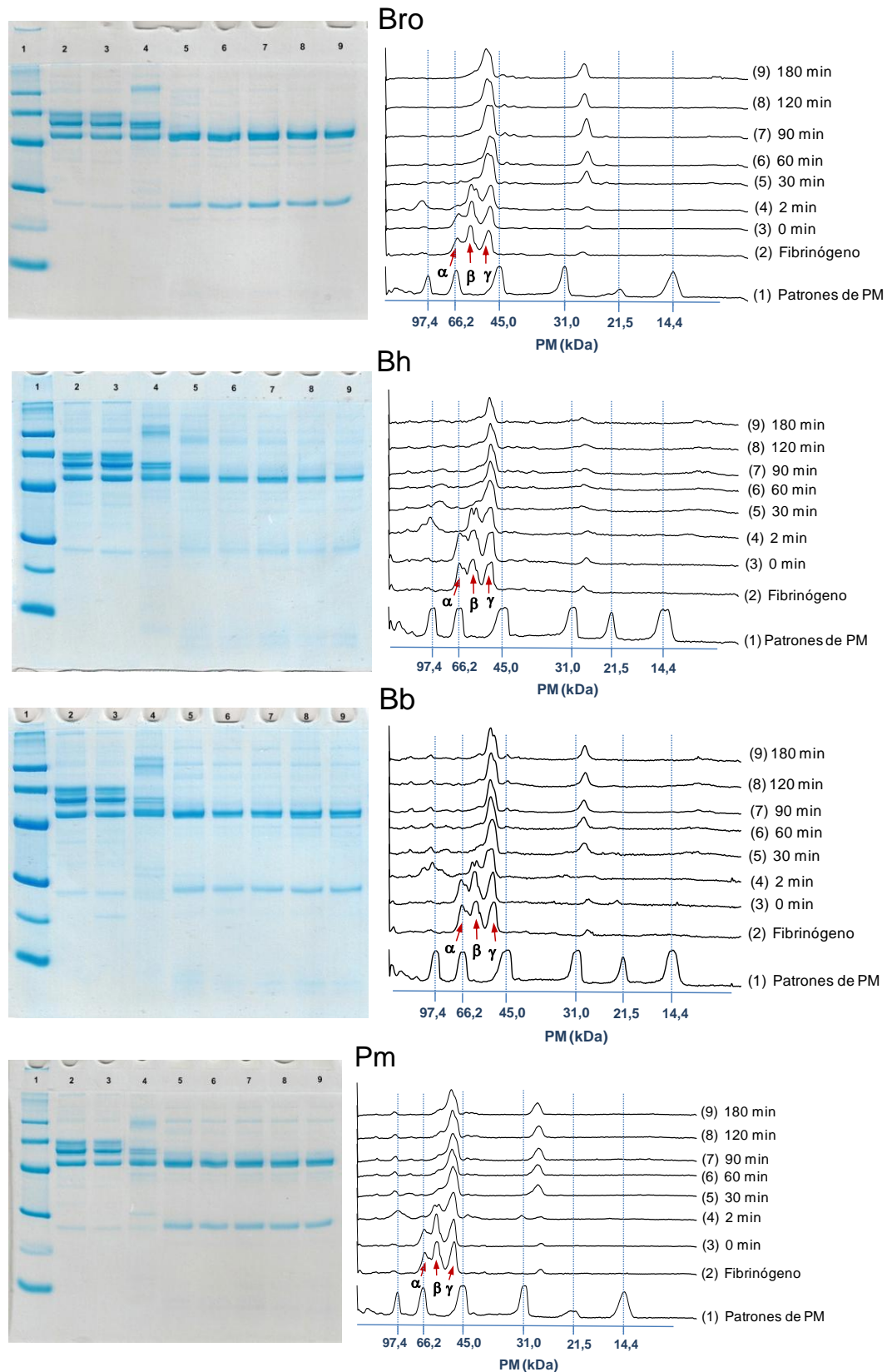


Figura 4.10. Tricina-SDS-PAGE de fibrinógeno bovino antes (calle 2) y luego de incubarlo a 37°C durante 2, 30, 60, 90, 120 y 180 min (calles 4, 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente) con bromelina (Bro, Bh, Bb y Pm). Calle 3: blanco de reacción (0 min). Calle 1: patrones de peso molecular (Bio-Rad). A la derecha de cada electroforesis se encuentra el densitograma respectivo. Son indicadas con flechas las subunidades A α (α), B β (β) y γ del fibrinógeno.

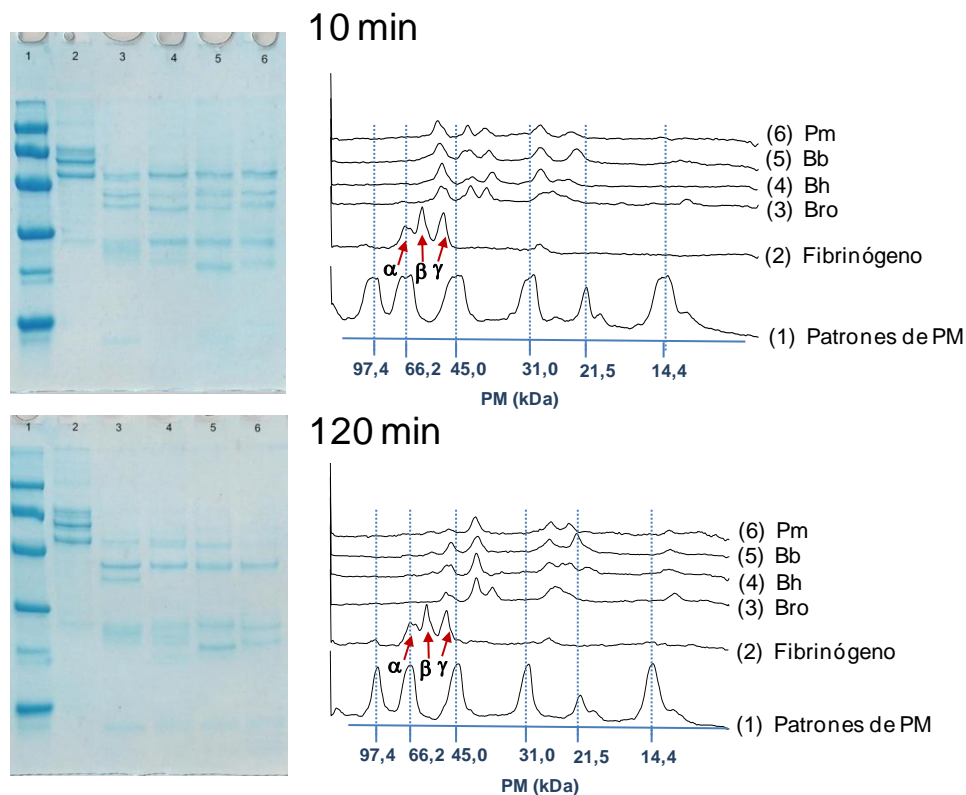


Figura 4.11. Tricina-SDS-PAGE de fibrinógeno bovino antes (calle 2) y luego de incubarlo a 37°C durante 10 y 120 min con bromelina (Bro), Bh, Bb y Pm (calles 3, 4, 5 y 6, respectivamente). Calle 1: patrones de peso molecular (Bio-Rad). A la derecha de cada electroforesis se encuentra el densitograma respectivo. Son indicadas con flechas las subunidades α , β y γ del fibrinógeno.

Puede observarse que hubo una disminución en la banda correspondiente a la subunidad α y a partir de los 10 min de incubación con cada preparado y que siguió disminuyendo hasta casi desaparecer a los 120 min, lo cual confirma que si bien la subunidad α es altamente resistente a la acción de las proteasas finalmente es susceptible de ser degradada.

A diferencia de lo observado en los ensayos de medidas del efecto anticoagulante, la misma cantidad de UCas/mL de cada preparado tuvo un efecto similar sobre el fibrinógeno. Esto puede deberse a que en el plasma cada preparado puede actuar también sobre otros componentes del sistema hemostático, como así también pueden ser inhibidos de manera diferente por α_2 -MG.

Si bien el efecto fibrinogenolítico fue evaluado usando fibrinógeno bovino, dada la escasa diferencia estructural y funcional entre los fibrinógenos de diferentes especies (Weisel, 2005), el efecto sobre la subunidad α puede servir para explicar la alteración del coágulo formado luego de incubar el pool de ppp con los preparados. La región C- α de α , una vez producida la liberación de los fibrinopéptidos A y B, produce la agregación lateral de microfibras

de fibrina, contribuyendo al espesor de la fibra, la resistencia a la tracción de la fibrina (Undas & Ariëns, 2011) y la rigidez macroscópica observada (Purohit *et al.*, 2011).

Por otro lado, dado que el fibrinógeno une a las plaquetas favoreciendo la agregación plaquetaria, se podría suponer que Bh, Bb y Pm, a través de su acción fibrinogénica, afectarán dicho proceso.

4.5.3. Efecto fibrinolítico

El efecto de los preparados sobre la fibrina fue evaluado mediante el ensayo de la placa de fibrina. En la Figura 4.12 se muestran los gráficos en escala doble logarítmica de:

- (a) la actividad fibrinolítica (mm^2/mL) en función de la actividad caseinolítica (UCas/mL) y
- (b) la actividad fibrinolítica (mm^2/mL) en función de la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

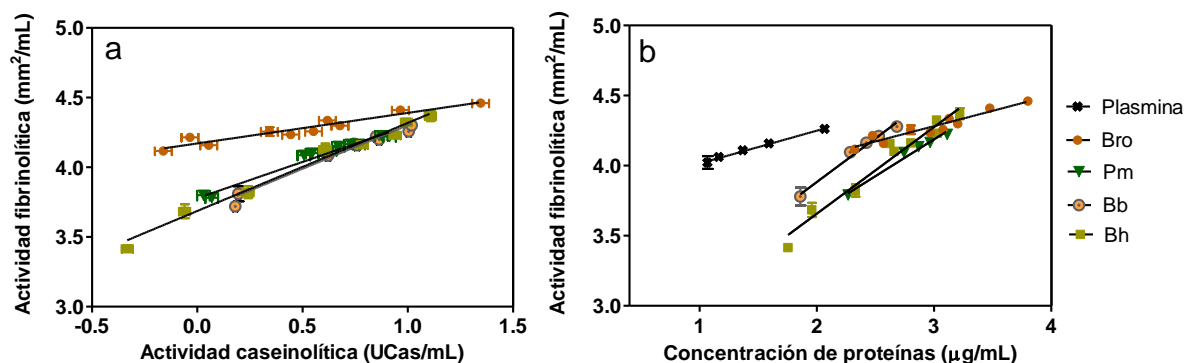


Figura 4.12. Ensayo de la placa de fibrina. a. Actividad fibrinolítica (mm^2/mL) en función de la actividad caseinolítica (UCas/mL); y b. actividad fibrinolítica en función de la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de bromelina (Bro), Bh, Bb, Pm y plasmina, en escala doble logarítmica (Log-Log). Valores expresados como la media \pm DE.

