



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

BO 1301/97
Ej. 3

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL PRINCIPIO
ACTIVO ANTIBRADICININA DE *Aloe barbadensis*.

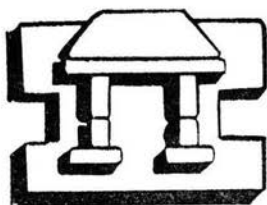
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO BAUTISTA PEREZ



IZTACALA LOS REYES IZTACALA

1997.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología, del Proyecto de Investigación en Productos Naturales de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación de la E.N.E.P. Iztacala, UNAM, bajo la dirección de la M. en C. Beatriz Vázquez Cruz y el M. en C. David Segura Cobos, a quienes agradezco su asesoría.

AGRADECIMIENTOS.

A la M. en C. Beatriz Vázquez Cruz por sus valiosos consejos que ayudaron a mi formación profesional en esta área de la investigación y por todo el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

Al M. en C. David Segura Cobos por su colaboración y constante apoyo en el laboratorio y en la elaboración del escrito.

A mis revisores de tesis: Q.F.B. Irma Delfin Alcala, BIOL. Soledad Chino Vargas, M.en C. Guillermo Avila Acevedo, M. en C. Cesar Mateos Flores Ortiz; por las sugerencias.

A los miembros del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, en especial a Q.F.B. Rocío Castro Ríos.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Esperanza Robles, Dolores Hernández Martínez y Gabriela Olivier por las facilidades otorgadas para el uso del equipo de sus laboratorios.

A mis profesores de la ENEP-Iztacala.

A Fundación U.N.A.M por haberme otorgado una beca durante la realización de esta tesis.

A todas aquellas personas que de alguna manera participaron para la realización de esta tesis.

Esta tesis la dedico:

A mi madre:
Rosa Pérez Ruiz

" No busques el camino que deba conducirte,
busca el sendero que permita dejar tu huella"

A mis hermanos:
Angela Ruiz Pérez
Ma. Alba Bautista Pérez
Leonel Bautista Pérez

" Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar".

A mis tíos:

Alfredo Pérez Rafael
Maximo Pérez Rafael
Ma. de los Angeles Osorio
Gilberto Bautista
Lucia Pérez Rafael

" Deseo llevar a cabo una tarea grande y noble,
pero mi primer compromiso es: hacer lo
pequeño como si fuera extraordinario ".

A mis sobrinas:

Berenice Lara Ruíz
Jessica Janet Lara Ruíz
Alan Ulises Lara Ruíz

A mis amigas:

Claudia Verónica
Rocío Andrea
Mary
Sofía
Nelly
Erika

INDICE

| | |
|---|------|
| RESUMEN..... | viii |
| I. INTRODUCCION | |
| 1.1. Proceso inflamatorio..... | 1 |
| La bradicinina..... | 4 |
| 1.1.1. Síntesis..... | 4 |
| 1.1.2. Función fisiológica..... | 5 |
| 1.1.3. Mecanismo de acción..... | 5 |
| 1.2. Fármacos antiinflamatorios..... | 8 |
| 1.3. Medicina tradicional..... | 12 |
| <i>Aloe barbadensis</i> | 13 |
| 1.3.1. Descripción botánica..... | 13 |
| 1.3.2. Taxonomía y distribución..... | 15 |
| 1.3.3. Usos medicinales..... | 16 |
| 1.3.4. Composición Química..... | 17 |
| 1.4. Antecedentes | 18 |
| 1.5. Objetivos | 23 |
| II. MATERIAL Y METODOS | |
| 2.1. Materiales..... | 24 |
| 2.2. Recolección de la Planta..... | 24 |
| 2.3. Extracción Del Material Antibradicinina de <i>A. barbadensis</i> | 25 |
| 2.3.1. Extracción del gel..... | 25 |
| 2.3.2. Fraccionamiento con sulfato de amonio..... | 26 |
| 2.4. Curvas dosis respuesta a bradicinina en ileon aislado de rata..... | 28 |
| 2.5. Filtración en gel de Sephacryl S-500HR | 33 |
| 2.6. Filtración en gel de Sephadex G-100..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 2.7. Determinación de proteínas y carbohidratos | 35 |
| 2.7.1. Método de Bradford..... | 35 |
| 2.7.2. Método del Fenol ácido sulfúrico..... | 36 |
| 2.8. Electroforesis | 36 |
| 2.9. Análisis estadístico..... | 38 |
| III.RESULTADOS..... | 39 |
| IV. DISCUSION..... | 54 |
| V. CONCLUSIONES..... | 58 |
| VI. ANEXOS..... | 59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA..... | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|-----------------------------------|
| AA | Acido araquidónico |
| BK | Bradicinina |
| B ₂ | Receptores a bradicinina 2 |
| Ca ²⁺ | Iones de calcio |
| CDP-DAG | Citidin difosfato diglicérido |
| DAG | Diacilglicerol |
| G | Proteínas G |
| 5-HETE | Acido 5-hidroxitetraenoico |
| IL-1 | Interleucina -1 |
| IP | Inositol- fosfato |
| IP ₂ | Inositol- difosfato |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| LTB ₄ | Leucotrieno B ₄ |
| LTC ₄ | Leucotrieno C ₄ |
| LTD ₄ | Leucotrieno D ₄ |
| LTE ₄ | Leucotrieno E ₄ |
| NO | Oxido nítrico |
| PA | Acido fosfatídico |
| PAF | Factor activador de las plaquetas |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PGI ₂ | Prostaciclina I ₂ |
| PGE | Prostaglandinas de la serie E |
| PGD ₂ | Prostaglandina D ₂ |
| PGF ₂ | Prostaglandina F ₂ |

PI Fosfatidilinositol
PIP Fosfatidil inositol fosfato
PIP₂ Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKC Proteína cinasa C
PKG Proteína cinasa dependiente de GMP cíclico
PLA₂ Fosfolipasa A₂
PLC Fosfolipasa C
TNF - α Factor de necrosis tumoral α
TXA₂ Tromboxano A₂

RESUMEN:

En el proceso inflamatorio la bradicinina (BK) estimula la síntesis de prostaglandinas y otros mediadores químicos, ocasionando que el proceso se prolongue por más tiempo. En algunas comunidades rurales de México utilizan a la sábila (*Aloe barbadensis*) para el tratamiento de padecimientos inflamatorios. El objetivo general de este trabajo fue estudiar si en gel de *A. barbadensis* existen compuestos con actividad antibradicinina.

De las hojas frescas de *A. barbadensis*, se extrajo el gel, se homogenizó y centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4° C. En el sobrenadante (F-1) se valoró la actividad antibradicinina.

Para determinar la actividad antibradicinina de las fracciones obtenidas del gel de *A. barbadensis*, se incubó 1 mg de la fracción a ensayar con 1.67 μg de bradicinina en un ml de amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, a 30° C por 30 min. Antes y después de ensayar la actividad de las fracciones, se realizó una curva dosis - respuesta control a bradicinina.

En el ensayo biológico, se utilizaron ratas Wistar, macho (200-230 g), que se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el íleon; un segmento de 2 cm se colocó en una cámara para órgano aislado con sol. Tyrode, pH 7.4 a 30° C, con burbujeo continuo de una mezcla de O₂ y CO₂ (95:5).

La respuesta contráctil del íleon aislado disminuyó 10 % cuando se administró BK incubada con la fracción 1(F-1). Posteriormente se incubó en las condiciones antes descritas, bradicinina con la fracción (F-1) previamente hervida; en el ensayo biológico esta mezcla no disminuyó la respuesta contráctil. Estos resultados sugieren que en la fracción (F-1) existe material antibradicinina de naturaleza proteínica, por lo que se

continúo el aislamiento utilizando procedimientos para la purificación de proteínas.

La F-1 se fraccionó con sulfato de amonio al 35, 55, 75 y 100 % de saturación; cada una de las fracciones se sometió al ensayo biológico. De las cuatro fracciones, F-55 disminuyó el 22 % de la respuesta contráctil. Para eliminar los polisacáridos de alto peso molecular (mucílagos) que hacen muy viscosa la solución de la fracción 55, se filtró a través de una columna de Sephacryl S-500HR con amortiguador de fosfatos 0.05 M y NaCl 0.15 M, pH 7. En el bioensayo la fracción que se obtuvo de la columna (F-SH) disminuyó el 58 % de la respuesta contráctil a BK. La fracción SH se filtró a través de una columna de Sephadex G-100 con amortiguador de fosfatos 0.05 M y NaCl 0.15 M, pH 7; se obtuvieron 4 fracciones de las cuales, la fracción GB disminuyó el 67 % de la respuesta contráctil a BK.

Conforme avanzó el proceso de purificación se incrementó la actividad específica. En la fracción GB aún se encontraron carbohidratos, lo cual sugiere que el material con actividad antibradicinina podría ser una glicoproteína. Mediante la técnica de electroforesis se mostró la presencia de dos bandas de proteínas que tienen un peso molecular de 40 y 20 Kd.

1. INTRODUCCION

1.1 Proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es una reacción local inespecífica del tejido conjuntivo ante una lesión causada por agentes: a) físicos (calor, radiaciones, etc); b) mecánicos (aplastamiento), c) biológicos (bacterias, hongos, virus), d) químicos (toxinas y sustancias caústicas) e inmunológicos (interacción antígeno-anticuerpo). En la inflamación el agente produce una variedad de reacciones locales y generales que incluyen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, agregación plaquetaria, acumulación de fibrina y de polimorfonucleares, activación de nociceptores, así como la liberación de numerosas enzimas y mediadores químicos (Baumann, H. y col.; 1994). Estos fenómenos al sobrepasar una cierta duración e intensidad adquieren dimensiones perturbadoras; de tal manera que sea deseable desde el punto de vista terapéutico el limitarla. Para esto último resulta esencial la comprensión del papel de los diversos mediadores químicos de origen celular y plasmático en el proceso inflamatorio (Tablas 1 y 2) (Dray y Bevan, 1994).

TABLA 1: MEDIADORES QUIMICOS DE ORIGEN CELULAR.

| Mediadores Químicos De Origen celular: | Actividad Biológica En La Inflamación: |
|---|---|
| Aminas vasoactivas: * Histamina * 5-Hidroxitriptamina | * Vasodilatación * Aumento de la permeabilidad vascular |
| * Factor activador de las plaquetas (FAP) | * Agregación plaquetaria * Libera Histamina y 5-Hidroxitriptamina * Produce vasoconstricción y broncoconstricción * A concentraciones bajas produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad venular * Estimula la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. |
| Citocinas: * Interleucina - 1 (IL-1) * Factor de la necrosis tumoral (TNF α) | * Estimula la síntesis de moléculas de adherencia, PGI ₂ y FAP * Inducen las respuestas generales de la fase aguda |
| Constituyentes de los lisosomas: * Lactoferrina * Lisozima * Fosfatasa alcalina * Proteínas catiónicas * Hidrolasas ácidas * Proteasa neutra (elastasa,colagenasa, catepsina,) | * Aumento de la permeabilidad vascular * Quimiotactismo (monocitos) * Inhiben el movimiento de los neutrófilos y eosinófilos * Atacan al colágeno, membranas basales, fibrina, elastina y cartílago, dando lugar a la destrucción tisular |
| Metabolitos del ácido araquidónico: * Prostaglandinas (PGE, PGD ₂ , PGF ₂) * Prostaciclina (PGI ₂) * Tromboxanos (TXA ₂) * Leucotrienos (LTB ₄) LTC ₄ LTD ₄ LTE ₄ | * Vasodilatación y Potenciación del edema * Dolor y fiebre * Inhibidor de la agregación plaquetaria * Produce vasoconstricción y agregación plaquetaria * Quimiotactismo * Aumento de la permeabilidad vascular |

TABLA 2: MEDIADORES QUIMICOS DE ORIGEN PLASMATICO:

| Mediadores Químicos De Origen plasmático | Actividad Biológica En La Inflamación: |
|--|---|
| Proteasas Plasmáticas: * El sistema del Complemento: C3a, C5a, C3b, C3bi, C5b-9 | * Aumento de la permeabilidad vascular * Aumenta la adhesividad de los leucocitos al endotelio. * Quimiotactismo * Oponisación * Desgranulación de mastocitos * Activan a la lipooxigenasa |
| * El sistema de las Cininas: Bradicinina Calidina | * Aumento de la permeabilidad vascular * Produce vasodilatación * Dolor * Actividad quimiotáctica |
| * El sistema de la coagulación: Fibrinopéptidos * Factor Hageman (factor XIIA) | * Aumento de la permeabilidad vascular * Quimiotactismo * Inicia los sistemas de la coagulación fibrinolítico y de las cininas. |

Los mediadores químicos que participan en etapas tempranas del proceso inflamatorio son la histamina y las cininas. Las cininas son la calidina (decapéptido) y la bradisinina (gr bradys: lento y kenein: movimiento); péptidos con estructuras químicas y propiedades farmacológicas relacionadas.

