

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DE *BROWNEA ARIZA* BENTHAM (CAESALPINIACEAE)

EVALUATION OF THE CLOTTING ACTIVITY FROM *BROWNEA ARIZA* BENTHAM (CAESALPINIACEAE)

Rita Márquez-Vizcaíno¹, Catalino de la Rosa², Emilio J. Arrieta-García¹, Juan Villalba-Uparela¹

Resumen

Extractos de *Brownea ariza* Bentham (Caesalpinaceae) fueron activos para promover la coagulación sanguínea de una manera dependiente de la dosis; el mecanismo de acción podría involucrar los procesos mediados por el ión calcio.

Palabras clave: *Brownea ariza*, extractos, coagulación, tromboplastina.

Abstract

Extracts of *Brownea ariza* Bentham (Caesalpinaceae) were active to promote blood coagulation in a doses dependent manner; the mechanism of action could involve processes mediated by calcium ion.

Key words: *Brownea ariza*, extracts, coagulation, tromboplastine.

INTRODUCCIÓN

Brownea ariza Bentham, incluida en las leguminales y en la familia Caesalpinaceae, es un árbol de copa redondeada de alrededor de 9 m de alto, cuyas hojas son alternas paripinnadas e inflorescencias en racimos semiesféricos que pueden ser axilares o terminales; la legumbre que presenta es comprimida de un largo de 14 a 18 cm, aproximadamente. Este árbol maderable, posee propiedades medicinales tales como laxantes y hemostáticas, siendo popularmente utilizado en casos de hemorragias internas y heridas sangrantes (Gupta, 1995; García, 1992).

De otro lado la hemostasia es entendida como el conjunto de mecanismos que permiten un equilibrio

dinámico entre todos los procesos bioquímicos que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad vascular (Casas et al., 1994; Forero y Forero, 1998). Cualquier alteración en dicho proceso es causa de coagulopatías; ejemplo de ello la coagulación intravascular diseminada (CID), e incluso, podrían desatarse eventos de señalización celular pro-inflamatorios mediados por receptores en la superficie plaquetaria activados por proteasas (PAR) o por la liberación de citocinas (IL-6 e IL-8). De igual forma, la coagulación sanguínea (que es solo un paso del proceso hemostático) se inicia una vez es lesionado cualquier tejido, impidiéndose la salida de sangre gracias al trombo formado por medio del fibrinógeno activado o fibrina. La generación de esta última puede darse en tres etapas: la primera de ellas,

¹ Grupo de Investigación Fitoquímica, Departamento de Biología. Facultad de Educación y Ciencias. Universidad de Sucre. Sincelejo (Sucre), Colombia. Correo electrónico: <fitorita@yahoo.es>.

² Grupo de Investigación Fitoquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico. Barranquilla (Atlántico), Colombia. Correo electrónico: <cldlarosa@uniatlantico.edu.co>.

generando protrombinasa, la cual es el complejo activador de la protrombina gracias a activaciones sucesivas de varios factores de la coagulación, ya sea por la vía intrínseca o la vía extrínseca; la segunda, generando trombina y finalmente, la formación de la fibrina (Riewald y Ruf, 2001).

Debido a la escasa información registrada acerca de *B. ariza* Bentham, se realizó esta investigación de una manera preliminar, analizando la posible actividad coagulante de los extractos en plasma pobre en plaquetas (PPP) por medio de la técnica conocida como tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) (tiempo de referencia 33- 48 segundos), la cual evalúa el proceso de coagulación por medio de la vía intrínseca a partir del tiempo registrado en la formación del coágulo de fibrina in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se trabajó con 835 g de cortezas en buen estado (secas y trituradas) de *B. ariza* Bentham, las cuales fueron sometidas a extracción mediante maceración durante 4 días, obteniéndose alrededor de 163,5 g (rendimiento del 19,58%) del extracto total en etanol.

Del extracto total 150 g fueron fraccionados mediante columna flash utilizando como fase estacionaria sílica 60GF₂₅₄ y como fase móvil (éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol) obteniéndose cinco fracciones codificadas como F1, F2, F3, F4, y F5 las cuales se sometieron a concentración a presión reducida en rota evaporador y en una campana de vacío para eliminar totalmente el solvente orgánico.

Pruebas de coagulación. Se llevó a cabo la técnica conocida como tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) usando el kit distribuido por Wiener Lab. (Wiener Laboratorios S. A.).

Obtención de Plasma Pobre en Plaquetas. Las pruebas se realizaron en plasma obtenido de san-

gre extraída de 3 pacientes sanos, no fumadores y sin dependencia de drogas. El anticoagulante usado fue citrato de sodio al 3,8%. La sangre citratada, se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 min, recuperándose el Plasma Pobre en Plaquetas.

Se preparó el extracto y las fracciones a una concentración de 500 mg/ml usando como vehículo solución salina, para determinar cual extracto y fracción presentaba reacción de coagulación sobre plasma pobre en plaquetas.

Conociendo los extractos con los que se presentó enturbiamiento y/o solidificación en el plasma, se prepararon concentración de 500.0, 250.0, 50.0, 10.0 y 1.0 mg/ml.

Para la técnica tiempo de tromboplastina parcial activada se emplearon como controles positivos el reactivo de tromboplastina parcial activada y el cloruro de calcio (CaCl₂) 0,025 M y como control negativo solución salina.