En las tablas 4.21 y 4.22 se muestran los parámetros de correlación lineal (GraphPadPrism) determinados para cada preparado según la relación $\log A = b + a \log C$, siendo **A** la actividad fibrinolítica y **C** la concentración del preparado (Jespersen & Astrup, 1983).

Parámetros	Actividad fibrinolítica-Actividad caseinolítica			
	Bro	Bh	Bb	Pm
a	0,22 ^c \pm 0,02	0,63 ^a \pm 0,03	0,63 ^a \pm 0,04	0,52 ^b \pm 0,02
b	4,17 \pm 0,01	3,69 \pm 0,02	3,68 \pm 0,03	3,78 \pm 0,02
r²	0,9017	0,9775	0,9639	0,9767
N	12	14	11	13

Tabla 4.21. Parámetros de correlación lineal de la relación Log-Log entre actividad fibrinolítica y actividad caseinolítica. **a**, pendiente; **b**, Log A (cuando C=1 UCas/mL); **N**, número de puntos. Letras superíndices distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Parámetros	Actividad fibrinolítica-Proteínas				
	Bro	Bh	Bb	Pm	Plasmina
a	0,22 ^c ± 0,02	0,62 ^b ± 0,04	0,62 ^b ± 0,04	0,52 ^b ± 0,02	0,23 ^c ± 0,02
b	3,63 ± 0,07	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,61 ± 0,06	3,88 ± 0,03
r²	0,8884	0,9586	0,9624	0,9812	0,9575
N	12	14	11	13	8

Tabla 4.22. Parámetros de correlación lineal de la relación Log-Log entre actividad fibrinolítica y proteínas. **a**, pendiente; **b**, Log A (cuando C=1 µg/mL); **N**, número de puntos. Letras superíndices distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tanto para la relación entre actividad fibrinolítica y actividad caseinolítica como para la relación entre actividad fibrinolítica y proteínas puede observarse que la pendiente **a** y la ordenada al origen **b** de Bh, Bb y Pm fueron similares entre sí y diferentes significativamente de las de bromelina. En la tabla 4.22 se puede observar que bromelina y plasmina tuvieron similares pendientes **a**, lo cual permite expresar la actividad fibrinolítica de la bromelina en unidades de plasmina (Jespersen & Astrup, 1983). En este caso, 1 µg de bromelina equivale a 0,07 µg de plasmina humana (P1867, Sigma Adrich).

La existencia de diferentes pendientes estaría indicando diferentes mecanismos intrínsecos (Jespersen & Astrup, 1983). En este sentido un factor que puede estar influyendo en el valor del área de lisis, además de la actividad proteolítica, es la difusión de las proteasas en la red de fibrina. Puesto que todas las proteasas tienen pesos moleculares similares (entre 22 y 25 kDa) y que las soluciones ensayadas de Bh, Bb y Pm se prepararon al disolver el liofilizado (a partir de una solución de buffer fosfato sódico 0,1M, pH 6) en agua mientras que la bromelina se disolvió en buffer de placa (barbital 0,045 M, pH 7,75, NaCl 92 mM), se supuso que el medio de resuspensión podría estar influyendo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las áreas de lisis medidas para bromelina disuelta en diferentes molaridades del buffer fosfato sódico de pH 6 (BF) respecto al área medida para la bromelina disuelta en el buffer de placa (BP), como así tampoco se hallaron diferencias significativas entre las pendientes y las ordenadas al origen de las curvas de actividad fibrinolítica en relación a la concentración de bromelina disuelta en BF o BP (Figura 4.13).

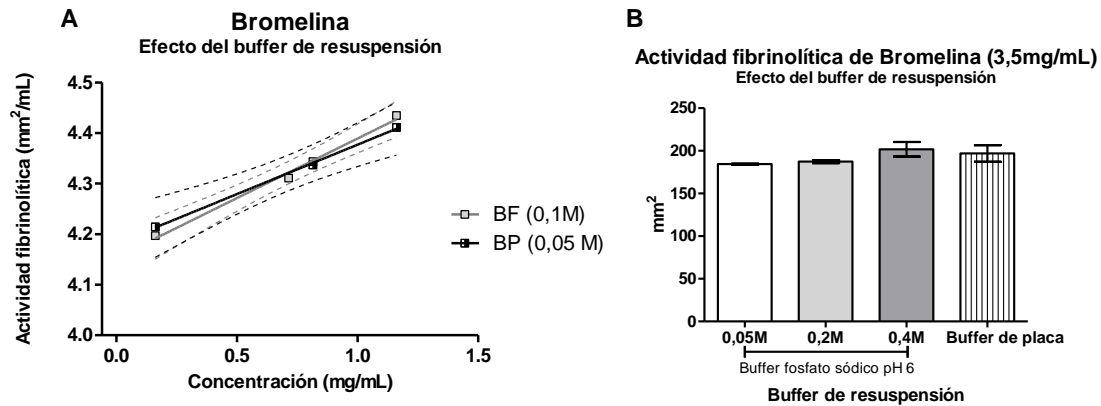


Figura 4.13. Efecto del buffer de resuspensión sobre la actividad fibrinolítica de bromelina. A. Actividad fibrinolítica (mm²/mL) en función de la concentración (mg/mL), en escala doble logarítmica; BF, buffer fosfato sódico 0,1 M pH 6. B. Actividad fibrinolítica (mm²/gota sembrada) para 3,5 mg/mL de bromelina disuelta en diferentes molaridades de BF de pH 6. Valores expresados como la media ± DE.

Por lo tanto puede concluirse que bromelina demuestra poseer una mayor actividad fibrinolítica que Bh, Bb y Pm para concentraciones menores a 10 UCas/mL, mientras que para concentraciones mayores a 10 UCas/mL Bh, Bb y Pm tendrían mayor actividad fibrinolítica que bromelina.

Una comparación de la actividad fibrinolítica (4.12 a) y del efecto anticoagulante (Figura 4.6) de los preparados permite observar que para prolongar el TP y el TTPa a más de 180 s bromelina requirió aproximadamente 3 veces más de actividad fibrinolítica (entre $13,6 \times 10^3$ y $14,4 \times 10^3$ mm²/mL) que Bh, Bb y Pm (entre $5,2 \times 10^3$ y $6,4 \times 10^3$ mm²/mL). Expresado en otros términos, bromelina muestra mayor efecto fibrinolítico que Bh, Bb y Pm sin afectar el TP y el TTPa, lo cual podría llevar a suponer que resultaría más ventajosa como agente fibrinolítico para el tratamiento de algunos de los desórdenes tromboticos (Merli, 2007). Sin embargo, se trata de una comparación entre dos sistemas distintos que tampoco presentan la complejidad de una trombosis. Futuros ensayos, fundamentalmente en modelos *in vivo*, son necesarios para afianzar o descartar estos resultados preliminares.

4.6. Conclusiones

- Todos los preparados mostraron actividad anticoagulante en los ensayos *in vitro*, efectos completamente atribuibles a la acción proteolítica de las cisteínendopeptidasas presentes en Bh y Bro, pero parcialmente a las cisteínendopeptidasas de Pm y Bb.
- Bromelina, Bh y Pm fueron más efectivas para prolongar el TTPa de un pool de ppp que el TP, mientras que Bb fue más efectiva para prolongar el TP que el TTPa.
- Para todos los preparados, el efecto sobre el TP y sobre el TTPa fue acompañado de un efecto sobre la característica del coágulo formado (filamentoso, fraccionado, frágil) el cual revirtió cuando las proteasas fueron inhibidas con E-64.
- En los ensayos *in vivo* sólo bromelina y Bb, con dosis equivalentes en unidades caseinolíticas, tuvieron un leve efecto anticoagulante.
- Todos los preparados con unidades caseinolíticas equivalentes degradaron el fibrinógeno con una cinética similar, siendo la subunidad A α la primera en ser degradada y la más resistente.
- Todos los preparados mostraron acción fibrinolítica, siendo más efectiva la bromelina para concentraciones menores a 10 UCas/mL.
- La bromelina mostró un comportamiento similar frente a la fibrina que la plasmina.
- Los resultados obtenidos en los ensayos permiten concluir que Bh, Pm y en especial Bb podrían tener un potencial efecto antitrombótico y trombolítico, hecho que deberá evaluarse en otros modelos experimentales.
- Los resultados obtenidos para Bh, Pm y Bb pueden ser de utilidad para el diseño de futuros ensayos a los fines de establecer su efectividad como agentes para el tratamiento de trombosis.