LA BRADICININA.

1.1.1. Síntesis:

En el plasma circula una proteína llamada precalicreína plasmática, esta proteína es hidrolizada por el factor Hageman (FH: factor XII; proteasa que participa en la cascada de las cininas y de la coagulación) dando origen a la calicreína plasmática, esta a su vez activa al FH, ejerciendo así una retroalimentación positiva sobre el sistema. La calicreína plasmática hidroliza cininógenos de alto peso molecular (APM) y el producto es el nonapéptido bradicinina (BK) (Figura 1) (Proud y Kaplan, 1988).

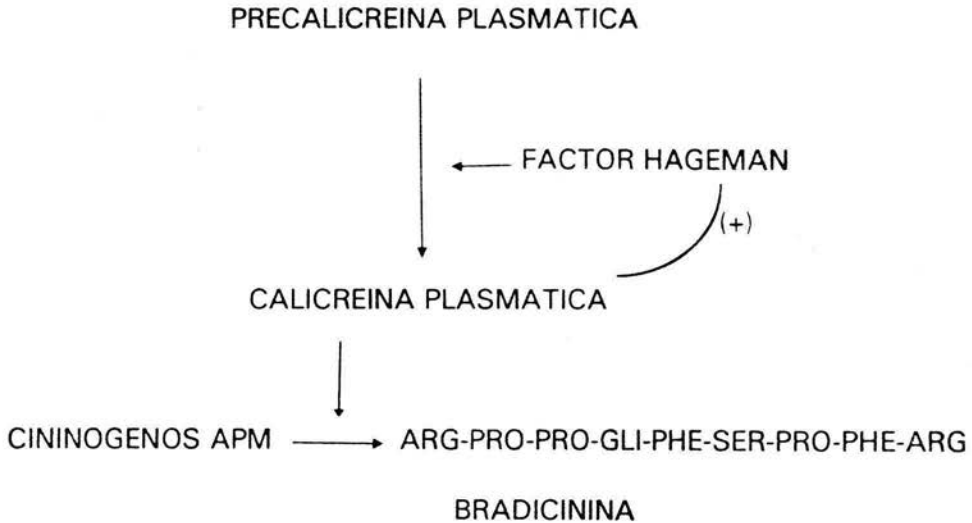


FIGURA 1: Síntesis de la Bradicinina

1.1.2. Función Fisiológica:

En el proceso inflamatorio la bradicinina produce: vasodilación, aumento de la permeabilidad capilar, promoción de la acumulación y migración de leucocitos, producción de dolor y estimula la producción y liberación de otros mediadores químicos (Dray, 1993).

1.1.3. Mecanismo de Acción:

Existen dos tipos de receptores de la bradicinina: la síntesis de los receptores B_1 es inducida por traumatismos o agresiones patológicas y regulan la contracción del músculo liso vascular. Los receptores B_2 modulan la contracción del músculo liso (útero de rata, íleon de cobayo, músculo traqueobronquial); la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular, el dolor y estimula la producción y liberación de otros mediadores químicos que prolongan y mantienen el proceso inflamatorio (Dray, 1993; Burch y Kyle, 1992).

En la membrana plasmática de leucocitos y neuronas, la bradicinina (BK) se une a receptores del tipo B_2 , estos receptores están acoplados a proteínas G, estas proteínas estimulan a las fosfolipasas A_2 y C. La fosfolipasa A_2 hidroliza la unión éster sn-2 de los fosfolípidos membranales

(en particular fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y libera ácido araquidónico (AA). La fosfolipasa C separa el puente fosfodiéster y forma 1,2-diglicérido, del cual se libera AA mediante la acción consecutiva de la digliceridolipasa y la monogliceridolipasa (Okazaki y col., 1981). Una vez liberado el AA es oxigenado por la ciclooxigenasa y/o la lipooxigenasa; generándose productos biológicamente activos, entre ellos las prostaglandinas y/o leucotrienos (Figura 2) (Davies y col., 1984; Lindgren y col., 1993). En las fibras sensoriales el inositol 1,4,5, trifosfato liberado por la fosfolipasa C; se une a receptores localizados en las membranas del retículo endoplásmico liso y libera Ca^{++} ; esto induce la liberación de neuropéptidos como la Substancia P, la Neurocinina A y el Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC). En los macrófagos y el endotelio vascular la BK estimula la síntesis de citocininas (IL- 1, TNF- α) y óxido nítrico ; en las células cebadas estimula la liberación de histamina (Dray, 1993).

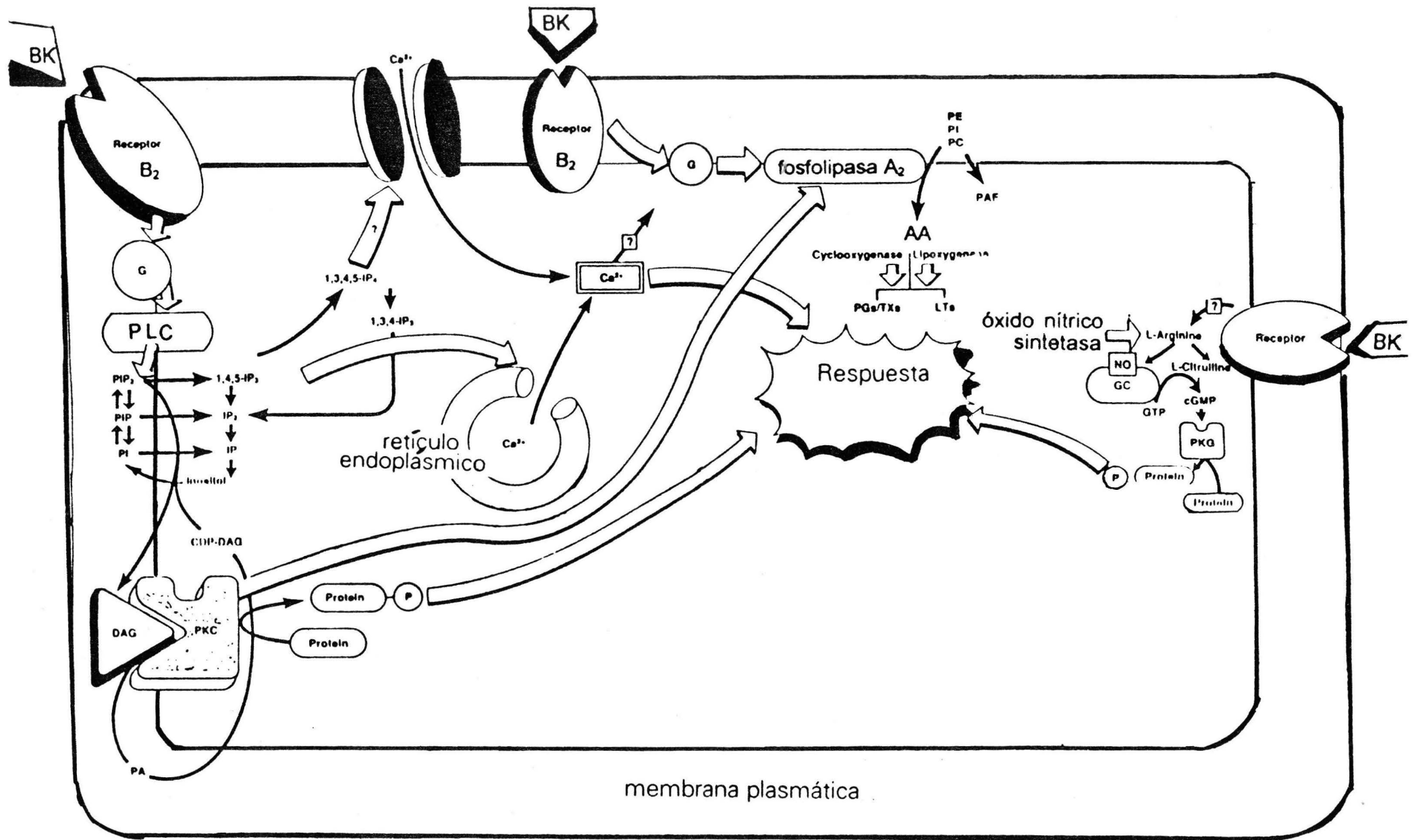


FIGURA 2: La Bradicinina estimula la producción y liberación de otros mediadores químicos.

1.2. FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS:

Como se mencionó anteriormente el proceso inflamatorio es una respuesta de defensa del organismo, sin embargo en algunas ocasiones el proceso inflamatorio puede prolongarse y convertirse por sí mismo en nocivo o bien ser un estado crónico degenerativo como en la artritis reumatoide y las cardiopatías reumáticas; en estos casos es necesario recurrir al tratamiento con fármacos antiinflamatorios.

Los fármacos antiinflamatorios son de dos tipos: esteroidales y no esteroidales. Los fármacos esteroidales más utilizados son: Dexametasona, Cortisona, Hidrocortisona, Prednisona y Prednisolona (Figura 3) (Goodman y Gilman, 1991).

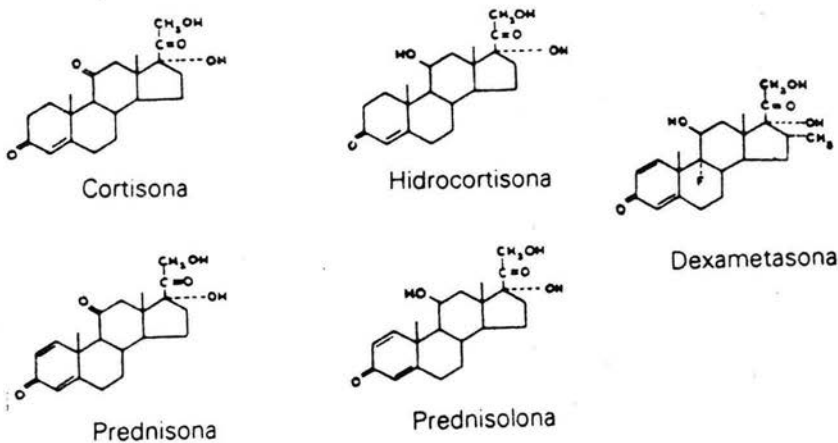


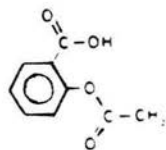
Figura 3: Estructura Química De Los Fármacos Antiinflamatorios Esteroidales.

La actividad antiinflamatoria de los fármacos esteroidales se debe a que:

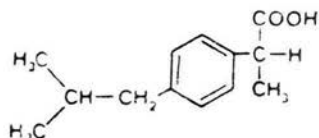
- 1) Estimulan la síntesis de la lipocortina, proteína que inhibe a la fosfolípasa A₂, esto disminuye la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de sus metabolitos.
- 2) Inhiben a la óxido nítrico sintetasa y la transcripción de las citocinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 y TNF- α ; esto a su vez inhibe la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales (Barnes, 1993).

El uso continuo de fármacos de tipo esteroideal causa los siguientes efectos colaterales indeseables: mayor susceptibilidad a la infección, úlcera péptica, miopatía, nerviosismo, insomnio, cambios del estado de ánimo, se han observado cataratas subcapsulares posteriores en niños, osteoporosis y fracturas vertebrales por compresión, inhibición del crecimiento en niños (Goodman y Gilman, 1991).

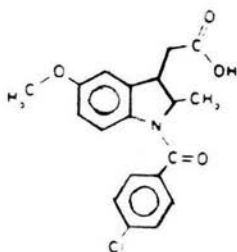
Los fármacos no esteroidales más utilizados son: el ácido salicílico, ibuprofén, indometacina y fenilbutazona (Figura 4) (Goodman y Gilman, 1991).



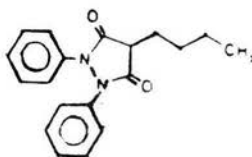
ácido salicílico



ibuprofén



indometacina



fenilbutazona

FIGURA 4: Estructura Química De Los Fármacos Antiinflamatorios No Esteroidales.