Análisis Estadístico. El análisis estadístico se basó en un análisis de correlación (incluyendo la estadística de prueba t) y de regresión lineal y, un análisis de varianza (ANOVA) para tamaños de muestras iguales, con el fin de establecer la correlación existente entre las dos variables sometidas a experimentación y la capacidad de darse la reacción de formación del coágulo de fibrina de manera similar en muestras de plasma obtenida de sangre extraída de tres pacientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al reemplazar el reactivo de TPA, no se evidenció cualquiera de las dos características a considerarse como positivas en la reacción de coagulación in vitro (enturbiamiento y/o solidificación), lo cual resulta lógico si se tiene en cuenta que dicha reacción no tendrá lugar mientras no esté participando la tromboplastina parcial en presencia de calcio iónico.

Reemplazado el CaCl_2 por la concentraciones de 500.0, 250.0, 50.0, 10.0 y .01 mg/ml del extracto total, F4 y F5 se evidenció reacción de formación

del coágulo de fibrina en las muestras de plasma. Los resultados de estas pruebas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultado de la técnica TTPA reemplazando el CaCl_2 indicándose los tiempos (promedios) en segundos de cada paciente usando las concentraciones en mg/ml del extracto total, fracción cuatro y fracción cinco

Muestras	Concentración mg/ml	Tiempo muestra de sangre 1	Tiempo muestra de sangre 2	Tiempo muestra de sangre 3
Extracto Etanol	500	16,04	16,07	15,78
250	30,93	30,81	32,24	
50	31,78	29,75	29,24	
10	31,49	29,56	29,83	
1	32,12	30,02	29,48	
Fracción 4	500	32,20	37,31	34,61
250	41,11	43,97	40,18	
50	44,38	49,44	44,14	
10	50,4	55,92	53,58	
1	56,9	59,84	59,04	
Fracción 5	500	82,5	61,5	50,16
250	64	46,8	50,5	
50	40,69	36,42	38,86	
10	36,47	31,83	33,23	
1	33,85	32,40	30,59	

La prueba se realizó por duplicado, cuya diferencia no sobrepasaba el 5%, siendo los datos aceptados por la mínima variación presentada entre ellos. El análisis de correlación lineal entre las dos variables sometidas a experimentación, demostraron una correlación lineal cercana a 1 y -1, siendo significativas las correlaciones, empleando una prueba de hipótesis formal basada en la estadística de prueba *t* con valores de *a* específicos para el extracto y fracciones (0,20 para el extracto total, 0,10 para fracción cuatro y 0,05 para fracción cinco). Rechazándose la hipótesis nula acerca de no haber correlación lineal significativa, ya que los resultados corroboran la afirmación de una correlación entre el tiempo y la concentración requeridos para la formación del coágulo de fibrina *in vitro*.

Al comparar el tiempo de 33-48 segundos registrado por la TPA control positivo, se observó que

el extracto total a una concentración de 500mg/ml muestra solidificación en el plasma pobre en plaquetas a un tiempo de 16,04 segundos; en la fracción cuatro se dio la reacción a los 32,20 segundos estando dentro de los rangos registrados por TPA, siendo el comportamiento de éstos en forma inversa proporcional a la concentración, la fracción cinco mostraron un comportamiento diferente, ya que la reacción se presentó en forma directa proporcional a la concentración. Esto del punto de vista farmacológico es interesante, ya que se presenta la formación del coágulo de fibrina utilizando la concentración mínima 1 mg/ml en un tiempo de 33,85 segundos.

En el análisis de varianza (ANOVA) para tamaños de muestras iguales comparando los valores medios de las tres muestras de sangre, el nivel de *a* utilizado fue 0,05, demostrándose que las tres

muestras provenían de poblaciones cuyas medias eran iguales, puesto que el valor estadístico de prueba fue inferior en todos los casos al nivel de α ensayado.

El calcio es fundamental para que ocurra la activación de los factores implicados en la activación de la protrombina en el proceso de formación de la fibrina (Casas *et al.*, 1994; Forero y Forero, 1998). Al reemplazar el CaCl_2 por las concentraciones ensayadas, los resultados obtenidos muestran que los metabolitos secundarios presentes en los extractos potencian el proceso de la coagulación mediante la vía intrínseca cuyo efecto en el plasma pobre en plaquetas es notorio; sin embargo, *in vivo* se llevan a cabo diversas reacciones dentro del proceso

hemostático que necesariamente dependen de una concentración adecuada de calcio.

Los resultados obtenidos de la técnica aplicada muestran que las concentraciones ensayadas del extracto total y fracciones cuatro y cinco de corteza de *B. ariza* Bentham, potencian la activación de los factores implicados en el proceso de la coagulación sanguínea mediados por el calcio.

AGRADECIMIENTOS

A Nelly Pacheco Mercado y Graciela Herrera por la valiosa asesorías durante la realización de la prueba biológica.

REFERENCIAS

- Casas A. 1994. *Laboratorio Clínico Hematología*. McGraw Hill-Interamericana. Madrid, España.
- Forero Y, Forero A. 1998. *Manual de procedimientos en coagulación*. Publicaciones INS. Bogotá, Colombia.
- García H. 1992. *Flora medicinal de Colombia*. Segunda edición. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia.
- Gupta M. 1995. *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Editores Presencia Ltda. Bogotá, Colombia.
- Riewald M, Ruf W. 2001. Mechanistic coupling of protease signalling and initiation of coagulation by tissue factor. *PNAS*. 98:7742-7747.