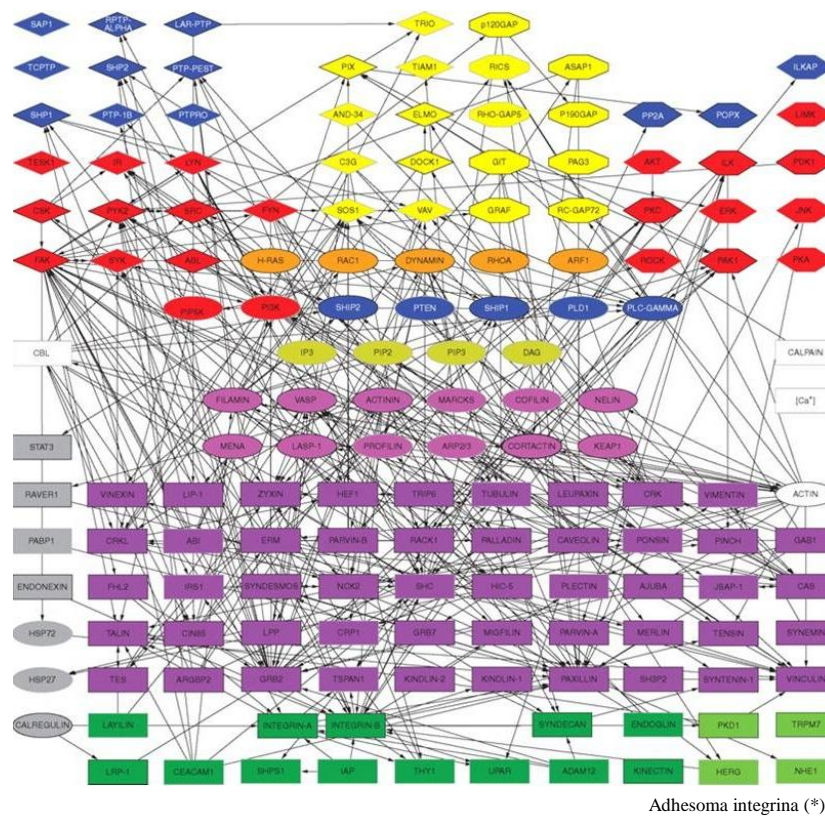
4.7. Referencias

- Adams, R.L.C. & R.J. Bird (2009) Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* **14**: 462-470.
- Anónimo (2008) Alfimeprase. *Drugs R. & D.* **9**: 185-190
- Bilheiro, R.P., A.D. Braga, J. Carvalho-Tavares, U. Agero, M. das G. Carvalho, E.F. Sanchez, *et al.* (2013) The thrombolytic action of a proteolytic fraction (P1G10) from *Carica candamarcensis*. *Thrombosis Res.* **131**: e175-e182
- Castillo, R., G. Escobar & E. Bastida (1994) *Fisiología y exploración de la hemostasia*. En: *Hematología Clínica*. 3ª edición (J. Sans-Sabrafen, ed.). Editorial Mosby. Barcelona.
- Collen, D. (1996) Fibrin-selectivity thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* **93**: 857-865.
- Dametto, M., A.P. David, S.S. Azzolini, I.T.N. Campos, A.M. Tanaka, A.Gomes, *et al.* (2000) Purification and characterization of a trypsin-like enzyme with fibrinolytic activity present in the abdomen of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Protein Chem.* **19**: 515-521.
- Duboscq, C. (2003) *Pruebas globales de hemostasia*. En *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia* (L. Kordich, ed.) 1ª edición. Editorial Grupo CAHT. Buenos Aires.
- Eckert, K., E. Grabowska, R. Stange, U. Schneider & H.R. Maurer (1999) Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncol. Rep.* **6**: 1191-1199,
- Furie, B. & B.C. Furie (2008) Mechanisms of thrombus formation. *New Engl. J. Med.* **359**: 938-949.
- Gläser, D. & T. Hilberg (2006) The influence of bromelain on platelet count and platelet activity in vitro. *Platelets* **17**: 37-41.
- Guthold, M. & S.S. Cho (2011) Fibrinogen unfolding mechanisms are not too much of a stretch, *Structure* **19**: 1536-1538.
- Jespersen, J. & T. Astrup (1983) A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. *Haemostasis* **13**: 301-315.
- Kollman, J.M., L. Pandi, M.R. Sawaya, M. Riley & R.F. Doolittle (2009) Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* **48**: 3877-3886.
- Korin, J. (2003) *Trombosis*. En *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia*. 1ª edición. (L. Kordich, ed). Editorial Grupo CAHT. Buenos Aires.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lauricella, A. M. (2007) Variabilidad de las redes de fibrina. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **41**: 7-19.
- Livio, M, M.P. Bertoni, G. De Gaetano & M.B. Donati (1978) Effects of bromelain on fibrinogen level, pothrombin complex and platelet aggregation in the rat -a preliminary report. *Drugs Exp. Clin. Res.* **4**: 49-53.

"Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas
y su comparación con bromelina" / *María Eugenia Errasti*

- Martinuzzo, M., G. Cerrato & R. Forastiero (2003) *Fisiología de la hemostasia*. En *Fundamentos para el manejo práctico en el laboratorio de hemostasia*. 1ª. edición. (L. Kordich, ed). Editorial Grupo CAHT. Buenos Aires.
- Maurer, H.R. (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 1234-1245.
- Merli, G.J. (2007) Antithrombotics and Thrombolytics for the Treatment of Acute Coronary Syndromes
- Metzig, C., E. Grabowska, K. Eckert, K. Rehse & H.R. Maurer (1999) Bromelain proteases reduce human platelet aggregation in vitro, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels in vivo. *In vivo* **13**: 7-12.
- Pirotta F. & C. de Giuli-Morghen (1978) Bromelain: anti-inflammatory and serum fibrinolytic activity after oral administration in the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.* **4**: 1-20
- Schägger, H. & G. von Jagow (1987) Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**: 16-22.
- Sikri, N. & A. Bardia (2007) A history of streptokinase use in acute myocardial infarction. *Texas Heart Institute Journal.* **34**(3): 318-327
- Syrovets, T., O. Lunov & T.J. Simmet (2012) Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J. Leukoc. Biol.* **92**: 509-519.
- Undas, A. & R.A. Ariëns (2011) Fibrin clot structure and function a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscl. Thromb. Vas.* **31**: e88-e99.
- Weisel, J.W. (2005) Fibrinogen and Fibrin. *Adv. Protein Chem.* **70**: 248-301.
- Weisel, J.W. (2007) Structure of fibrin: impact on clot stability. *J. Thromb. Haemost.* **5** (suppl. 1): 116-124.
- Zhmurov, A., A.E.X. Brown, R.I. Litvinov, R.I. Dima, J.W. Weisel & V.Barsegov (2011) Mechanism of fibrin (ogen) forced unfolding. *Structure* **19**: 1615-1624.

5. EFECTO ANTITUMORAL



(*) Red de interacciones de moléculas asociadas a la adhesión celular [Geiger, B., & K.M. Yamada (2011) *Molecular architecture and function of matrix adhesions*. Cold Spring Harb Perspect Biol doi:10.1101/cshperspect.a005033.]

5.1. Las causas de la aparición del cáncer

El cáncer sigue siendo una de las enfermedades que más preocupan a la humanidad, aún cuando no ocupe el primer lugar entre las principales causas de muerte en el mundo. Si bien la ciencia ha ido aportando sucesivos conocimientos en diferentes aspectos, hecho que ha permitido incrementar los mecanismos de prevención y de tratamiento, se encuentra aún sin respuesta la pregunta relacionada con las verdaderas causas de la enfermedad (Gibbs, 2003). Una explicación posible es que una célula debe adquirir habilidades extraordinarias para convertirse en célula maligna; hace poco más de una década Hahn & Weinberg (2002) describieron las condiciones que debe reunir una célula normal para convertirse en cancerígena, a las que denominaron “los seis superpoderes diabólicos del cáncer”, ilustrados en la Figura 5.1 y que se describen a continuación:

1. *Crecimiento en ausencia de señales.* La mayoría de las células normales esperan un mensaje externo antes de comenzar a dividirse. Las células cancerosas a menudo falsifican sus propios mensajes pro-crecimiento.
2. *Crecimiento a pesar de órdenes de detención.* A medida que el tumor se expande comprime al tejido adyacente, el cual envía mensajes químicos que normalmente detienen la división celular. Las células malignas ignoran tales órdenes, así como los de sus propios mecanismos internos de envejecimiento.
3. *Evasión de los mecanismos de autodestrucción.* En las células sanas, el daño genético por encima de un nivel crítico usualmente activa un programa suicida. Las células cancerosas eluden este mecanismo, aunque a veces algunos agentes del sistema inmune pueden obligar a las células cancerosas a autodestruirse.
4. *Construcción de nuevos vasos sanguíneos.* Los tumores necesitan oxígeno y nutrientes para sobrevivir, que obtienen obligando a que los vasos sanguíneos vecinos formen nuevas ramas que se desarrollen a lo largo de la masa tumoral en crecimiento.
5. *Inmortalidad efectiva.* Las células sanas usualmente no se dividen más de 70 veces, pero las células malignas necesitan un número mayor de divisiones para formar tumores. El envejecimiento celular parece estar relacionado con los telómeros, ubicados a ambos extremos de cada cromosoma. La telomerasa permite mantener la longitud normal de los telómeros solamente en células sexuales, no en el resto de las células del organismo. Sin embargo las células cancerígenas son capaces de desarrollar actividad telomerásica, lo que prácticamente las torna inmortales.
6. *Poder para invadir otros tejidos y extenderse a otros órganos.* Cuando las células cancerosas logran deshabilitar el circuito celular que las confina a una parte específica del órgano en el cual se generaron, se manifiesta la capacidad de invadir los tejidos

cercanos y provocar metástasis en partes lejanas de su ubicación original, lo que le da al cáncer su carácter letal.

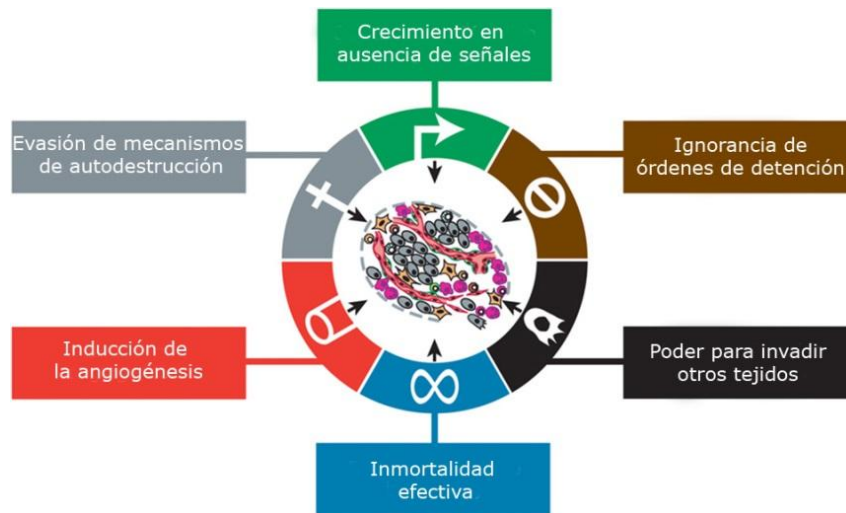


Figura 5.1. Ilustración de las seis principales capacidades desarrolladas por las células cancerígenas (tomado de Hanahan & Weinberg, 2011).

A favor de la manifestación de estas características de las células tumorales juega un rol fundamental la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que facilita su aparición, así como la inflamación, que también fomenta múltiples funciones distintivas. Como resultado del avance conceptual en la última década se han añadido dos nuevas características a las seis capacidades de las células tumorales antes señaladas, involucradas en la patogénesis de algunos y quizás de todos los tipos de cáncer: la *reprogramación del metabolismo energético* y la *capacidad de evadir la destrucción inmune*. La primera de ellas consiste en la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular con el fin de apoyar más eficazmente la proliferación neoplásica. La segunda permite que las células cancerosas puedan evadir la destrucción inmunológica, en particular por linfocitos T y B, macrófagos, y células asesinas naturales (“natural killers”). Por otra parte, la inflamación generada por las células inmunes diseñadas para combatir las infecciones quizás pueda dar apoyo accidental a las múltiples capacidades de las células tumorales. Pero además de las células cancerosas, los tumores muestran otra dimensión de complejidad, ya que poseen un repertorio de “células reclutadas”, ostensiblemente normales pero que contribuyen a la adquisición de los rasgos característicos mediante la creación del microambiente del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

5.2. Epidemiología del cáncer

Como se ha mencionado, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Según un informe del año 2008 de la Agencia Internacional de Investigación sobre

el Cáncer (IARC/WHO, 2008), esta enfermedad produjo 7,6 millones de muertes (alrededor del 13% del total), de las cuales aproximadamente el 70% ocurrieron en países de bajo y medianos recursos. Sin embargo, si se evalúan las tasas estandarizadas por edad (ASR) de muerte por cáncer (excluyendo el cáncer de piel con histología distinta al melanoma) cada 100.000 habitantes, éstas no pueden ser correlacionadas con el nivel de ingreso de los países (Figura 5.2)