Los fármacos no esteroideos inhiben a la ciclooxigenasa, enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas (PGE_2 , PGF_2 , PGD_2), tromboxanos y prostaciclina; además inhiben la migración de leucocitos y macrófagos hacia el sitio lesionado e inhiben la agregación plaquetaria (Higg, 1987).

Los fármacos no esteroideos tienen en común varios efectos indeseables; el más frecuente es la propensión a inducir úlcera gástrica o

intestinal que a veces puede acompañarse de anemia secundaria por la pérdida de sangre, disturbios en la función plaquetaria, reducen el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o cirrosis hepática (Goodman y Gilman, 1991).

Los fármacos antiinflamatorios utilizados en la clínica tienen numerosos y frecuentes efectos colaterales que se presentan conjuntamente con el efecto deseado, llegando a ser necesario en muchas ocasiones que el paciente abandone el tratamiento o bien que el médico, para tratar de evitar o disminuir los efectos indeseables tenga que elaborar tratamientos que no son los más idóneos en cuanto a efectividad y seguridad terapéutica; esto adquiere mayores dimensiones en aquellos pacientes con enfermedades degenerativas de tipo crónico; por esta razón algunos pacientes recurren a la medicina tradicional, así, por ejemplo, las especies de *Aloe* son utilizadas ampliamente en el tratamiento de todo tipo de padecimientos inflamatorios.

1.3. MEDICINA TRADICIONAL.

Actualmente se realizan investigaciones tratando de encontrar nuevos antiinflamatorios con efectividad terapéutica y mínimos efectos colaterales. Sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios, ya que la mayoría de estos fármacos son sintetizados tomando como modelo la estructura química de los antiinflamatorios de uso actual, sobre todo como los no esteroidales, obteniéndose por consiguiente compuestos que no difieren de las propiedades farmacológicas y tóxicas de éstos.

Por lo que es necesario hacer una búsqueda racional de nuevos fármacos antiinflamatorios. Una fuente para tal búsqueda la constituyen las plantas que tienen gran aceptación y son muy utilizadas en la medicina tradicional.

En México las plantas más utilizadas para el tratamiento de padecimientos inflamatorios son: *Cerasus capuli* (capulín), *Linum usitassimum* (linaza), *Cissus cucurbitina* (vid coral), *Cordia boissieri* (anacahuite), *Psoropyllum tagetoides* (papaloquelite), *Euphorbia maculata* (hierba de la golondrina), *Cupresus sempervirens* (ciprés), *Tribulus cistoides* (abrojo rojo), *Ipomaea rosae* (carape) y varias especies de áloe (sábila) como *Aloe barbadensis*. Actualmente se hacen investigaciones para el

aislamiento de los principios activos antiinflamatorios de estas plantas (Martínez, 1961).

La planta que ocupa nuestro interés en este estudio es el *Aloe barbadensis*, conocida popularmente como sábila.

1.3.1. DESCRIPCION BOTANICA DE *Aloe barbadensis* Miller.

El *Aloe barbadensis* es una planta perenne, que pertenece a la familia de las Liliáceas. Sus hojas, largas, carnosas y con bordes espinosos, se acomodan en forma de roseta y se unen a un tronco muy corto, el cual crece hasta 25 cm de largo en plantas adultas. Una planta tiene de 15-30 hojas que alcanzan hasta medio metro de altura y de 8-10 cm de ancho en la base; son ligeramente cóncavas por la superficie superior y convexas por la inferior; de color verde y cuando son jóvenes están moteadas en blanco.

Las hojas jóvenes se localizan en el centro y las hojas adultas o maduras en la periferia. La inflorescencia es un denso racimo sobre un pedúnculo de 30-50 cm de largo que surge del centro de la roseta. Las flores son de color amarillo o rojo brillante (Figura 5) (Grindlay y Reynolds, 1986).



FIGURA 5: *Aloe barbadensis* Miller.

1.3.2. TAXONOMIA Y DISTRIBUCION

A esta planta se le han asignado diferentes nombres científicos (Grindlay y Reynolds, 1986; Díaz, 1976).

| Nombre científico | Descrita por: |
|-------------------------|---------------|
| <i>Aloe vulgaris</i> | Lamarck |
| <i>Aloe vera</i> | Linneo |
| <i>Aloe chinensis</i> | Baker |
| <i>Aloe barbadensis</i> | Miller |

La taxonomía de esta especie es:

| | |
|----------|--------------------|
| Reino | vegetal |
| Subreino | fanerógamas |
| Tipo | Angiosperma |
| Clase | Monocotiledónea |
| Orden | Liliflorea |
| Familia | Liliácea |
| Genero | <i>Aloe</i> |
| Especie | <i>barbadensis</i> |

Aloe barbadensis es originaria del sur y este de Africa, fue introducida en las Islas Barbados en el siglo XVII. Actualmente es cultivada ampliamente en la República Mexicana debido a sus diferentes usos en la industria cosmética, farmacéutica y medicina tradicional (Reynolds, 1966; Benson, 1982).

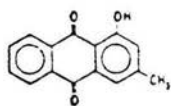
1.3.3. USOS MEDICINALES.

En México y otros países, se extrae el gel del *aloe* para la preparación de pomadas y cremas, que ayudan a cicatrizar heridas, quemaduras, y en general ulceraciones de la piel, ronchas, eczema, acné y otras afecciones de la piel (Grindlay y Reynolds, 1986). López (1988) menciona que en algunas comunidades rurales de México el gel de *Aloe* se aplica de la siguiente manera en el tratamiento de:

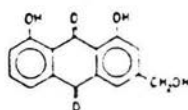
| | Modo de aplicación |
|--------------------|---|
| Heridas de la piel | Se abre una hoja por la mitad y la pulpa se coloca sobre la herida |
| Inflamaciones | La hoja se asa ó únicamente se unta el jugo sobre la lesión |
| Dolor de muelas: | Se ponen unas gotitas de la savia extraída de la hoja fresca en la zona lesionada |
| Paperas | Se asa una hoja, se corta en trozos y se amarra con una venda lo más caliente que el paciente soporte o se cuece la hoja y se mezcla con sal para colocarla sobre la parte inflamada. |
| Erisipela | Se corta una hoja y se abre longitudinal, se corta en trozos y se le agrega aceite comestible o aceite rosado, luego se asa y se coloca sobre la parte afectada |
| Mal aliento | Se unta la savia extraída de la hoja fresca en el interior de la boca |
| Laxante | El acíbar es el residuo sólido obtenido por evaporación del líquido amarillo que fluye al cortar transversalmente las hojas; se usa como laxante. |

1.3.4. COMPOSICION QUIMICA:

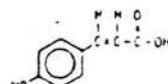
Los compuestos encontrados en *A. barbadensis* son: aloina, aloe-emodina, ácido aloético, ácido crisofánico, aloesina, aloesona, emodina, ácido crisamínico, B-barbaloina, isobarbaloina, O-glicósidos, ácido galacturónico, arabinosa, galactosa, D-glucosa, D-manosa, D-xilosa, ácido D-glucónico, glucosamina, ácido fólico, ácido cítrico, ácido L-málico, ácido succínico, d1-limoneno, B-mirceno, oxalato de calcio, colina, saponinas, ácido urónico, ácido glutámico, serina, treonina, asparagina, glutamina, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina (Figura 6) (Waller, 1978; Henry, 1979; Hurtado y col., 1984).



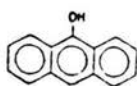
AC. CRISOFANICO



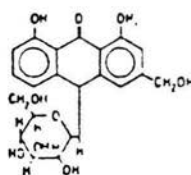
ALOE - EMODINA



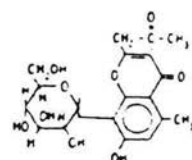
AC. COUMARICO



ANTRANOL



ALOINA (BARBALOINA)



Aloesina



d-LIMONENO

FIGURA 6: Compuestos químicos de *Aloe barbadensis* Miller

1.4. ANTECEDENTES:

Existen reportes médicos y usos populares que mencionan la eficacia del gel de las hojas frescas del *A. barbadensis*. Grindlay y Reynolds (1986) en su monografía sobre *Aloe* y el I.N.I. (1994) mencionan los siguientes trabajos: Collins y Collins (1937) presentaron el primer caso clínico en el que aplicaron tópicamente el gel a una paciente que había sufrido dermatitis severa, ocasionada por la exposición excesiva a rayos X; en 5 semanas de tratamiento continuo con el gel de *A. vera* se restableció completamente la piel lesionada. Loveman (1937) aplicó tópicamente el gel a 2 pacientes que presentaban úlceras en la piel; en pocas semanas de tratamiento disminuyó el área lesionada. Crewe (1937) trató úlceras y quemaduras con el gel en pomada y en polvo; y en todos los casos disminuyó el dolor, el ardor y el prurito; además con este tratamiento también se presentó actividad antiséptica y estimuló la formación de tejido nuevo. Blitz y col. (1963) administraron el gel por vía oral a 12 personas que padecían de úlcera gástrica; y en un año se recuperaron completamente. Payne (1970) administró el gel a 5 pacientes después de una cirugía periodontal; en una semana de tratamiento el dolor y la

inflamación disminuyeron. Northway (1975) afirmó que el gel es un tratamiento apropiado para la curación de padecimientos inflamatorios e infecciones bacterianas que se presentan en animales domésticos. Cera y col. (1975) reportaron que el gel inhibe las infecciones producidas por *P.aeruginosa*. Mortada y col. (1976) trataron con extractos de áloe, las úlceras presentes en la córnea; este tratamiento ocasionó menos reacciones celulares y pocos signos de irritación. Para evaluar la actividad antiinflamatoria del gel de *Aloe vera*; Davis y col (1989) administraron por vía oral 20 mg de áloe, a los 30 minutos aplicaron por vía subcutánea en la pata izquierda posterior alguna de las siguientes soluciones (100 ug / 0.1 ml) : caolín, dextrán, carragenina y albúmina ; como control administraron en la pata contralateral solución salina 0.9%. El aumento de volumen producido por el edema se midió antes y después de la administración del irritante por el método de desplazamiento del mercurio. El gel de *A.vera* mostró actividad antiinflamatoria en todos los grupos experimentales.

Davis y col (1989) administraron *A.vera* por vía oral y tópica (25 mg / kg) a ratones con heridas en la superficie de la columna vertebral, las heridas se provocaron con una placa caliente, el tratamiento se llevó acabo

por dos meses. Después de este tiempo observaron que cuando se administró *A.vera* por vía oral disminuyó el 62.5 % del diámetro de la herida y el 50.8 % en los animales que fueron tratados con *A. vera* por vía tópica.

Vázquez y col. (1996) evaluaron la actividad antiinflamatoria de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de *A.vera*, en dos modelos de inflamación : El edema producido en el extremo de la pata posterior de ratas y la migración celular hacia la cavidad peritoneal, ambas respuestas estimuladas por carragenina. Los extractos acuoso y clorofórmico disminuyeron el edema y el número de neutrófilos que migran hacia la cavidad peritoneal ; el extracto etanólico únicamente disminuyó el número de neutrófilos. Estos efectos fueron similares a los producidos por dos fármacos antiinflamatorios: indometacina (10 mg / kg) y dexametasona (0.5 mg / kg). Se determinó la presencia de antraglicósidos, azúcares reductores y glucósidos cardiotónicos en el extracto acuoso; saponinas, esteroides, triterpenoides y antraquinonas en el extracto etanólico; antraquinonas en el extracto clorofórmico.