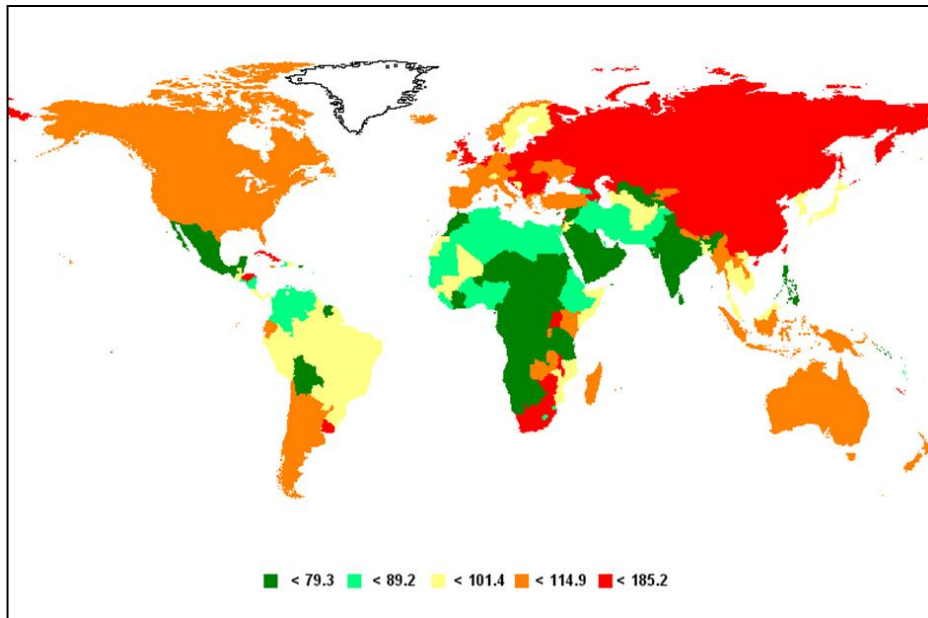


Figura 5.2. Tasa estandarizada por edad (ASR) de mortalidad por cáncer para ambos sexos, cada 100.000 habitantes, distribuidas por países, estimadas en el 2008. Fuente: IARC/WHO, 2008.

Puede verse que Argentina, en relación al resto del mundo, se encuentra en un nivel medio-alto de mortalidad por cáncer. De acuerdo a un estudio de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011), en nuestro país el cáncer representa la segunda causa de muerte (20%), después de las producidas por las enfermedades cardiovasculares (33%). Respecto a la incidencia de cáncer (IARC/WHO, 2008), Argentina ocupa el mismo nivel (medio-alto), según las ASR de incidencia de cáncer cada 100.000 habitantes (Figura 5.3).

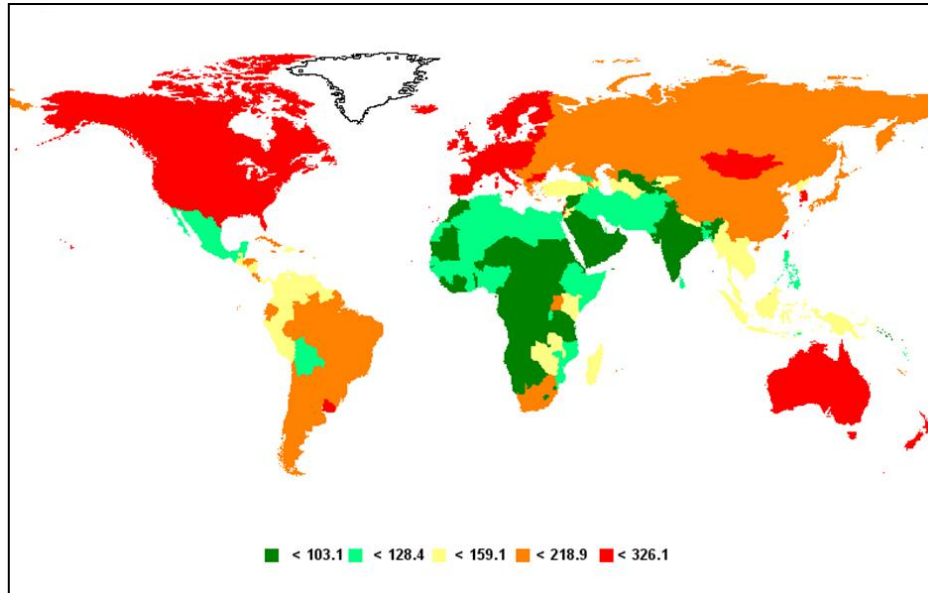


Figura 5.3. Tasa estandarizada por edad (ASR) de incidencia de cáncer para ambos sexos, cada 100.000 habitantes distribuidas por países, estimadas en el 2008. Fuente: Fuente: IARC/WHO, 2008.

5.3. Carcinoma Hepatocelular

Dentro de los distintos tipos de cáncer, el carcinoma hepatocelular (CHC) tiene la séptima ASR de incidencia y la cuarta ASR de mortalidad más alta en el mundo, ambas calculadas al 2008 cada 100.000 habitantes y para ambos sexos, constituyendo la tercer causa de muerte por cáncer. Por su parte en Argentina la ASR de incidencia y de mortalidad ocupan los lugares 16° y 12°, respectivamente, lo cual la ubica en el grupo de países con nivel medio-bajo de incidencia de CHC. Tomando el nivel de ingresos de los países según el Banco Mundial, los países con niveles de ingresos bajo o medio-bajo son los que presentaron una mayor ARS de incidencia de CHC (GHO/WHO, 2008).

5.3.1. Factores de riesgo

La heterogeneidad en la incidencia mundial refleja las variaciones en los principales factores de riesgo de CHC. En Asia oriental y en África subsahariana, el factor de riesgo dominante es la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV), junto con la exposición a la aflotoxina B1, responsables del 80% de los casos de CHC. En cambio en América del Norte, Europa y Japón, el principal factor de riesgo es la infección con el virus de la hepatitis C junto con la ingesta de alcohol (Forner *et al.*, 2012).

En el 70-90% de los pacientes, el CHC se desarrolla dentro de una enfermedad hepática crónica subyacente. La infección crónica con HBV constituye el factor de riesgo más frecuente, el cual se da en más del 50% de los casos con CHC. En pacientes con cirrosis el CHC constituye la principal causa de muerte (Forner *et al.*, 2012). Otros factores

de riesgo son la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la diabetes (Stickel & Hellerbrand, 2010).

5.3.2. Patogénesis molecular

El CHC es un tumor epitelial desarrollado a partir de los hepatocitos. La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo de múltiples pasos durante el cual se alteran varias cascadas de señalización relacionadas con la supervivencia y la proliferación celular, generando un perfil molecular heterogéneo. En más del 50% de los casos de CHC las vías de señalización Ras y del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) son activadas, mientras que en el 40-50% la vía del MTOR (mammalian Target of Rapamycin, complejo sensible a rapamicina) es interrumpida. La vía de señalización del receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF1R) se activó en 20% de los CHC tempranos, mientras que la desregulación de la vía de c-MET y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es un evento común. La vía de señalización Wnt es activada en un tercio de los CHC. La alta vascularización y actividad angiogénica presente en el CHC está asociada a las vías de señalización del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFA), la angiopoyetina 2 (ANGPT2) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Forner *et al.*, 2012).

Las dos mutaciones más frecuentes ocurren en el gen supresor de tumor TP53 (en alrededor del 25-40% de los casos) y en el gen para β catenina, CTNNB1, que se da en aproximadamente el 25% de los casos y predomina en los CHC relacionados con la infección de HCV (Forner *et al.*, 2012).

5.3.3. Tratamiento

A pesar de ser un problema de salud mundial importante, en los últimos decenios no se han producidos avances significativos en el pronóstico de la mayoría de los pacientes (Asgar & Meyer, 2012). La detección temprana y el posterior tratamiento es la única opción para alcanzar una supervivencia sin enfermedad a largo plazo. Un tratamiento precoz efectivo está asociado con una supervivencia media superior a los 5 años (Forner *et al.*, 2012). Existen varios tratamientos que deberán ser elegidos en relación al pronóstico del paciente (Llovet *et al.*, 1999). Sin embargo no existen suficientes estudios clínicos que comparen los distintos tratamientos, principalmente en el caso de pacientes con un estadio temprano de la enfermedad (Forner *et al.*, 2012).

La resección quirúrgica, la ablación y el trasplante tienen potencial curativo y son las opciones terapéuticas en la fase temprana de la enfermedad. Sin embargo, en Occidente y Japón pudieron ser aplicados solamente en un 30% de los pacientes (Llovet *et al.*, 2008). Además, la recurrencia representa un serio inconveniente para la resección y la ablación. Los únicos tratamientos no curativos que proporcionan supervivencia son la

quimioembolización transarterial (TACE), aplicada en pacientes con grandes cánceres o enfermedad multifocal y el Sorafenib, una droga administrada oralmente en pacientes con CHC avanzado (Forner *et al.*, 2012).

5.4. Terapia enzimática sistémica en pacientes con cáncer

Con el propósito de evaluar el beneficio de la administración de mezclas de enzimas proteolíticas tales como tripsina, quimotripsina, papaína o bromelina (terapia enzimática sistémica) como complementaria en pacientes que sufren de cáncer de mama, colorrectal y plasmocitoma, se llevaron a cabo estudios de cohorte que representan el nivel IIB de la medicina basada en evidencia (EBM), aceptados por la Unión Europea para mostrar la seguridad y la eficacia de los tratamientos médicos. Estos estudios demostraron que la terapia enzimática sistémica disminuyó significativamente los efectos secundarios inducidos por el tumor y la terapia, estabilizó la calidad de vida y prolongaron la sobrevida (Beuth, 2008).

En cuanto a la bromelina, existe abundante evidencia de su efecto anti cáncer, especialmente en modelos celulares y animales, así como en ensayos clínicos. Sin embargo, como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer no ha sido objeto de estudios clínicos controlados aleatorios (Chobotova *et al.*, 2010). La actividad anti cáncer es atribuida a la actividad proteolítica de sus proteasas, las cuales permanecen funcionalmente intactas luego de ser absorbidas por el tracto gastrointestinal (Maurer, 2001). La baja toxicidad de la bromelina (Moss *et al.*, 1963) ha permitido la administración oral de dosis altas durante largos períodos y ser bien tolerada (Maurer, 2001; Brien *et al.*, 2004).

5.5. Objetivos

Dentro del objetivo general de evaluar el posible efecto antitumoral de los preparados proteolíticos obtenidos a partir de frutos de *Bromelia hieronymi* (Bh), *B. balansae* (Bb) y *Pseudananas macrodentes* (Pm), así como de bromelina (Bro) se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de Bh, Bb, Pm y Bro sobre la viabilidad de células de hepatocarcinoma humano.
- Evaluar el efecto de Bh, Bb, Pm y Bro sobre la adhesión de células de hepatocarcinoma humano.
- Comparar los efectos medidos de los preparados y de la bromelina en relación a la actividad proteolítica.

5.6. Materiales y métodos

5.6.1. Cultivo celular

Se empleó una línea celular de hepatocarcinoma primario humano, HepG2 C3A (ATCC), la cual fue mantenida en medio esencial Dulbecco con alta glucosa (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado con calor (Natocor, Argentina) al 10% conteniendo 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomocina, a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células fueron incubadas junto al medio de cultivo en policubetas de 96 pocillos durante 24 h a fin de permitir su adhesión.

5.6.2. Tratamientos

Las células crecidas en monocapa a una densidad de 15.000 células/pocillo fueron incubadas en 90 µL del medio de cultivo libre de SFB y 10 µL de la solución del preparado proteolítico. Se ensayaron diferentes concentraciones de cada uno y distintos tiempos de incubación, luego de los cuales se midió la viabilidad y la adhesión celular. Como control se usó buffer fosfato sódico 0,02M, pH 6, el cual a su vez se ensayó frente a agua como control.

Con el objetivo de determinar si los efectos medidos fueron debido a la actividad proteolítica, se hicieron ensayos de adhesión y viabilidad incubando las células con los preparados proteolíticos tratados y no tratados con solución 40 µM de E-64. En estos ensayos el control fue una solución 40 µM de E-64 en buffer fosfato sódico 0,02 M, pH 6.

5.6.2.1. Evaluación de la viabilidad celular (Ensayo con MTS)

La viabilidad celular fue evaluada mediante un ensayo colorimétrico utilizando el kit Cell Titer 96 AQueous Non-Radiactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp., USA). Este ensayo se basa en que el metabolismo de las células viables produce compuestos reductores que pueden reducir un derivado de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS), en presencia de metosulfonato de fenazina (PMS) a formazán, un producto soluble y coloreado (Buttke *et al.*, 1993). Por lo tanto la cantidad de formazán formado será proporcional al número de células viables. El PMS actúa como acoplador de electrones entre el producto metabólico y el MTS.

Luego de los distintos tratamientos 100 µL de MTS y PMS fueron incorporados al cultivo celular y después de incubarlos durante 30 min a 37 °C se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA (Metertech 960), que es considerada como proporcional al número de células viables. Los resultados fueron expuestos como porcentajes de células viables respecto a los controles.

5.6.2.2. Ensayo de adhesión celular (Tinción con cristal violeta)

Luego de la incubación con los distintos preparados proteolíticos el medio de cada pocillo se descartó, a fin de eliminar las células no adheridas, se lavó con solución salina de buffer fosfato (PBS) y se agregó formaldehído al 3,7% durante 15 min a temperatura ambiente para fijar las células adheridas. Posteriormente se incubó con colorante cristal violeta al 0,5% en ácido acético al 3% durante 20 min. Luego se lavó exhaustivamente y se agregó SDS al 1% para disolver el colorante. Finalmente se midió la absorbancia a 600 nm utilizando un lector de ELISA (Metertech 960), que es considerada proporcional al número de células adheridas (Martínez *et al.*, 2004). Los resultados fueron expresados como porcentajes de células adheridas respecto al control.

5.6.3. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en tres ensayos independientes. Los promedios de cada ensayo fueron considerados medidas independientes y las diferencias de las medias de los grupos de tratamiento y del grupo control fueron evaluadas mediante ANOVA seguido del test de Dunnett. Un $p < 0,05$ (*) fue considerado significativo. Los valores son expresados como la media \pm SEM.

5.6.4. Material vegetal ensayado

El contenido proteolítico (UCas/mg) y proteico (μg proteína/mg), así como la actividad específica (UCas/mg proteína) de los extractos utilizados, se presenta en la Tabla 5.1.

Liofilizados	UCas/mg	μg proteína/mg	UCas/mg proteína
Bh	0,27 \pm 0,05	27 \pm 2	10
Pm	0,14 \pm 0,01	33 \pm 3	4,2
Bb	0,15 \pm 0,01	11 \pm 1	14
Bromelina (Sigma Aldrich)	0,65 \pm 0,02	209 \pm 2	3,1

Tabla 5.1. Contenido proteolítico (UCas/mg), proteico (μg proteína/mg) y actividad específica (UCas/mg proteína) de los extractos ensayados. UCas: unidades caseinolíticas (pH 7,5 y 37°C). Media \pm DE.

Para todos los ensayos las soluciones de los extractos fueron preparadas por resuspensión de los liofilizados en agua destilada, mientras que la bromelina fue redisuelta en buffer fosfato sódico 0,02 M de pH 6.

5.7. Resultados y discusión

5.7.1. Ensayo de viabilidad

En la Figura 5.4 se exponen los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad, donde pueden verse los porcentajes de células HepG2 viables luego de incubarlas durante 24 y 48 h con concentraciones crecientes de bromelina, Bh, Bb y Pm.

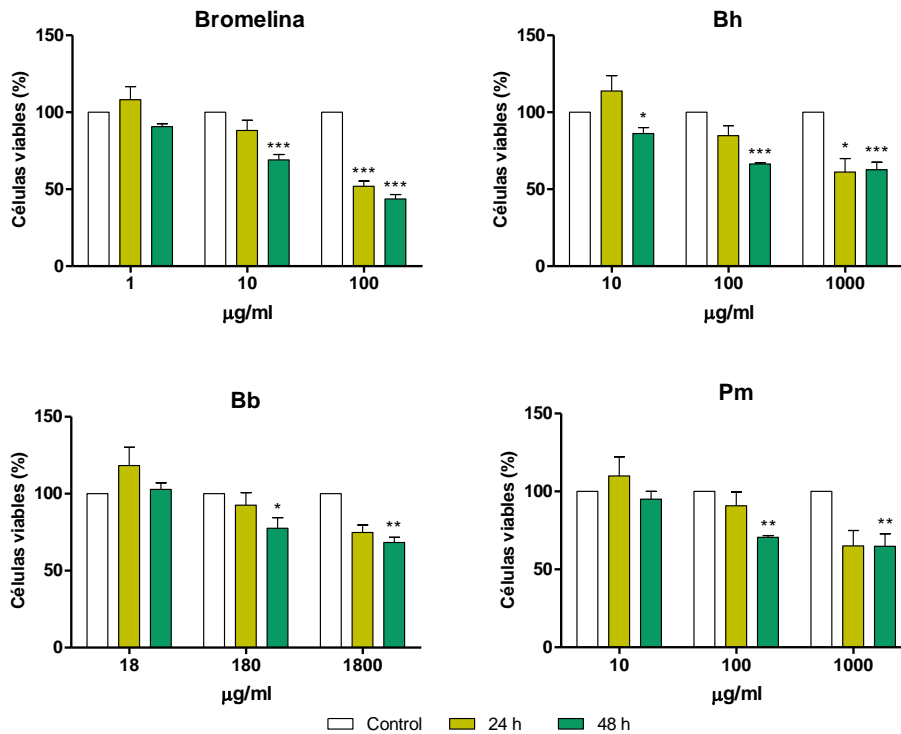


Figura 5.4. Viabilidad de células HepG2. Media \pm SEM. Resultados test de Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Las concentraciones se refieren al volumen final del medio de incubación. Control: buffer fosfato sódico, 0,002 M, pH 6.

Puede observarse que todos los preparados fueron capaces de disminuir la viabilidad de las células HepG2 a las 48 h de incubación. La bromelina fue la más efectiva, ya que por un lado produjo disminución significativa con 10 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que Bh, Bb y Pm requirieron una concentración de un orden de magnitud superior para mostrar un efecto similar; por otro lado fue la que mostró menos % de células viables ($\approx 40\%$ frente al 65% de los preparados) para las mayores concentraciones ensayadas. A las 24 h de incubación, si bien las concentraciones más altas de Bb y Pm disminuyeron el porcentaje de células viables (75 y 71%, respectivamente) no fueron significativos, mientras que sí lo fueron los porcentajes de 100 $\mu\text{g/mL}$ de bromelina y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Bh (52 y 61%, respectivamente).

5.7.2. Ensayos de adhesión

En la Figura 5.5 se exponen los resultados del ensayo de adhesión celular de las células HepG2 luego de incubarlas durante 1, 24 y 48 h con concentraciones crecientes de bromelina, Bh, Bb y Pm. En la Figura 5.6 se muestran microfotografías de las células HepG2

luego de incubarlas durante 24 h con las concentraciones intermedias de bromelina, Bh, Bb y Pm.

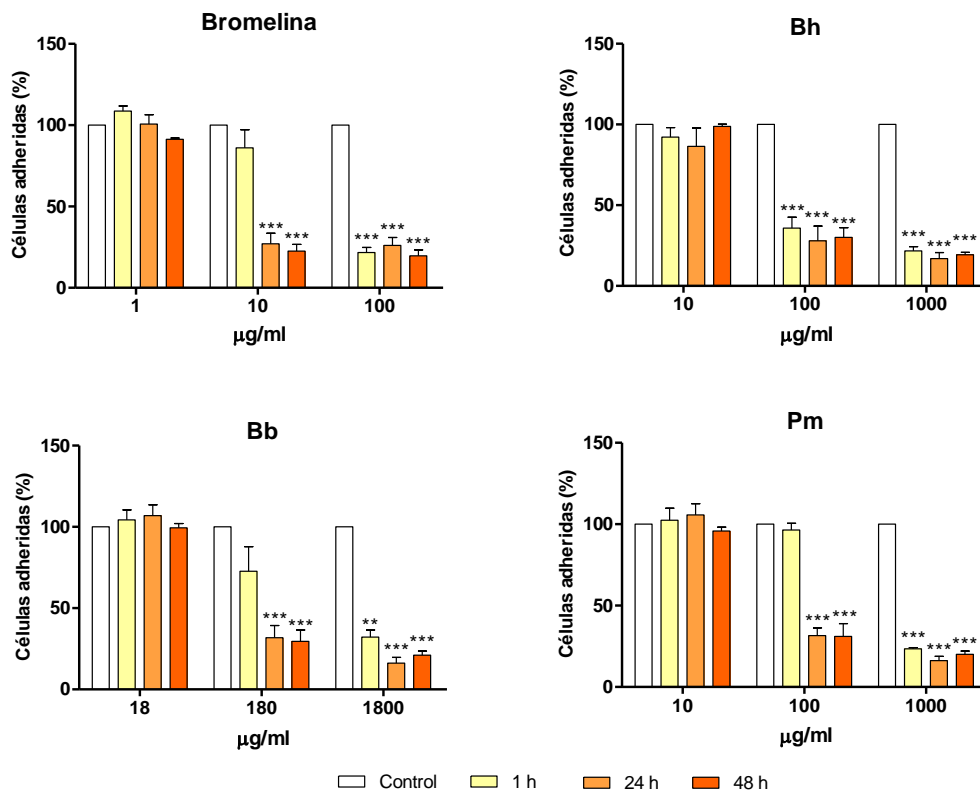


Figura 5.5. Adhesión celular de células HepG2. Media \pm SEM. Resultados test de Dunnett: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Las concentraciones se refieren al volumen final del medio de incubación. Control: buffer fosfato sódico, 0,002 M, pH 6.