Vázquez y col. (1994) evaluaron el efecto analgésico y antiinflamatorio de tres extractos del gel de *A.vera* : Acuoso (100,200 y 400 mg/kg), clorofórmico (5 ,25, 50, 100 y 400 mg/kg) y etanólico (12.5, 25, 50, 100 y 400 mg / kg). Para evaluar el efecto analgésico emplearon la prueba de contorción inducida con ácido acético (60 mg /kg vía intraperitoneal) en ratones machos, a los cuales se les administraron los extractos acuoso y clorofórmico por vía oral, el etanólico y la indometacina (10 mg / kg ; control) por vía subcutánea. El efecto antiinflamatorio se evaluó en un modelo de inflamación crónica; para lo cual implantaron por seis días pellets de algodón estériles entre la piel y el músculo de ratas. Los extractos se administraron por vía oral durante seis días, como fármacos testigos se administró dexametasona (1 mg /kg , vía subcutánea) y fenilbutazona (100 mg / kg, vía oral). Al séptimo día, extrajeron los pellets y se secaron a 80 °C por 20 horas ; el peso del granuloma se obtuvo restando el peso del algodón (50 mg \pm 1). En la prueba de contorsión los extractos que mostraron mayor efecto analgésico fueron el etanólico (12.5 mg/kg) y el clorofórmico (25 mg / kg) , los cuales inhibieron las contorsiones en 64.5 % y 45.6% respectivamente, la indometacina inhibió las contorsiones en 50 %. El desarrollo del granuloma fue inhibido

por los extractos clorofórmico y etanólico (400 mg / kg) en 43.8 % y 21.7 % respectivamente; la fenilbutazona inhibió el granuloma en 45 % y la dexametasona 57.3%. En los trabajos antes mencionados se ha demostrado el efecto antiinflamatorio de *Aloe barbadensis*, sin embargo no existen evidencias farmacológicas que justifiquen su uso terapéutico como agente antiinflamatorio, sólo Fugita y col. (1976) y Yagi y col. (1982) mencionan la existencia de una proteína con actividad de bradicininasasa en las especies de *Aloe arborescens* y *Aloe saponaria*; lo que posiblemente explique parte del efecto antiinflamatorio de estas especies. Yagi y col. (1987) reportaron que la glicoproteína que aislaron del gel de *A. arborescens* tiene un peso molecular de 40 kilodaltones.

1.5. OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1) Estudiar si en el gel de *Aloe barbadensis* existen compuestos con actividad antibradicinina.
- 2) Caracterizar la naturaleza bioquímica del material con actividad antibradicinina.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Estandarizar la curva dosis-respuesta a bradicinina en el ñleon aislado de rata.
- b) Fraccionar por métodos químicos el gel de *A. barbadensis*.
- c) Estudiar en cual de las fracciones separadas se encuentra el material antibradicina, mediante la preparación de ñleon aislado de rata
- d) Aislar el material con actividad antibradicinina.

II. MATERIAL Y METODOS.

2.1. MATERIALES:

Todos los reactivos fueron de calidad reactivo analítico: bradicinina (Sigma), sulfato de amonio (Merck), Sephacryl S-500 HR y Sephadex G-100 (Pharmacia), Tubos de celulosa para diálisis No.4 de corte 12-14 Kd (Spectrapor), reactivos para electroforesis (Sigma).

2.2.- RECOLECCION DE LA PLANTA:

El presente trabajo pertenece al proyecto de investigación "Inflamación y antiinflamatorios de origen vegetal". El *Aloe barbadensis* se colectó en el Municipio de Apaxco, Edo. de Méx., ubicado en la región de Zumpango, el cual se encuentra al norte de la Ciudad de México, al noroeste de Toluca, localizándose a los $19^{\circ} 58.4'$ de latitud norte y a los $99^{\circ} 10.1'$ de longitud oeste. Limita al norte con el Estado de Hidalgo; al oriente y sureste con el municipio de Huypoxtla y por el sur y poniente con Tequixquiac y Huehuetoca (Figura 7). El ejemplar botánico que respalda esta investigación fue depositado en el Herbario IZTA, de la ENEP Iztacala de la UNAM con el número de registro 9052.



FIGURA 7: Zona de colecta de *A. barbadensis*.

2.3. EXTRACCION DEL MATERIAL ANTIBRADICININA DEL GEL DE *A. barbadensis*.

2.3.1. EXTRACCION DEL GEL.

Las hojas frescas de plantas maduras de áloe se lavaron y se les cortaron los bordes espinosos; en seguida se abrieron longitudinalmente y se extrajo el gel. El gel se homogenizó y se filtró a través de varias capas de gasa; se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min a 4° C en una centrífuga

Sorvall Mod. RC - 5B. Se evaluó la actividad antibradicinina del sobrenadante (F-1) en el íleon aislado de rata (ensayo biológico).

2.3.2. FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO:

El material (F-1) se fraccionó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 35, 55, 75 y 100 % de saturación; como se describe en la Figura 8. Las precipitaciones se llevaron a cabo en agitación constante durante 48 horas a 4 °C (Cooper, 1977; Scopes, 1988). Las fracciones así obtenidas F-35, F-55, F-75 y F-100 se resuspendieron en agua destilada y se dializaron contra la misma durante 48 horas a 4° C con agitación constante, se liofilizaron (Liofilizadora Mod. Labconco Freeze Dry system Lyph'Lock 4.5) y se mantuvieron en congelación hasta su utilización.

Para determinar la actividad antibradicinina de las fracciones obtenidas del gel de *A. barbadensis*, se incubó 1 mg de la fracción a ensayar con 1.67 µg de bradiginina en 1 ml de amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, por 30 minutos a 30 °C. Antes y después de ensayar la actividad de las fracciones, se realizó una curva dosis respuesta control a bradiginina, la cual se incubó previamente en 1 ml de amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, por 30 minutos a 30 °C.

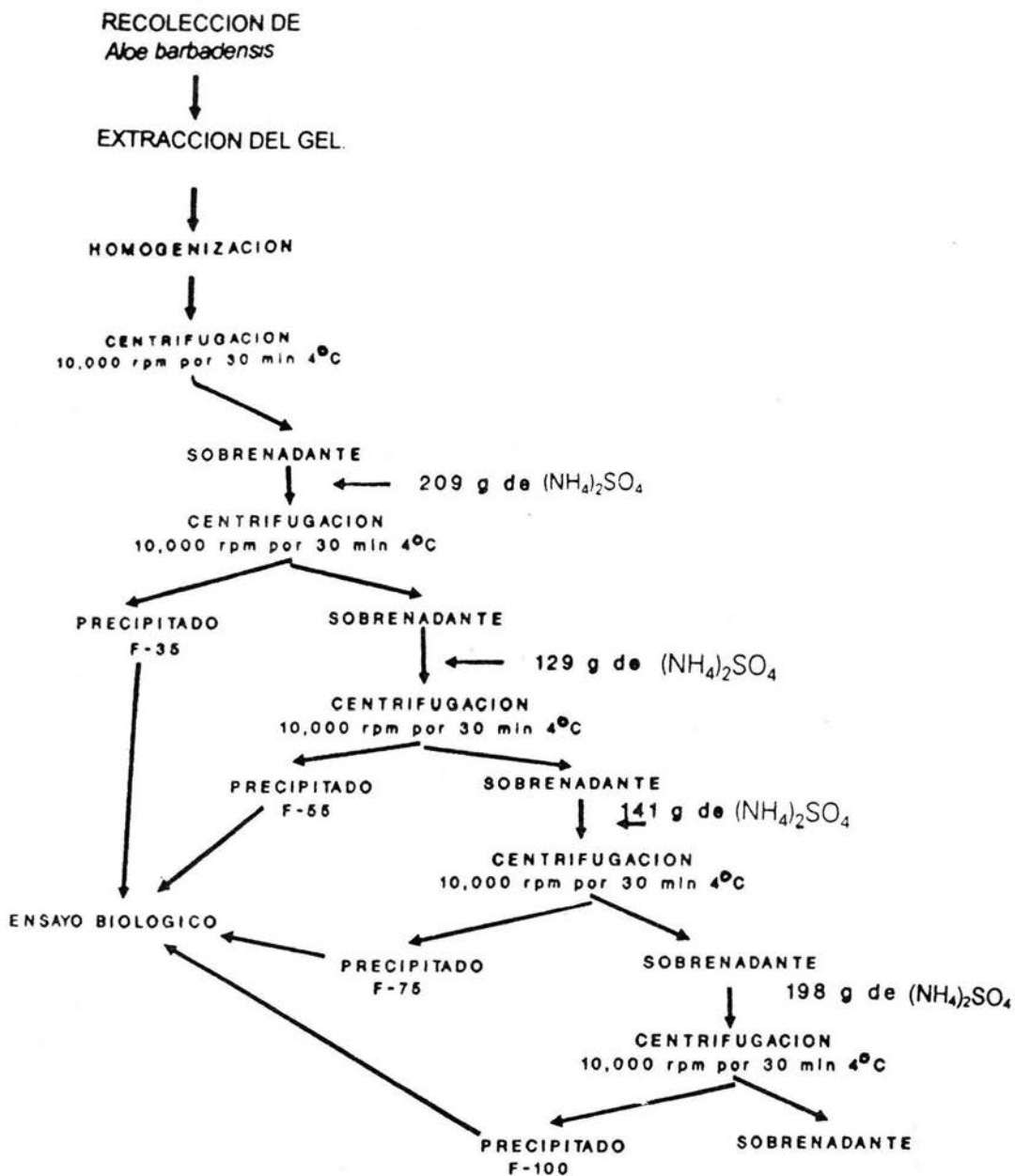
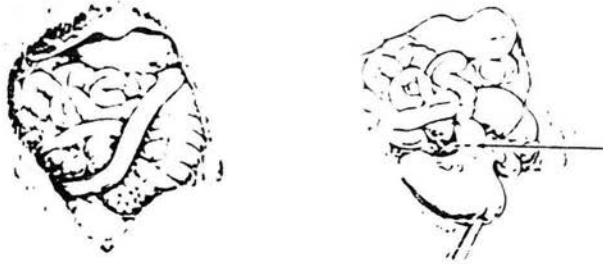


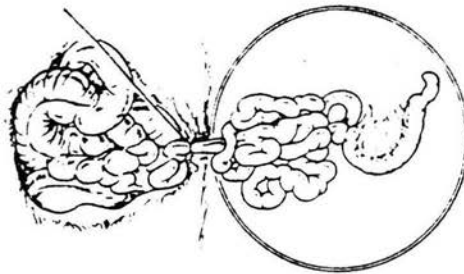
FIGURA 8: Fraccionamiento del gel de *Aloe barbadensis* por el método de sulfato de amonio.

2.4. CURVA DOSIS RESPUESTA A BRADICININA EN ILEON AISLADO DE RATA.

Se utilizaron ratas Wistar, macho de 200-230 g de peso, se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se extrajo el íleon, éste se fraccionó en segmentos de aproximadamente 2 cm, y se colocaron en una cámara para órgano aislado con 10 ml de solución Tyrode, pH 7.4, a una temperatura constante de 30 ° C, con burbujeo continuo de una mezcla de O₂ y CO₂ (95:5 %) (Figuras 9 y 10). Posteriormente el tejido se ató a un transductor Narco Bio Systems (NBS) Mod. F-60 que estaba unido a un fisiógrafo de mesa Mod. DMP-4B (Narco Bio Systems) y se aplicó 0.3 g de tensión. Se dejó estabilizar la preparación por 15 min; el registro se inició cuando se observó que la frecuencia y el tono de la contracción muscular espontánea eran constantes; en estas condiciones se registró la actividad contráctil basal durante un minuto, se realizó en seguida una curva dosis respuesta a la bradicinina y después se continuó el registro por otros 10 min; se lavó la preparación varias veces con la solución de Tyrode, hasta observar su regreso al estado basal (S.D.P.U.E, 1974; Perry, 1970).



A) Se abre el abdomen.



B) Se corta en la unión ileocecal; el íleon se coloca en una caja de petri con solución Tyrode y burbujeo continuo de una mezcla de O_2 y CO_2 a $37^\circ C$



C) Se quitan las uniones mesentéricas y se lava el lumen con solución Tyrode

FIGURA 9: Extracción del íleon de rata.

Transductor

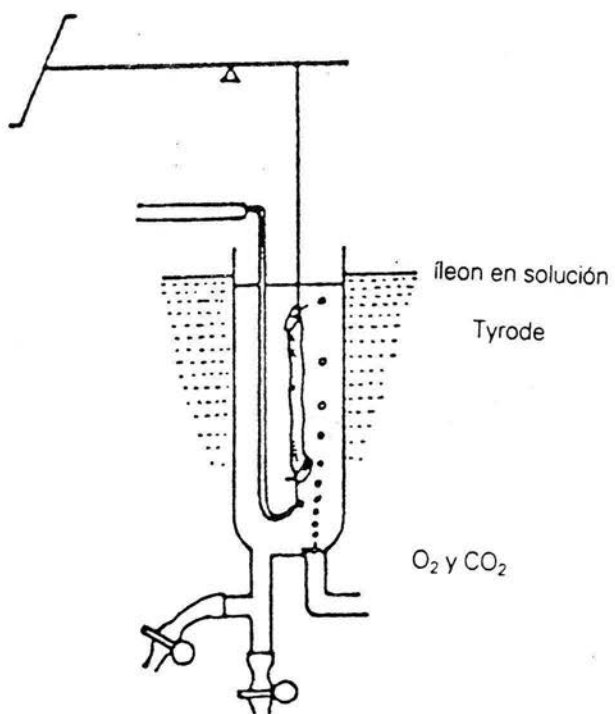


FIGURA 10: Ensayo biológico. El fleon permaneció en una cámara para órgano aislado con solución de Tyrode a 30° C y burbujeo continuo de una mezcla de O₂ y CO₂ (95: 5).