Todos los preparados tuvieron efecto sobre la adhesión celular. Se observó una eliminación de la adhesión de las monocapas celulares a la superficie plástica de los pocillos. Las células en suspensión adoptaron una forma redondeada. Desde la primera h de incubación y para las mayores concentraciones ensayadas (100 µg/mL de bromelina, 1000 µg/mL de Bh y de Pm y 1800 µg/mL de Bb) se observaron los porcentajes de adhesión más bajos (entre un 15 y un 30%), los cuales no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$; Tukey) respecto de los de las 24 y 48 h siguientes de incubación. Tal como sucedió en los ensayos de viabilidad, bromelina requirió una concentración de un orden de magnitud inferior a la de las demás preparaciones para lograr el mismo efecto sobre la adhesión.

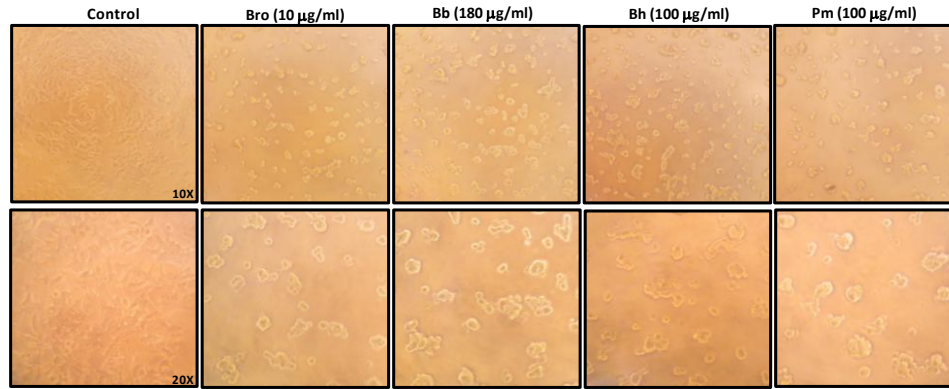


Figura 5.6. Microfotografías de campo claro representativas de células HepG2 luego de incubarlas durante 24 h con los preparados proteolíticos. Las concentraciones se refieren al volumen final del medio de incubación. Control: buffer fosfato sódico, 0,002 M, pH 6.

Si se comparan los porcentajes de células adheridas con los porcentajes de células viables puede observarse que las disminuciones significativas en la viabilidad ocurren 24 h después de una disminución significativa en la adhesión, excepto para 100 µg/mL de Bh, indicando que la pérdida de adhesión conlleva una pérdida de la viabilidad. La concentración de 100 µg/mL de Bh mostró un menor porcentaje de células adheridas (36%) respecto al control a 1 h de incubación que no fue seguida de una disminución significativa de células viables (85%) a las 24 h de incubación. Por otro lado, 10 µg/mL de Bh a las 48 h de incubación mostró un porcentaje de células viables (85%) que resultó ser una disminución significativa mientras que el porcentaje de células adheridas 24 h antes (85%) no lo fue; sin embargo no parece ser concluyente que la disminución de la viabilidad no sea precedida por una disminución de la adhesión en dicho caso, si se toman en cuenta los valores porcentuales absolutos de adhesión y viabilidad.

5.7.3. Efecto de la actividad proteolítica sobre los porcentajes de viabilidad y de adhesión celular

Como se mencionó en la introducción, el efecto antitumoral de bromelina es atribuido preponderantemente a la actividad de sus proteasas (Salas *et al.*, 2008; Chobotova *et al.*, 2010). Con el fin de determinar si los efectos sobre la viabilidad y adhesión celular medidos tienen relación con la actividad proteolítica de los preparados, se determinaron los porcentajes de viabilidad y de adhesión de los mismos, tratados y no tratados con E-64. Se usaron las concentraciones de Bromelina, Bh, Bb y Pm que mostraron mayores efectos (100, 1000, 1800 y 1000 µg/mL, respectivamente) a las 24 y 48 h de incubación (Figura 5.7)

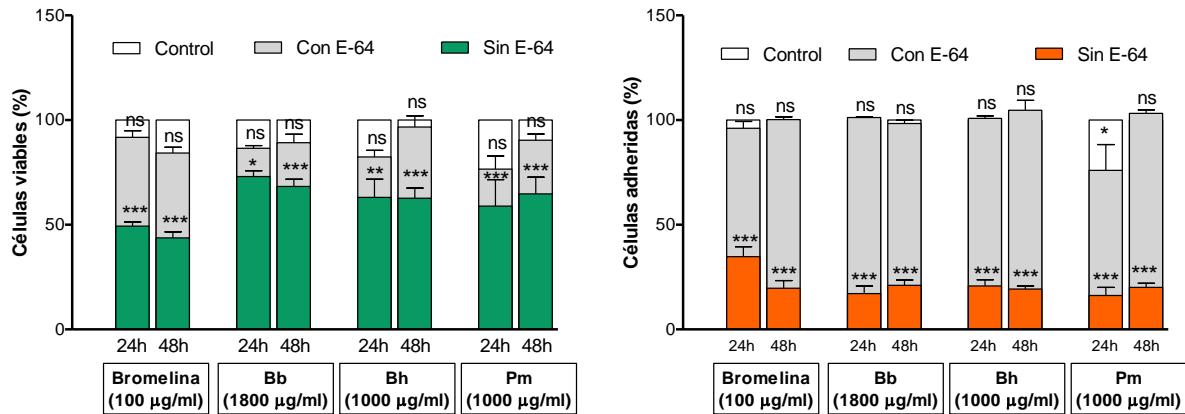


Figura 5.7. Efecto de la inhibición de las proteasas sobre su acción reductora de la viabilidad y la adhesión de células HepG2. Media \pm SEM. Resultados test de Dunnett: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, no significativo. Las concentraciones se refieren al volumen final del medio de incubación. Control: 4 μ M de E-64 en buffer fosfato sódico, 0,002 M, pH 6

Puede observarse que los preparados tratados con E-64 no tuvieron efecto significativo sobre la viabilidad como tampoco sobre la adhesión celular a las 24 y 48 h de incubación, salvo la concentración de 1000 μ g/mL de Pm, para la cual se observó una disminución significativa en el porcentaje de células adheridas (76%) a las 24 h, que sin embargo es significativamente superior ($p < 0,001$; test de Tukey) al porcentaje de adhesión de Pm activo proteolíticamente (16%).

Puede concluirse que el efecto sobre la viabilidad y la adhesión celular de bromelina, Bh y Bb a las 24 y 48 h de incubación y de Pm a las 48 h, sería debido a la actividad proteolítica de sus cisteínendopeptidasas.

A fin de realizar una comparación entre los distintos preparados en relación a su actividad proteolítica, en la Tabla 5.2 se exponen los porcentajes de células viables (%V) y de células adheridas (%A) luego de 48 h de incubación en función del contenido de unidades caseinolíticas (UCas/mL) de las concentraciones ensayadas para bromelina, Bh, Bb y Pm.

Preparado proteolítico	UCas/mL ($\times 10^{-3}$)	% V	% A
Bromelina	0,65 \pm 0,02	91 \pm 2	91 \pm 1
	6,5 \pm 0,2	69 \pm 4***	23 \pm 4***
	65 \pm 2	44 \pm 3***	20 \pm 4***
Bh	2,7 \pm 0,5	86 \pm 4*	99 \pm 1
	27 \pm 5	66 \pm 1***	30 \pm 6***
	270 \pm 25	63 \pm 5***	19 \pm 2***
Bb	2,7 \pm 0,2	103 \pm 4	99 \pm 3
	27 \pm 2	78 \pm 7*	30 \pm 7***
	270 \pm 20	68 \pm 3**	21 \pm 2***
Pm	1,4 \pm 0,1	95 \pm 5	96 \pm 2
	14 \pm 1	70 \pm 1**	31 \pm 8***
	140 \pm 10	65 \pm 8**	20 \pm 2***

Tabla 5.2. Porcentajes de células viables (%V) y de células adheridas (%A) en relación con la actividad proteolítica (UCas/mL) de bromelina, Bh, Bb y Pm luego de incubar células HepG2 durante 48 h. Media \pm SEM. Resultados test de Dunnett: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Se puede observar que bromelina requiere menos actividad proteolítica que los demás preparados para mostrar efectos similares, hecho que podría deberse a que las proteasas de bromelina actúan conjuntamente mostrando una mayor especificidad hacia sustratos relacionados con la viabilidad y la adhesión celular presentes en las células de HepG2 que las proteasas presentes en Bh, Bb y Pm. A su vez, Bh y Bb fueron menos activas que Pm.

La carcinogénesis hepática está asociada, en parte, a un cambio en el perfil de las integrinas expresadas en la superficie del hepatocito, las cuales juegan un papel fundamental en la adhesión y la migración celular contribuyendo al crecimiento y la invasión del tumor (Nejjari *et al.*, 1999; Massini, 2007). Así, los bajos porcentajes de adhesión de células de HepG2 luego de tratarlas con bromelina, Bh, Bb y Pm permite suponer que resultarán efectivas para inhibir el crecimiento tumoral en CHC. Además abre un abanico de posibles ensayos a realizar a fin de determinar cuáles serían las proteínas superficiales blanco para cada una de los preparados proteolíticos.

En este sentido es importante mencionar que uno de los mecanismos por el cual la bromelina ejercería efecto antitumoral es su capacidad para clivar proteínas de la superficie celular. CD44, un marcador de superficie presente en células inmunes y tumorales y que está asociado con el crecimiento tumoral y la metástasis, mostró ser sensible a la bromelina en líneas tumorales murinas y humanas, resultando en una reducción de la invasión y adhesión al sustrato (Chobotova *et al.*, 2010). Fastuosaína, otra proteasa cisteínica aislada

de frutos de *Bromelia fastuosa*, resultó activa frente a CD44 en células de melanoma murino (Guimarães-Ferreira *et al.*, 2007). En un modelo de melanoma murino, la mezcla de papaína, tripsina y quimotripsina redujo la expresión de CD44 y CD45 en el tumor, lo cual fue correlacionado con la supresión del melanoma y la metástasis (Wald *et al.*, 2001). Por tanto, dado que las células HepG2 expresan CD44 en su superficie se podría sugerir que bromelina, así como también, Bh, Bb y Pm podrían ejercer sus efectos a través de esta proteína, además de las integrinas.

La disminución de la viabilidad celular de HepG2 observada para los preparados proteolíticos constituye un paso inicial hacia la búsqueda de los posibles mecanismos que la estarían mediando. Determinar si ha habido arresto celular, inducción de apoptosis, así como cuáles son las vías de señalización involucradas, si bien no han sido objetivos de esta tesis se muestran como prometedores temas para futuros estudios. En este sentido existe evidencia de la capacidad de bromelina para inducir activadores de la apoptosis (p53 y Bax) en papiloma cutáneo en ratón, así como reducir la actividad de reguladores de la supervivencia celular como Akt y Erk, esta última de forma contexto celular dependiente (Chobotova *et al.*, 2010); en células de melanoma y carcinoma epidérmico humano ha promovido el arresto del ciclo celular en la fase G₂/M conduciéndolas a apoptosis (Bhui *et al.*, 2011).

En la Tabla 5.2 puede observarse que un aumento en 10 veces de la concentración de bromelina produjo un cambio importante en el porcentaje de células viables (de 69% a 44%), mientras el porcentaje de adhesión permanece aproximadamente constante (20%), lo cual estaría indicando que la bromelina podría afectar la viabilidad celular independientemente de la alteración de la adhesión celular. Esto es diferente a lo observado en células de glioblastoma humano, donde una reducción en la adhesión, la migración y la invasión, asociada con la reducción de la integrina $\alpha_3\beta_1$ y el CD44 en la superficie celular no fue acompañada por una disminución de la viabilidad (Tysnes *et al.*, 2001). La aparente diferencia en el efecto de la bromelina sobre células tumorales humanas podría reflejar una especificidad de acción, lo cual podría hacerla más eficiente como tratamiento frente a algunos tipos de cáncer que de otros, hecho que hace necesario el estudio sobre mayor número de líneas celulares tumorales humanas (Chobotova *et al.*, 2010).

La bromelina no ha sido probada frente a células de HepG2, así como tampoco Bh, Bb y Pm, para los cuales estos resultados son los primeros en relación a la búsqueda de posibles efectos antitumorales. Si bien queda una serie de aspectos por investigar (mecanismos de acción, efectos sobre el crecimiento tumoral y metástasis, capacidad migratoria, citotoxicidad, etc), el presente trabajo constituye un indicio de los potenciales efectos terapéuticos de proteasas cisteínicas frente al carcinoma hepatocelular.

5.8. Conclusiones

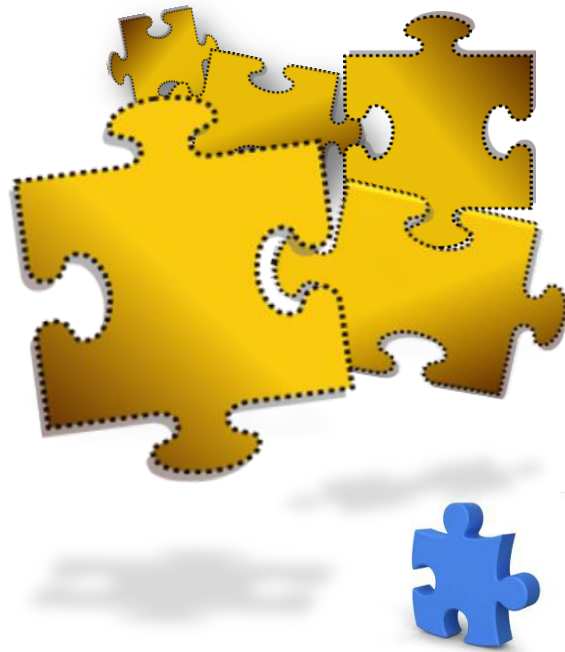
- Extractos ricos en cisteinendopeptidasas de *Bromelia hieronymi* (Bh), *B. balansae* (Bb) y *Pseudananas macrodentes* (Pm) mostraron efecto reductor de la viabilidad y la adhesión de células de carcinoma hepatocelular (HepG2).
- Bh, Bb y Pm tuvieron efectos similares en relación al contenido de unidades caseinolíticas, siendo menores a los mostrados por bromelina.
- Bh, Bb y Pm al igual que bromelina perdieron la acción reductora de viabilidad y adhesión celular al inhibir la actividad de las cisteinendopeptidasas.
- Nuevos estudios son necesarios para profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en los efectos medidos, así como para encontrar otras acciones que resulten beneficiosas para la terapia de CHC.

5.9. Referencias

- Asghar, U. & T. Meyer (2012) Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *Journal of Hepatology* **56**: 686-695.
- Beuth, J. (2008) Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? *Integrative Cancer Therapies* **7**: 311-316.
- Bhui, K., S. Tyagi, A.K. Srivastava, M. Singh, P. Roy, R. Singh & Y. Shukla (2012) Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G2/M arrest to apoptosis. *Molecular carcinogenesis*, **51**: 231-243.
- Brien, S., G. Lewith, A. Walker, S.M. Hicks & D. Middleton (2004) Bromelain as a treatment for osteoarthritis: a review of clinical studies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **1**: 251-257.
- Buttke, T.M., J.A. McCubrey & T.C. Owen (1993) Use of an aqueous soluble tetrazolium /formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of immunological methods* **157**: 233-240.
- Chobotova, K., A.B. Vernallis & F.A.A. Majid (2010) Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer letters* **290**: 148-156.
- Forner, A., J.M. Llovet & J. Bruix (2012) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. **379**: 1245-1255.
- GHO/WHO (2008) Cancer mortality and morbidity. Global Health Observatory (GHO), World Health Organization. Disponible en <http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html>.
- Gibbs, W.W. (2003) Untangling the Roots of Cancer. *Scientific American* **289**: 48-57.
- Guimarães-Ferreira, C.A, E.G. Rodrigues, R.A. Mortara, H. Cabral, F.A. Serrano, R. Ribeiro-dos-Santos & L.R. Travassos (2007) Antitumor Effects *In Vitro* and *In Vivo* and Mechanisms of Protection against Melanoma B16F10-Nex2 Cells By Fastuosain, a Cysteine Proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia* **9**: 723-733.
- Hahn, W.C. & R.A. Weinberg (2002) Rules for making human tumor cells. *New England Journal of Medicine* **20**: 1593-1603.
- Hanahan, D. & R.A. Weinberg (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-74.
- IARC/WHO (2008) *GLOBOCAN 2008. Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008*. Disponible en <<http://globocan.iarc.fr>>.
- Llovet, J.M., C.Brú & J. Bruix (1999) Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Seminars in liver disease*. **19**: 329-338.
- Llovet, J.M., A.M. Di Bisceglie, J. Bruix, B.S. Kramer, R. Lencioni, A.X. Zhu, M. Sherman *et al.* (2008) Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **100**: 698-711.
- Martínez, V.G., E.H. Pellizzari, E.S. Díaz, S.B. Cigorraga, L.Lustig, B.Denduchis, C.Wolfenstein-Todel & M.M. Iglesias (2004) Galectin-1, a cell adhesion modulator, induces apoptosis of rat Leydig cells in vitro. *Glycobiology* **14**: 127-137.
- Massini, M. & L. Conti Devirgiliis (2007) Adhesion to the extracellular matrix is positively regulated by retinoic acid in HepG2 cells. *Liver International* **27**: 128-136.

- Maurer, H.R. (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1234-1245.
- Moss, I.N. C.V. Frazier & G.J. Martin (1963) Bromelain: the pharmacology of the enzymes. *Archives of International Pharmacodnamy Therapy* **145**: 166-189.
- Nejjari, M., Z. Hafdi, J. Dumortier, A.F. Bringuier, G. Feldmann & J.Y. Scoazec (1999) $\alpha6\beta1$ integrin expression in hepatocarcinoma cells: Regulation and role in cell adhesion and migration. *International Journal of Cancer* **83**: 518-525.
- Salas, C.E., M.T.R. Gomes, M. Hernandez & M.T.P. Lopes (2008) Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry* **69**: 2263-2269.
- Stickel, F. & C. Hellerbrand (2010) Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for hepatocellular carcinoma: mechanisms and implications. *Gut* **59**: 1303-1307.
- Tysnes, B.B., H.R. Maurer, T. Porwol, B. Probst, R. Bjerkvig & F. Hoover (2001) Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells. *Neoplasia* **3**: 469-479.
- Wald, M., T. Olejár, V. Šebková, M. Zadinová, M. Boubelík & P. Poučková (2001). Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **47**: S16-S22.
- WHO (2011) *World Health Organization - NCD Country Profiles, 2011*. Disponible en <http://www.who.int/nmh/countries/arg_en.pdf>.

6. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS



El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral fue estudiar la posible aplicación farmacológica de extractos de tres especies vegetales pertenecientes a la familia Bromeliaceae: *Bromelia hieronymi* Mez, *Bromelia balansae* Mez y *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms, autóctonas del área que abarca el NEA y NOA, Paraguay, Brasil, Bolivia y Colombia. Las tres especies habían sido previamente estudiadas en el LIProVe desde el punto de vista bioquímico, habiéndose aislado y caracterizado diversas endopeptidasas cisteínicas a partir de sus frutos.

A excepción del uso en medicina popular de *B. balansae* para calmar la tos, no existen referencias sobre aplicaciones medicinales de las especies mencionadas. Sin embargo es abundante la información sobre las propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, inmunomoduladoras y antitumorales de la bromelina, un extracto acuoso obtenido a partir del ananá [*Ananas comosus* (L.) Merr.], especie también perteneciente a la familia Bromeliaceae y rica en endopeptidasas cisteínicas, a las que se atribuyen las actividades farmacológicas citadas. Por este motivo, se decidió estudiar los efectos antiinflamatorios, antitumorales, anticoagulantes, fibrinolíticos y fibrinogenolíticos de extractos acuosos parcialmente purificados por precipitación etanólica, obtenidos a partir de frutos de *B. hieronymi* (Bh), *B. balansae* (Bb) y *P. macrodontes* (Pm), en relación a la actividad proteolítica de los mismos.

En base a los estudios realizados se ha arribado a las siguientes conclusiones:

- **Bh, Bb y Pm mostraron efecto antiinflamatorio en modelos animales de inflamación aguda al ser administradas intraperitonealmente.**

En el modelo de inflamación aguda ensayado (edema de pata de rata inducida por carragenina), dosis equivalentes en actividad proteolítica (≈ 30 UCas/kg) de Bh, Pm y bromelina mostraron efectos antiinflamatorios significativamente similares a 10 mg/kg de indometacina. El efecto antiinflamatorio medido para Bb fue menor y en algunos ensayos fue acompañado de signos de toxicidad.

El efecto antiinflamatorio medido en este modelo fue dependiente de la actividad caseinolítica (UCas) de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb y bromelina, mientras que sólo parcialmente de las de Pm, quedando por determinar si la actividad fibrinolítica de Pm es causal del efecto antiinflamatorio medido para 0 UCas/kg de Pm.

Los efectos antiinflamatorios de Bh, Bb, Pm y bromelina alcanzaron los máximos valores entre las 5 y las 7 h de inducido el estímulo inflamatorio, tiempos en que se alcanza el máximo valor de inflamación. Teniendo en cuenta los mediadores involucrados en dicha fase del modelo, sería posible que las proteasas cisteínicas de Bh, Bb y Pm ejercieran su acción sobre la COX/PGs, la NOS/NO y la infiltración/actividad de los neutrófilos, para cuya confirmación deberían orientarse futuras investigaciones sobre el mecanismo de acción de las mismas en los efectos antiinflamatorios observados.

Si bien en una magnitud menor, dosis de ≈ 30 UCas/kg de Bh, Pm y bromelina también fueron efectivas como antiinflamatorios en el modelo de edema de pata de rata inducido por serotonina, no mostrando efecto significativo sobre el edema inducido por histamina.