Después de una serie de ensayos se determinó que en el íleon aislado de rata se puede realizar una curva dosis - respuesta a BK empleando las siguientes concentraciones 2.5, 7.5, 17.5, 37, 74.4 y 143 nM, con esta última concentración se obtuvo el 100 % de la respuesta contráctil.

De los registros (Figura 11) se consideró el desplazamiento máximo obtenido en mm para bradicinina 143 nM como el valor del 100 % de respuesta y los porcentajes de respuesta menores obtenidos con las concentraciones menores de bradicinina se calcularon de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ Respuesta} = \frac{\text{Desplazamiento (mm)}}{\text{Desplazamiento Máx. (mm)}} \times 100$$

Con los datos obtenidos se construyeron curvas dosis- respuesta, para lo cual se graficó el logaritmo de la concentración de BK contra la fuerza de contracción expresada como porcentaje de la respuesta máxima.

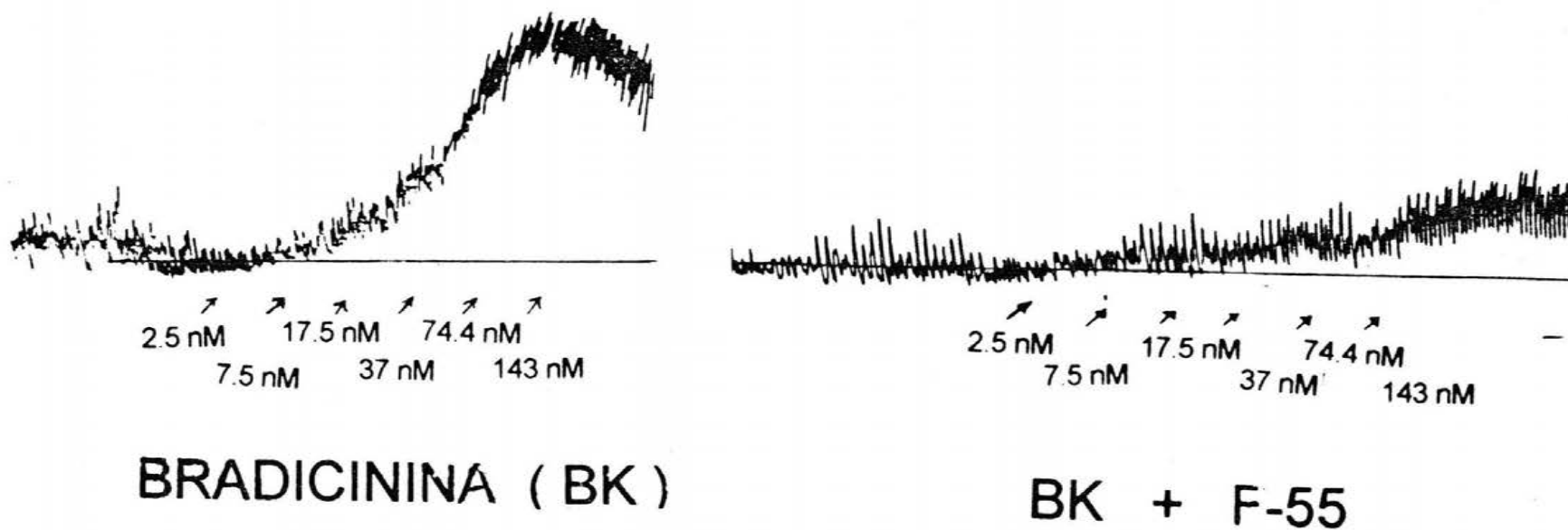


FIGURA 11: Registro de una curva dosis - respuesta a: a) bradycinina (Bk) y b) bradycinina incubada con la fracción F-55 en íleon aislado de rata.

2.5. FILTRACION EN GEL DE SEPHACRYL S-500HR.

Con en fin de eliminar los polisacáridos de alto peso molecular (mucílagos) que hacen muy viscosa la solución de la fracción 55 y como preparativo para su filtración en Sephadex G-100, se pasó esta fracción por una columna de Sephacryl S-500HR.

La columna de Sephacryl se preparó de la siguiente manera:

25 g de Sephacryl S-500HR se resuspendieron en 500 ml de Tris 0.05 M, pH 7, se agitó enérgicamente hasta obtener una mezcla homogénea; después se dejó reposar por 15 min, se separó el sobrenadante por decantación y se adicionaron 200 ml de la misma solución reguladora. La operación anterior se repitió dos veces más y el sedimento final se resuspendió en 200 ml de Tris. Se empacó una columna de 40 cm de altura y 2 cm de diámetro y se equilibró por 48 horas con Tris 0.05 M, pH 7 a 4° C (Hagel y col., 1989; Pharmacia Fine Chemicals, 1990).

La fracción 55 se resuspendió en amortiguador de fosfatos 0.05 M y NaCl 0.15 M, pH 7, se filtró a través de la columna de Sephacryl S-500HR y se empleó el mismo amortiguador como eluyente a una velocidad de flujo de 21 ml / h a 4° C (Hagel y col, 1989).

El filtrado se precipitó con sulfato de amonio para concentrar la muestra; se resuspendió y dializó contra agua destilada a 4° C por 48 horas, después se liofilizó para obtener la fracción SH; posteriormente se determinó la actividad anti-BK.

2.6. FILTRACION EN GEL DE SEPHADEX G-100.

La columna de Sephadex G-100 se preparó de la misma manera que la columna de Sephacryl S-500HR.

La fracción SH se resuspendió en amortiguador de fosfatos 0.05 M y NaCl 0.15 M, pH 7, se filtró a través de la columna de Sephadex G-100 y se empleó el mismo amortiguador como eluyente a una velocidad de flujo de 20 ml / h a 4° C. Empleando un colector automático de fracciones Beckman modelo 132, se obtuvieron fracciones de 2 ml, a las que se determinó su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. Lambda 11 UV /Vis (Hagel y col, 1989).

2.7. DETERMINACION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS.

Se determinó la concentración de proteínas y carbohidratos de las fracciones con actividad antibradicinina, por los métodos de Bradford y del fenol ácido sulfúrico, respectivamente.

2.7.1. DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD.

Se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina, de 10 a 100 mg en 100 ml de agua destilada, se adicionaron 5 ml del reactivo de azul de Coomasiee G250 y se mezcló evitando la formación de espuma; las muestras se leyeron a 595 nm después de 2 minutos y antes de una hora de haber preparado las muestras.

Para determinar la concentración de proteínas de cada una de las fracciones, se resuspendió 1 mg en 100 ml de agua destilada y se le adicionaron 5 ml del reactivo de azul de Coomasiee G250, también se leyeron a 595 nm (Hammond, 1984).

2.7.2. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS POR EL METODO DEL FENOL ACIDO-SULFURICO.

Se realizó una curva estándar con dextrán, de 10 a 100 mg en 500 ml de agua destilada, se adicionó 1 ml de fenol al 5 % y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado; las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min, después se incubaron a 30° C por 20 minutos y se leyeron a 490 nm.

Para determinar la concentración de carbohidratos de cada una de las fracciones, se disolvió 0.5 mg en 500 ml de agua destilada; las muestras se sometieron al procedimiento antes descrito (Sturgeon, 1990).

2.8. ELECTROFORESIS.

Para conocer el grado de pureza de la fracción GB, así como para la determinación aproximada del peso molecular de las proteínas presentes en esta fracción, se analizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 %.

El tamaño de los geles fue de: 60 x 90 x 1 mm. Después de preparar la matriz de poliacrilamida del gel separador (Ver apéndice); se adicionó agua destilada en la superficie del gel para que la polimerización fuera homogénea (polimeriza en 30 minutos). Una vez asegurada la polimerización del gel separador, se eliminó la capa de agua y se aplicó 1 ml de la mezcla del gel concentrador (Ver apéndice). Sobre la solución del gel concentrador se colocó un peine para la formación de los pozos de aplicación de las muestras, evitando la formación de burbujas (polimeriza en 30 minutos). Una vez que el gel concentrador polimerizó se llenaron los compartimentos de la cámara con el amortiguador de corrida glicina 0.192 M, Tris 0.025 M, SDS 0.1 % (Smith, 1984).

Se colocaron 50 µg de la fracción GB y 6 µl de proteínas patrón (Sigma electroforesis calibration); en ambos casos se mezcló en relación 1:1 con amortiguador de muestra 2x (Ver apéndice). Las muestras se depositaron en los pozos evitando que se mezclaran con el amortiguador de corrida (Smith, 1984).

Para la migración de las muestras se aplicaron 120 mV. Se suspendió la electroforesis hasta que el colorante azul de bromofenol usado como

indicador migró al final del gel, aproximadamente en 1 hr (Equipo de electroforesis Bio Rad modelo Mini Protean II Cell) (Smith. 1984).

El gel se introdujo en una solución fijadora de colorante (Ver apéndice) durante 24 hrs; después se dializó en una solución de ácido acético-metanol-agua (Ver apéndice) para eliminar el excedente de colorante, efectuando varios cambios y cuidando de no exceder el proceso de decoloración (Smith. 1984).

2.1. Se tomaron medidas del máximo corrimiento del indicador, así como de la migración de proteínas para el cálculo de los Rf's, con los cuales se elaboró una curva de calibración para así determinar el peso molecular de las proteínas presentes en la fracción GB (Smith, 1984).

2.9 ANALISIS ESTADISTICO:

Para evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la Prueba de "t" de Student para una $P < 0.05$.

III. RESULTADOS.

3.1. CURVA DOSIS RESPUESTA A BRADICININA:

Después de una serie de ensayos se determinó que en el íleon aislado de rata, es posible obtener una curva dosis respuesta a bradicinina; las concentraciones administradas fueron 2.5, 7.5, 17.5, 37, 74.4, 143 nM; siendo la concentración de 143 nM con la cual se obtuvo el 100 % de la respuesta máxima del intestino.

En la Fig.12 se muestra la curva semilogarítmica dosis- respuesta a bradicinina, en la cual se observa que la respuesta del tejido a la bradicinina es dependiente de la concentración; cuando se aplicó 143 nM de bradicinina la respuesta fue máxima, ya que al aplicar concentraciones mayores de 143 nM la respuesta permaneció constante.

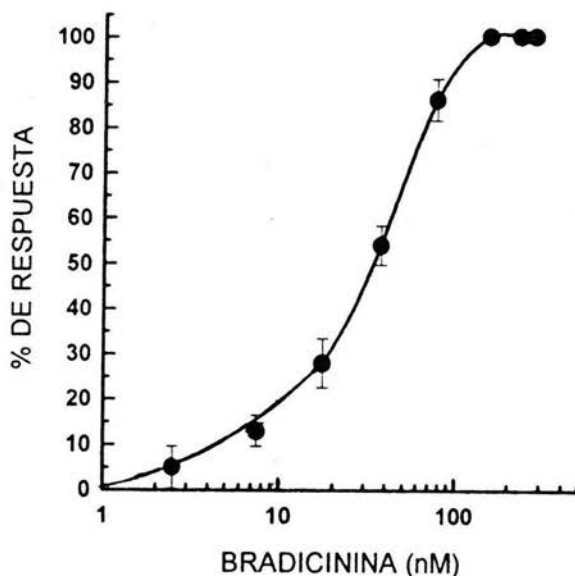


FIGURA 12: Curva dosis-respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm E.E.M.$, n=6).

3.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBRADICININA DEL GEL DE *A. barbadensis*.

En la curva dosis respuesta a bradicinina previamente incubada con la fracción F-1 se observa que disminuyó la respuesta del intestino a la bradicinina, en comparación con el control, como puede observarse en la figura 13.