- **Mediante el modelo de inflamación crónica en ratas, test del granuloma inducido por pellet de algodón, se observó un significativo efecto antiinflamatorio de Pm y bromelina al ser administradas intraperitonealmente, mientras que para Bh y Bb no se obtuvieron resultados concluyentes.**

Dado que una dosis de ≈ 10 UCas/kg de Pm mostró un efecto antiinflamatorio equivalente al de una dosis de ≈ 30 UCas/kg de bromelina y que ambos efectos fueron dependientes de la actividad proteolítica (UCas), las proteasas cisteínicas de Pm mostrarían una mayor especificidad que las de bromelina frente a los efectores proinflamatorios.

Si bien los efectos antiinflamatorios de Pm y bromelina fueron significativamente menores o similares al de dexametasona (3 mg/kg), a las dosis ensayadas no mostraron efectos adversos típicos de glucocorticoides tales como la pérdida de masa corporal y reducción del peso del bazo, causando significativa reducción del peso del timo pero entre 3 y 4 veces menos que la dexametasona (3 mg/kg).

Los efectos antiinflamatorios medidos para dosis de ≈ 30 UCas/kg de Bh y de Bb no fueron reproducibles en posteriores ensayos.

La acción antiinflamatoria medida en el modelo del granuloma para todos los preparados proteolíticos fue acompañada de un significativo y leve efecto reductor del peso del timo, el cual a su vez fue dependiente de la actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas de Pm y bromelina. Dilucidar si este hecho es indicativo de un mecanismo subyacente de la acción antiinflamatoria o es un efecto independiente de los preparados proteolíticos podría ser objeto de futuras investigaciones.

- **Bh, Bb y Pm actuaron como anticoagulantes, fibrinogenolíticas y fibrinolíticas.**

Bh, Bb y Pm prolongaron los tiempos de protrombina (TP) y de tromboplastina parcial activada (TTPa) de plasma humano en ensayos *in vitro*, además de alterar la consistencia de los coágulos formados respecto de un plasma no tratado con los preparados. Ambos efectos fueron totalmente dependientes de la actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas, excepto los efectos de Bb sobre el TP y el TTPa y de Pm sobre el TTPa los cuales dependieron parcialmente de las cisteínendopeptidasas, sugiriendo la presencia de otros componentes anticoagulantes.

El hecho de que una actividad proteolítica (UCas) equivalente de bromelina Bh, Bb y Pm no produjera efectos anticoagulantes equivalentes da cuenta de las diferentes especificidades con las que actuaría cada preparado sobre los distintos elementos del sistema de coagulación.

En los ensayos *In vivo*, si bien dosis con equivalente actividad proteolítica (65 UCas/kg) de todos los preparados administrados intraperitonealmente prolongaron el TP y el TTPa, sólo Bb prolongó levemente el TP en forma estadísticamente significativa mostrando un valor de TP significativamente similar al de la bromelina.

El efecto sobre el fibrinógeno fue equivalente, cuali y cuantitativamente, para equivalentes actividades caseinolíticas (UCas) de Bh, Bb, Pm y bromelina, siendo la subunidad A α del fibrinógeno la más susceptible de ser clivada, lo cual podría explicar la alteración de la consistencia del coágulo observada en los ensayos de medida de TP y TTPa.

Como agentes fibrinolíticos, Bh, Bb y Pm tuvieron un comportamiento similar y significativamente diferente al de bromelina, la cual a su vez mostró un comportamiento significativamente similar a la plasmina. A equivalentes valores de actividad caseinolítica (UCas), la bromelina mostró mayor especificidad que Bh, Bb y Pm frente a la fibrina respecto a los componentes de la cascada de la coagulación.

Los efectos fibrinogenolítico, anticoagulante y fibrinolítico medidos para Bh, Bb y Pm los ubica como potenciales agentes antitrombóticos o trombolíticos, lo cual deberá ser evaluado en modelos de trombosis. Las relaciones establecidas entre dichos efectos y el contenido proteolítico de los preparados podrán ser de utilidad al momento de establecer dosis así como interpretar resultados en futuros ensayos de trombosis.

En relación a la acción antiinflamatoria, la actividad fibrinolítica de Bh, Bb y Pm puede contribuir al mecanismo de acción anti-edema evaluado *in vivo*, hecho que ya ha sido corroborado para bromelina, en tanto que para Bh, Bb y Pm ello queda supeditado a futuras investigaciones dirigidas a dilucidar los mecanismos subyacentes a los efectos antiinflamatorios medidos.

- **Bh, Bb, Pm y bromelina disminuyeron significativamente la viabilidad y la adhesión de células de carcinoma hepatocelular (HepG2).**

Los efectos sobre la viabilidad y la adhesión dependieron de la actividad proteolítica de las proteasas cisteínicas de Bh, Bb, Pm y bromelina, siendo las proteasas de bromelina las más específicas en relación a las de Bh, Bb y Pm.

Estos resultados abren camino a futuros ensayos dirigidos, no sólo a estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales Bh, Bb, Pm y bromelina afectarían las células de HepG2, sino también para evaluar los efectos sobre otros modelos más complejos.

Los efectos antiinflamatorios así como anticoagulantes y fibrinolíticos de Bh, Bb y Pm constituyen cualidades con potenciales efectos terapéuticos en el tratamiento sistémico del cáncer, delineando otra posible línea de investigación futura.

En síntesis, el presente trabajo ha pretendido aportar información novedosa acerca de la posible importancia farmacológica de principios activos, en este caso proteasas de tipo cisteínico, presentes en plantas que crecen en nuestro país y que podrían enriquecer el no demasiado extenso acervo de fitofármacos en uso en este momento. Por tratarse de resultados preliminares será necesario, en caso de resultar de interés, la realización de estudios posteriores y de mayor complejidad que confirmen el potencial farmacológico de los preparados estudiados, en el marco de la seguridad en cuanto a los riesgos toxicológicos que pueda presentar el uso de los mismos.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de La Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido realizar mis estudios de grado y posgrado

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por brindarme las becas para la realización del presente Trabajo de Tesis

Al LIProVe y en especial al Dr Néstor O. Caffini por ofrecerme el Lugar de Trabajo, por su predisposición para ayudarme y enorme paciencia para enseñar

A la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación de La Nación, que a través del Programa Inter-U me brindó los medios económicos para los viajes a San Luis, donde realicé parte del trabajo experimental aquí presentado

A Verónica Lázaro, quien actuó eficientemente en la gestión del Programa Inter-U dentro de La Facultad de Ciencias Exactas de La Universidad Nacional de La Plata

A la Dra Alejandra E. Rotelli, mi codirectora de beca, por la enseñanza y dirección de los ensayos con modelos animales así como por la colaboración en la realización de los mismos en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis

A la Dra María Fernanda Troncoso, por la enseñanza y colaboración en la realización de los ensayos con células tumorales en el IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y por la corrección del capítulo "Efecto antitumoral"

A la Bioq Mariana Marta Gonzalez, de la Cátedra de Hematología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por la enseñanza y colaboración en los ensayos de coagulación y en la obtención de los pooles de plasma

A la Bioq Anabela Prospitti, por la colaboración en la obtención de los pooles de plasma

A los Dres Mariana Gomez y Pastor Arenas, quienes muy amablemente nos proporcionaron material bibliográfico en relación a los usos de las bromeliáceas en nuestro país

A los Dres Mariela Bruno y Marcelo Pardo, quienes me enseñaron los primeros pasos en las técnicas y metodologías para el estudio de las proteasas vegetales

En el plano afectivo:

A M. Fernanda Troncoso, por toda su predisposición y calidez humana

A Mariana y Susana, por la buena onda y el compañerismo durante las mañanas en el laboratorio de Hematología

A los integrantes de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, en especial a Graciela, Américo, Alejandra, Lily, Susana, Mariano y muy especialmente a Ale, por la calidez humana, el buen humor, los brindis y las cenas, los paseos por el surrealismo puntano y los mates frente al arroyo

A los integrantes (algunos ex) del LIProVe; en especial a Cacho (Caffini), Ana (Prospitti), Jose (Torres), Ine (Martin), Martín (Lazza), Euge (Tavarone), Sú (Morcelle del Valle), Celes (Branda), Franco (Bernabei), Claudia (Natalucci) y Laura (Lopez), por los tiempos compartidos, el "soporte" en momentos difíciles, el buen humor y el compañerismo. Gracias por la paciencia Cacho!

A Meli, Ana y Guille, por simplemente COMPARTIR

A mis viejos, mis hermanos, a Alfon y Ernes, por lo que aprendí y volví a aprender, por las risas y los abrazos

A Leo, por el aguante (PA' CIENCIA), los horizontes (se hicieron anchos) y la certeza de que las palabras no me alcanzarán

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido objeto de las siguientes publicaciones y/o comunicaciones en reuniones científicas:

Publicaciones

- ✓ Errasti, M. E., Caffini, N. O., Pelzer, L. E., & Rotelli, A. E. (2013). "Anti-inflammatory Activity of *Bromelia hieronymi*: Comparison with Bromelain", *Planta Medica* **79**: 207-213.
- ✓ María E. Errasti, Néstor O. Caffini, Lilian E. Pelzer, and Alejandra E. Rotelli (2013) "Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms fruit extract (Bromeliaceae) in rats" *Zeitschrift für Naturforschung C* (aceptado y en proceso de revisión)

Comunicaciones en reuniones científicas

- ✓ Errasti, ME.; Bruno, MA.; Rotelli, AE.; Caffini, NO.; Pelzer, LE. "Antiinflammatory activity of a partially purified extract from *Bromelia hieronymi* fruits" XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Rosario, Santa Fe, Argentina, 24 al 26 de Noviembre de 2009.
- ✓ Errasti, ME.; Caffini, NO.; Rotelli, AE.; Pelzer, L. "Acción antiinflamatoria de un extracto de frutos de *Bromelia hieronymi* en un modelo de inflamación crónica en ratas". XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 17 al 20 de Noviembre de 2010.
- ✓ Errasti, ME.; Rotelli, AE.; González, MM. "Evaluación *in vitro* de la acción fibrinolítica y sobre la coagulación sanguínea de extractos de *Bromeliaceas*". XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), Tucumán, Argentina, 2 al 4 de Noviembre de 2011.
- ✓ Errasti, ME.; Caffini, NO.; Rotelli, AE.; Pelzer, L. "Extractos de *Pseudananas macrodontes* y *Bromelia balansae* con acción antiinflamatoria en un modelo de inflamación crónica en ratas". XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Tucumán, Argentina, 2 al 4 de Noviembre de 2011.
- ✓ Errasti, ME.; Caffini, NO.; Pelzer, LE.; Rotelli, AE. "Relación entre efecto antiinflamatorio y acción proteolítica de extractos de *Bromeliaceas*". XLIV Reunión

Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mendoza, Argentina, 31 de Octubre al 2 de Noviembre de 2012.

- ✓ Errasti, ME.; Caffini, NO.; Troncoso, MF. "Acción de extractos de *Bromeliaceas* sobre la adhesión y viabilidad de células de carcinoma hepatocelular". XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mendoza, Argentina, 31 de Octubre al 2 de Noviembre de 2012.