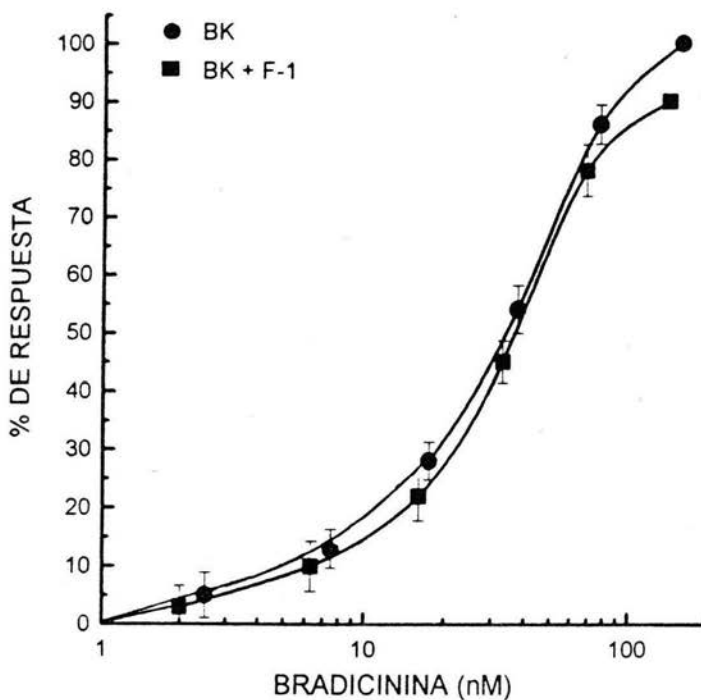


FIGURA 13 : Efecto de la fracción F-1 sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm E.E.M$; $n=6$) ($p < 0.05$).

Una forma rápida y sencilla de conocer si el material con actividad antibradicinina era de naturaleza proteínica, fue hervir la fracción F-1 por 10 min. Después se incubó con la bradicinina y se valoró la actividad antibradicinina mediante el bioensayo, con esta mezcla se obtuvo el 100 % de la respuesta de la misma forma que en el control como puede observarse en la figura 14.

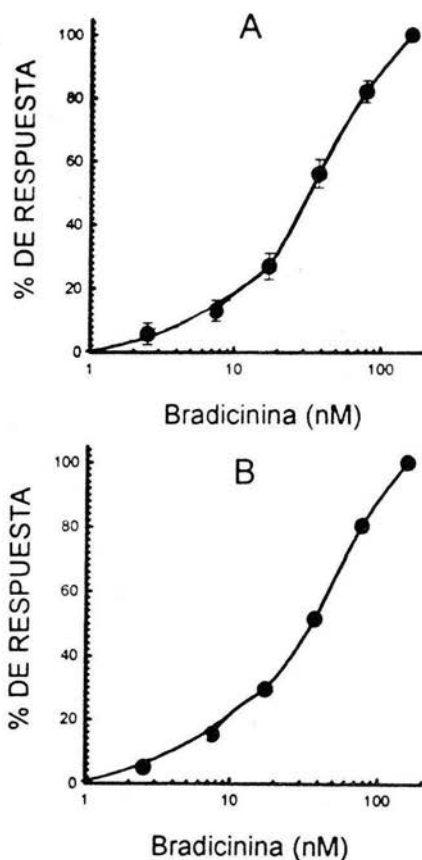


FIGURA 14: Respuesta del íleon aislado de rata a: a) bradicinina y b) bradicinina incubada con la fracción F-1 hervida; ($\bar{x} \pm$ E.E.M.; $n = 6$) ($p < 0.05$).

3.3. AISLAMIENTO DEL MATERIAL CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA DEL GEL DE A. barbadensis.

3.3.1. FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO:

Las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio fueron F-35, F-55, F-75 y F-100, las cuales se incubaron por separado con bradicinina y se determinó su actividad antibradicinina; en la figura 15 se puede observar que solamente la fracción F-55 disminuyó la actividad de la bradicinina en la preparación de intestino aislado.

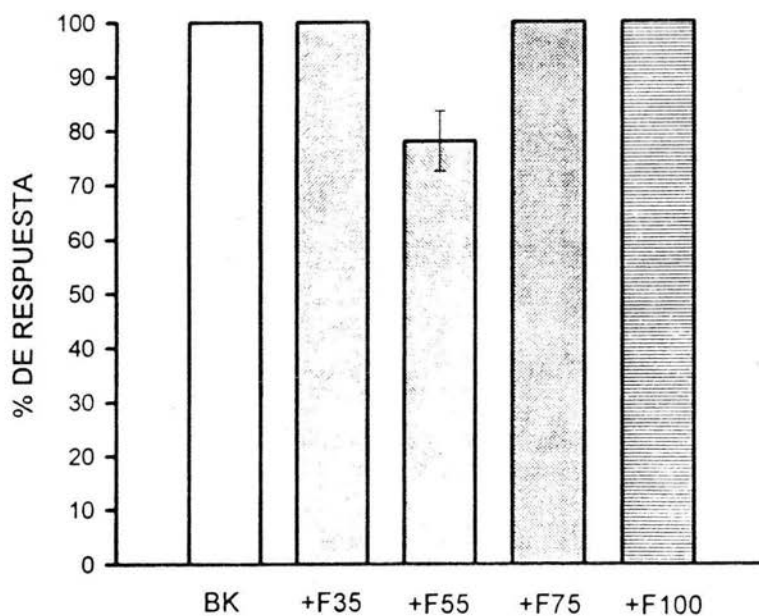


FIGURA 15 : Efecto de las fracciones: F35, F55, F75 y F100 sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm$ E.E.M.; n = 6) (p < 0.05).

La Figura 16 muestra la curva dosis-respuesta a BK previamente incubada con la fracción F-55; como puede observarse la respuesta del intestino es menor en relación a la curva control.

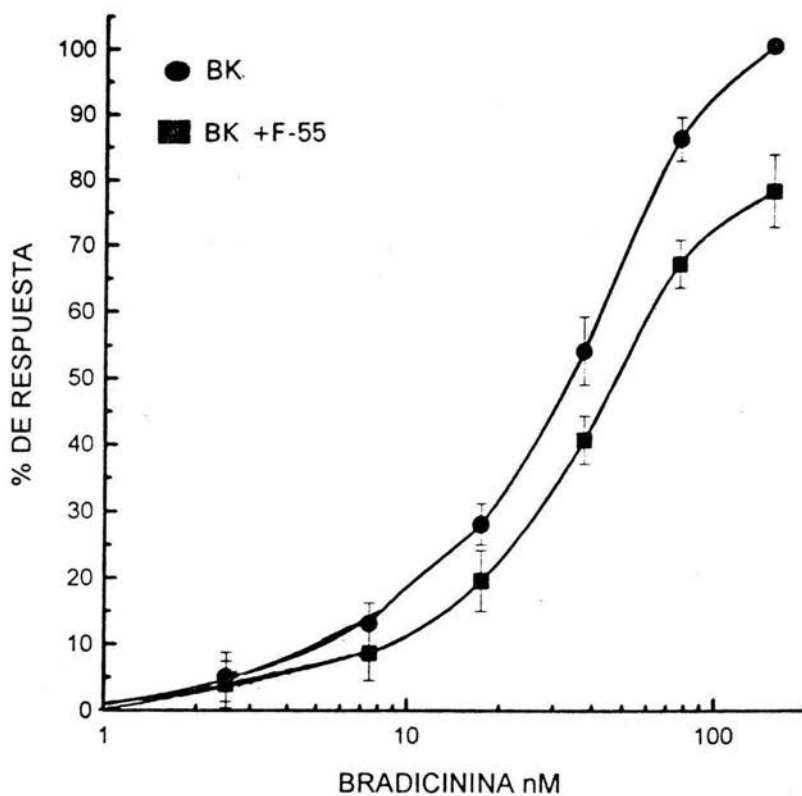


FIGURA 16 : Efecto de la fracción F-55 sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm E.E.M$; $n = 6$) ($P < 0.05$).

3.3.2. FILTRACION DE LA FRACCION F-55 A TRAVES DE SEPHACRYL S-500HR.

Al realizar el bioensayo con las fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio a diferentes porcentajes (35, 55, 75 y 100%), se observó que sólo la F-55 tuvo actividad antibradicinina; esta fracción se filtró a través de una columna de Sephacryl S-500HR para eliminar los carbohidratos, y al incubar bradicinina con la fracción obtenida de esta columna (F-SH) y realizar el bioensayo se observó un significativo efecto antibradicinina, como puede observarse en la figura 17.

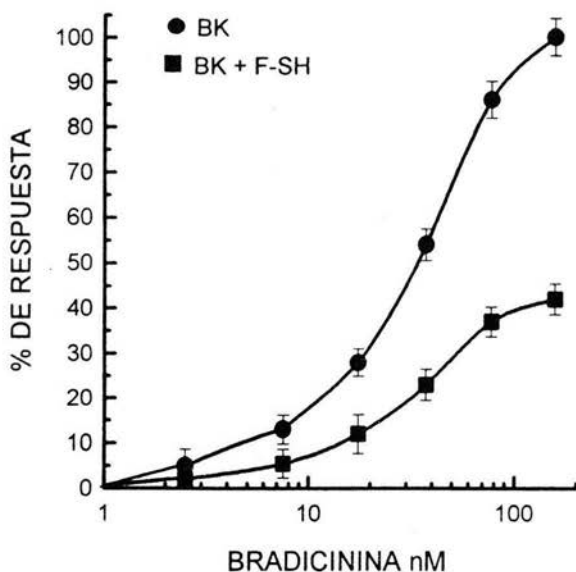


FIGURA 17: Efecto de la fracción F-SH sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm E.E.M$; $n = 6$) ($p < 0.05$).

3.3.3. FILTRACION DE LA FRACCION F-SH A TRAVES DE SEPHADEX G-100.

La fracción F-SH proveniente de la fracción F-55; se filtró a través de una columna de gel de Sephadex G-100, para separar proteínas en base a su peso molecular. De ésta columna se colectaron 110 fracciones de 2 ml y a cada una se le determinó su absorbancia a 260 nm. En la Figura 18 se muestra la gráfica del número de fracción contra su absorbancia, observándose 4 picos, en base a esto se reunieron las muestras que quedaron dentro del área de cada pico, formándose así 4 fracciones: F-GA, F-GB, F-GC y F-GD.

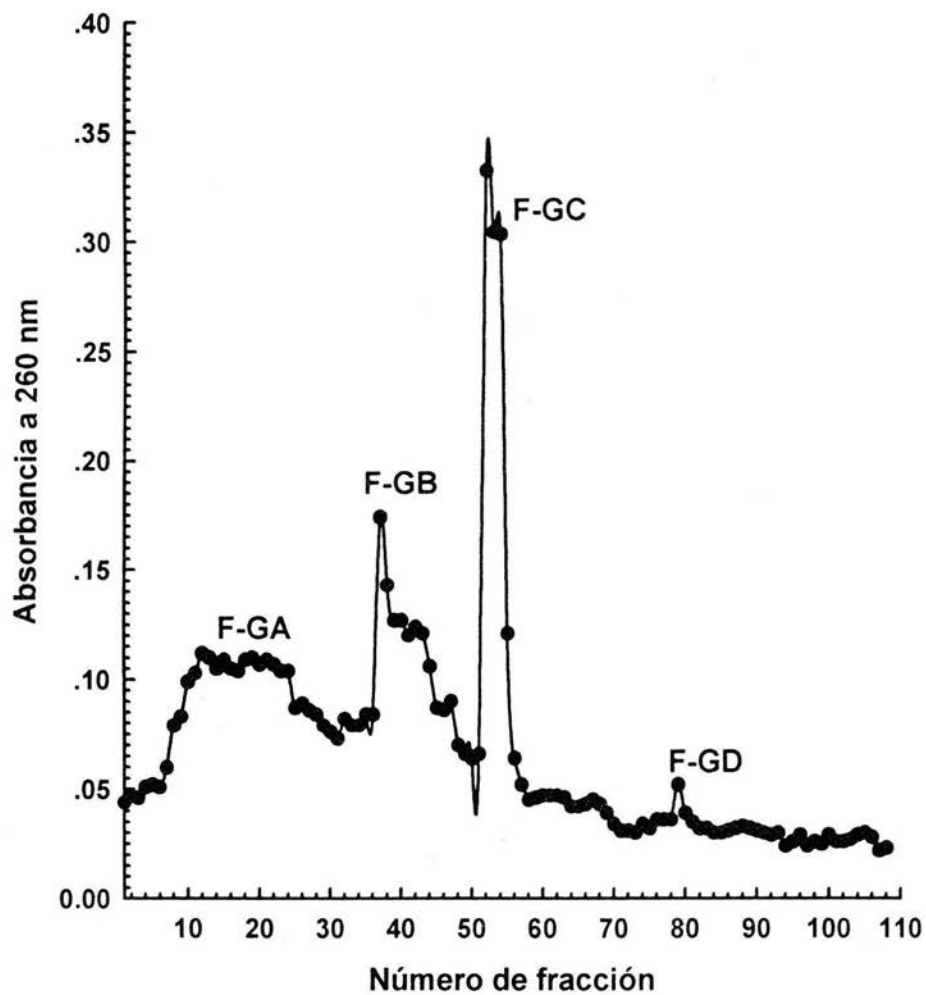


FIGURA 18: Perfil de elución de la fracción F-SH filtrada a través de una columna de Sephadex G100.

Se incubó la bradicinina con cada una de las fracciones y se ensayaron en el íleon aislado de rata; en la Figura 19 se puede observar que sólo la fracción F-GB mostró actividad antibradicinina disminuyendo la respuesta máxima en un 67%.

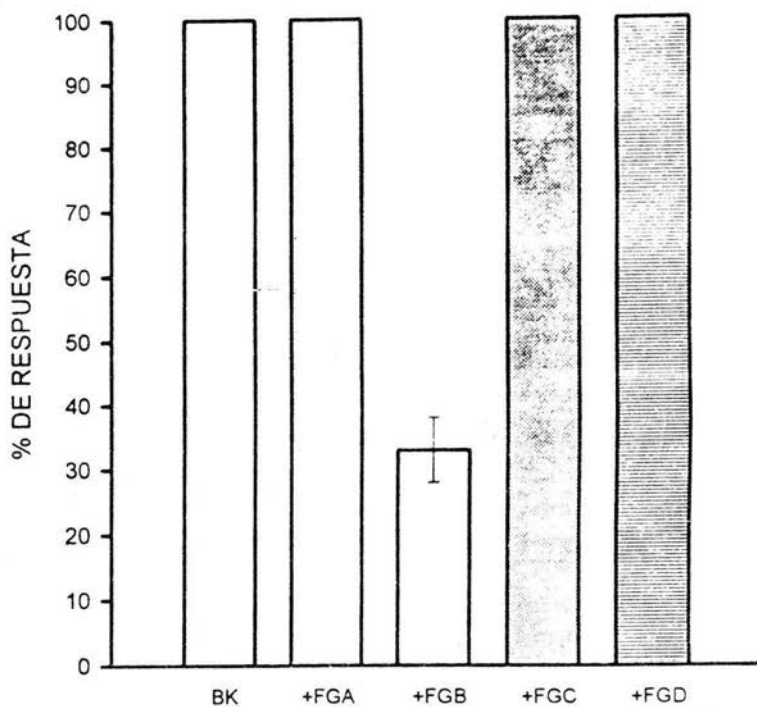


FIGURA 19 : Efecto de las fracciones: GA ;GB ;GC y GD sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata (\bar{x} ± E.E.M.; n= 6) ($p < 0.05$).

En la Figura 20 se muestra la curva dosis-respuesta a BK incubada con la fracción F-GB.

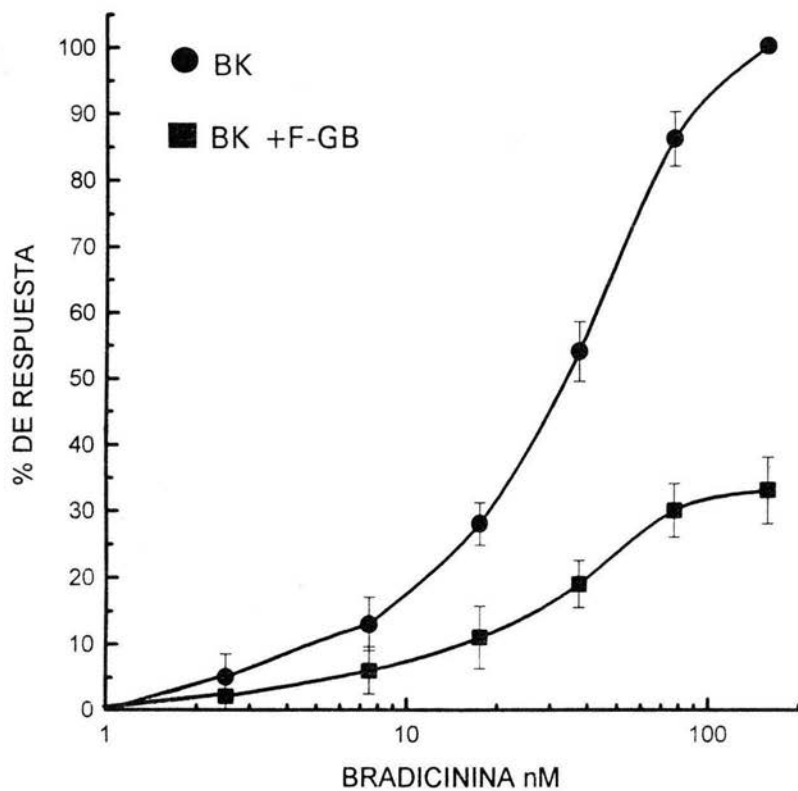


FIGURA 20: Efecto de la fracción F-GB sobre la respuesta a bradicinina del íleon aislado de rata ($\bar{x} \pm E.E.M.$; $n = 6$) ($P < 0.05$).

3.4. COMPOSICION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA.

En la Tabla 3 se muestran los datos que corresponden a la composición porcentual de proteínas y carbohidratos presentes en las fracciones con actividad antibradicinina; puede observarse que después de la purificación parcial de la fracción F-1 aumentó la proporción de proteínas, mientras que la de carbohidratos disminuyó en cada una de las fracciones. La filtración por Sephacryl S-500HR eliminó los carbohidratos de alto peso molecular y concentró el material proteínico de la fracción F-SH. En la fracción F-GB solamente se encontró 9 % de carbohidratos.

Tabla 3: COMPOSICION DE PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA DEL GEL DE *A. barbadensis*.

| ETAPA DE PURIFICACION | PORCENTAJE DE: | |
|---|----------------|---------------|
| | PROTEINAS | CARBOHIDRATOS |
| Gel Homogenado (F-1) | 51 | 49 |
| Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 55 % de saturación (F-55) | 69 | 31 |
| Sephacryl S-500HR (F-SH) | 76 | 24 |
| Sephadex G-100 (F-GB) | 91 | 9 |

3.5. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA.

En la Tabla 4 se observa que conforme avanzó el proceso de purificación de la fracción F-1, se incrementó la actividad específica, también se puede observar que el índice de purificación del material antibradicinina fue de 7.2 veces en la fracción F-GB con respecto a la fracción F-1. Estos datos de purificación de proteínas y de actividad específica, también se correlacionan con la actividad antibradicinina, como puede observarse en la Figura 26, ésta fue del 67% para la fracción GB.

Tabla 4: ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA.

| ETAPA DE PURIFICACION: | ACTIVIDAD ESPECIFICA nmol BK / min / g proteína | INDICE DE PUREZA |
|---|---|---------------------|
| Gel Homogenado (F-1) | 103.63 | 1.00 |
| Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 55 % de saturación (F-55) | 267.89 | 2.58 |
| Sephacryl S-500HR (F-SH) | 470.26 | 4.54 |
| Sephadex G-100 (F-GB) | 747.46 | 7.21 |

3.6. CARACTERIZACION DEL MATERIAL CON ACTIVIDAD ANTIBRADICININA.

En la Figura 21 se muestra la separación electroforética en gel de poliacrilamida al 10 % de las proteínas presentes en la fracción GB; se observan dos bandas de proteínas en el carril en el que se colocó la fracción F-GB.

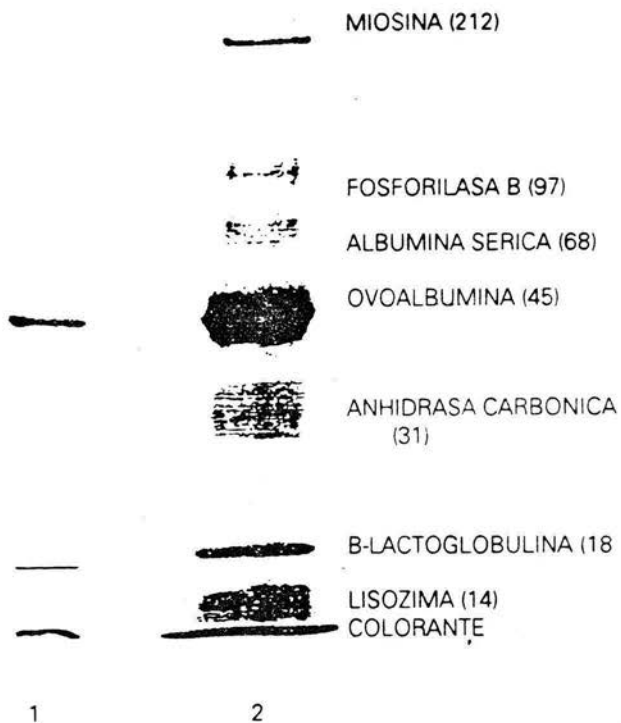


FIGURA 21: Separación electroforética en gel de poliacrilamida al 10 % con SDS de la fracción GB (carril 1, 50 ug). En el carril 2 se muestran los marcadores de peso molecular utilizados.

En la Figura 22 se muestra la curva patrón realizada con las proteínas estándares, las cuales fueron: miosina (212 000), fosforilasa B (97000), albúmina sérica (68000), ovoalbúmina (45000), anhidrasa carbónica (31000), B-lactoglobulina (18000), lisozima (14000); como puede observarse en la gráfica la movilidad de las proteínas es inversamente proporcional a su peso molecular. Con esta curva se estimaron los pesos moleculares aproximados de las dos bandas de proteínas separadas de la fracción activa (F-GB), siendo éstos de 40, 000 y 20, 000 Daltones; también se observa en el gel que la mayor proporción corresponde a la proteína de 40 kDa.

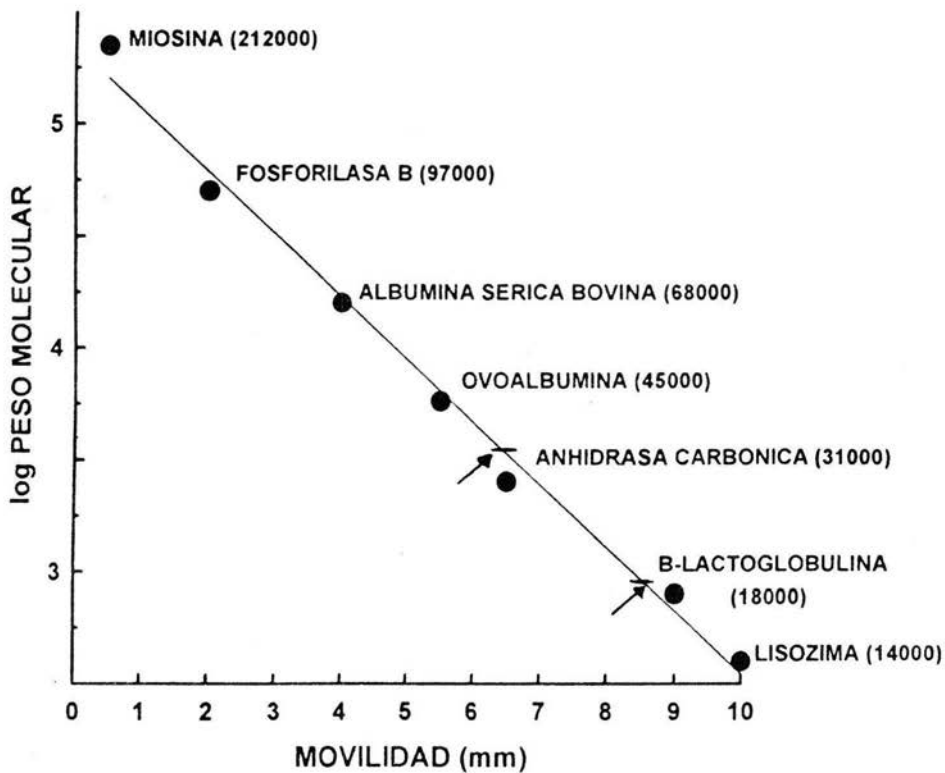


FIGURA 22: Curva de calibración de peso molecular. El R_f se determinó dividiendo la distancia en cm en que se encontró la banda de proteína entre la distancia de migración del colorante azul de bromofenol. Las proteínas marcadoras utilizadas se indican sobre la gráfica. Las flechas señalan los puntos que corresponden a la movilidad de las 2 bandas de proteínas de la fracción GB.

IV. DISCUSION

En el presente trabajo se utilizó el homogenado del gel de *Aloe barbadensis* para estudiar si existen compuestos con actividad antibradicinina; respuesta que ayudará a explicar el efecto antiinflamatorio que la tradición y la cultura médica popular le atribuyen al gel de *Aloe barbadensis*.

Se estandarizó el ensayo biológico, que consiste en curvas dosis-respuesta a bradicinina en la preparación del íleon aislado de rata, esto fue necesario para conocer las concentraciones a las que responde el tejido, y así determinar la actividad antibradicinina del extracto. Partimos de las concentraciones empleadas por Rodríguez y col. (1992) en el íleon aislado de cobayo; en el cual obtuvieron la respuesta máxima con 40nM. En el presente trabajo la respuesta contráctil máxima se obtuvo con bradicinina 143 nM (Figura 12); de lo cual resultó que el íleon de rata es 3.5 veces menos sensible que el íleon de cobayo, pese a lo cual fue posible determinar la actividad antibradicinina de las fracciones aisladas del Aloe. Este proceso de estandarización fue importante porque no existen reportes de curvas dosis-respuesta a bradicinina en íleon aislado de rata.

Fujita y col. (1976); Yagi y col. (1982) aislaron de otras especies de *Aloe* una glicoproteína con actividad antibradicinina. Tomando en cuenta este antecedente, se incubó bradicinina con el homogenado del gel de *A. barbadensis* (F-1) para determinar la actividad antibradicinina. En el ensayo biológico la respuesta contráctil máxima a bradicinina del íleon de rata disminuyó el 10 % en comparación con el control (figura 13). Para corroborar la naturaleza proteínica del material con actividad antibradicinina, se sometió la fracción (F-1) a ebullición; en el ensayo biológico no se observaron diferencias entre la BK incubada con la fracción hervida y el control (Figura 14.); es decir desapareció la actividad antibradicinina, suponemos que por desnaturalización de proteínas.

Esta evidencia nos reafirmó que el material con actividad antibradicinina es de naturaleza proteínica y que requiere su estructura nativa para su actividad; por lo cual para continuar con el aislamiento del principio activo antibradicinina se utilizaron procedimientos para la extracción y purificación de proteínas.

En la etapa inicial del aislamiento de proteínas se utilizó el fraccionamiento con sulfato de amonio (35, 55, 75, 100) técnica común para este propósito. Las proteínas precipitadas con sales neutras como el

fracción obtenida con sulfato de amonio al 55 % de saturación mostró actividad antibradicinina (figura 17).

Para eliminar los polisacáridos que hacen viscosa la solución de la F-55 y prepararla para la cromatografía de filtración en gel, se pasó a través de una columna de Sephacryl S-500 HR, que es un copolímero de alil dextrán y N,N'- metilén bisacrilamida y medio de elección para separar polisacáridos y otras moléculas con estructuras extendidas y aún partículas pequeñas como los plásmidos. En este paso, además de reducir la viscosidad de la fracción F-55, con la eliminación de polisacáridos se logró aumentar la actividad específica (tabla 4).

Para separar las proteínas presentes en la fracción F-SH en base a su tamaño molecular se filtró a través de una columna de Sephadex G-100, que es un gel formado con dextrán entrecruzado con epiclorina que permite la separación de proteínas entre 4 y 100 kDa. De la cromatografía se obtuvieron 4 fracciones, de las cuales la GB mostró actividad antibradicinina (figura 18).

Mediante la separación electroforética en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 % se determinó que en la fracción F-GB existen dos proteínas con un peso molecular de aproximadamente 40 y 20 kDa; siendo la primera la que se encuentra en mayor proporción (figura 21).

Se determinó la cantidad de proteínas en cada una de las fracciones con actividad antibradicinina para determinar su actividad específica. La actividad específica de cada fracción, se expresa en nanogramos de bradicinina hidrolizada por minuto por miligramo de proteína de la fracción con actividad antibradicinina. Después de las diferentes etapas de purificación a la que fue sometida la fracción F-1, se logró aumentar la actividad antibradicinina 7.2 veces.

La proporción de proteínas aumentó mientras que la carbohidratos disminuyó en cada una de las fracciones con actividad antibradicinina; la permanencia de carbohidratos aún después de varios pasos de purificación, nos sugiere que el material con actividad antibradicinina sea una glicoproteína.

Entre las perspectivas que presenta este trabajo podríamos considerar las siguientes: determinar el sitio en el que es hidrolizada la bradicinina.; estudiar la actividad antibradicinina en diferentes condiciones de pH y temperatura; y, analizar la composición de aminoácidos de la proteína con actividad antibradicinina.

V. CONCLUSIONES.

Se aisló del gel de *Aloe barbadensis* una fracción compuesta por dos proteínas de 20 y 40 kDa con actividad antibradicinina.

La actividad antibradicinina fue posible determinarla mediante el bioensayo del ileon aislado de rata.

La actividad antibradicinina explica en parte las propiedades antiinflamatorias atribuidas al gel de *A. barbadensis*.

VI. ANEXO:

SOLUCION TYRODE:

Composición (mM): NaCl (138), KCl (2.7), MgCl₂ (1.05), NaH₂PO₂ (0.42), NaHCO₃ (11.9), glucosa (5.5) y CaCl₂ (1.8).

DIALISIS.

Se utilizaron tubos para diálisis (Spectrapor # 4) de corte de 12 - 14 Kd. Los tubos se calentaron a 100 °C con 1 g de bicarbonato de sodio y 0.1 g de etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) en 100 ml de agua destilada. Una vez enfriados se hicieron varios lavados con agua destilada y se guardaron a 10 °C en refrigeración, hasta su uso.

REACTIVO DE BRADFORD.

Se disolvieron 10 mg de Azul de Coomassie G-250 en 5 ml de etanol 95 % ; en seguida se adicionaron 10 ml de ácido fosfórico 85 %; esta solución se llevó a un volumen final de 100 ml con agua destilada. El reactivo se filtró a través de papel Whatman No.1 y se conservó en una botella ámbar a temperatura ambiente.

SOLUCIONES STOCK PARA ELECTROFORESIS.

1.- Solución de monómeros: Se disolvieron 29.2 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada. Esta solución se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C.

2.- Amortiguador del gel de separador 4 % (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8) : 36.4 g de "Tris" se disolvieron en 100 ml de agua destilada y se ajustó a pH 8.8 con HCl. posteriormente se agregó agua destilada para obtener un volumen final de 200ml.

3.- SDS al 10 %: Se disolvieron 5 g de dodecil sulfato de sodio en 50 ml de agua destilada.

4.- Iniciador de gelificación: Se disolvió 1 g de persulfato de amonio en 10 ml de agua destilada.

5.- Amortiguador del gel concentrador 4 % (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8): 3 g de Tris se disolvieron en 25 ml de agua destilada y se ajustó la solución a pH 6.8 con HCl. Se ajustó con agua destilada a un volumen final de 50 ml.

6.- Amortiguador de corrida (glicina 0.192 M ; Tris 0.025 M; SDS 0.1 %) : A 28.8 g de glicina se adicionaron 6 g de Tris y 20 ml de la solución 3; posteriormente se agregaron 1000 ml de agua destilada y se corroboró que la solución tuviera un pH de 8.3 para posteriormente agregar 980 ml de agua destilada.

7.- Amortiguador de muestra 2x: Se preparó con 10 ml de la solución 5, 10 ml de la solución 2, 1 ml de β -mercaptoetanol, 10 ml de glicerol y 19 ml de agua destilada.

8.- Solución para teñir: A 0.25 g de azul de Coomassie R250 se disolvieron en 125 ml de metanol, 25 ml de ácido acético y 100 ml de agua.

9.- Solución para desteñir: Se mezclaron 100 ml de metanol, 25 ml de ácido acético y 800 ml de agua.

PREPARACION DEL GEL SEPARADOR:

Mini gel (10 %):

solución 1.....1.66 ml

solución 2.....1.25 ml

solución 3.....0.05 ml

solución 4.....0.40 ml

TEMED.....0.0025 ml

Agua destilada.....2.1 ml

PREPARACION DEL GEL CONCENTRADOR:

solución 1.....0.5 ml

solución 5.....1.25 ml

solución 3.....0.0125 ml

solución 4.....0.35 ml

TEMED.....5 ml

Agua destilada.....2.85 ml

VII. BIBLIOGRAFIA.

ARGUETA, V.A., CANO, A.L. Y RODARTE, M.E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. III: 1244-1245.

BARNES, P.J. and ADCOCK, L. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Tips*. 14: 436-441.

BAUMANN, H and GAULDIE, J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*. 15(2):74-80.

BENSON, R. C. (1982). *Aloe vera*, the wonder plant. Drug and cosmetic.

BURCH, R and KYLE, D. (1992). Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Science*. 50:829-838.

CLERICI, N. and LEYVAN-COBIAN, F. (1983). Generación de factores quimiotácticos por activación de las vías clásicas y alternativas del complemento. *Inmunología* 2 (1): 25-46.

COOPER, T. G. (1977). The tools of biochemistry. Ed. John Wiley and Sons. E.U.A.

DAVIES, P., BAILEY, P. and GOLDENBERG, M. M. (1984). The role arachidonic acid oxigenation products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 335-357.

DAVIS, R. H ., LEITHER, M. G., RUSSO, J. M. and BYRNE, M. E. (1989). Wound healing oral and topical activity of *Aloe vera*. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 79 (11): 559-562.

DAVIS, R. H., LEITHER, M. G., RUSSO, J. M. and BYRNE, M. E. (1989). Anti-inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 79 (6): 263-276.

DEY, P.M. and HARBORNE, J.B. (1990). Monosaccharides en: STURGEON R.J. *Methods in plant biochemistry*. vol. 2, Ed. Academic Press. San Diego. 1-3.

DIAZ, J. L. (1976). Índice y sinónimia de las plantas medicinales de México. Instituto de investigaciones Biomédicas de la UNAM. IMEPLAN. México.

DRAY, A. and PERKINS, M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. Trends Neurosci 16 (3): 99-104.

DRAY, A. and BEVAN, S. (1993). Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. TIPS. 14: 287-290.

FUJITA, K., TERADAIRA, R. and NAGATSU, T. (1976). Bradykininase activity of aloe extract. Biochem. Pharmacol. 25: 205.

GRINDLAY, D. and REYNOLDS, T. (1986). The *Aloe vera* Phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. Journal Of Ethnopharmacology. 16: 117-151.

GOODMAN, L.S. Y A. GILMAN (1991). Bases farmacológicas de la terapéutica. De. Médica Panamericana, México. pp. 565-587.

HAGEL, L., LUNDSTROM, H., ANDERSSON, T., LINDBLOM, H. (1989). Properties in theory and practice of novel gel filtration media for standard liquid chromatography. Journal of Chromatography, 476: 329-344.

HAMMOND, J. and Kruger N.J. (1984). The Bradford method for protein quantitation ; en: WALKER. M. Methods in molecular biology; New Proteins Techniques. vol 3. Ed Humana Press. United States Of America.

HENRY, R. (1979). An updated review of *Aloe vera*. Cosmetics and Toiletries 94:42-50.

HIGGS, G.A., SALMON, J.A., HENDERSON, B and VANE, J.R. (1987). Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1417-1420.

HURTADO, C. L. G. y MARTINEZ, M. (1984). *Aloe vera* . Trabajo monográfico mancomunado. Tesis Facultad de Química. UNAM.

LINDGREN, J. (1993). Transcellular biosynthesis of leukotrienes and lipoxins via leukotriene A4 transfer. TINS 14:

LOPEZ VILAFRANCO, Ma. Edith (1988). Contribución etnobotánica en plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos de Mecalapa, Municipio de Pantepec, Puebla. Tesis. E.N.E.P. Iztacala, UNAM.

MARTINEZ, M. (1961). Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México.

OKAZAKI, T., SAGAWA, N., OKITA, J. R., BLEASDALE, J. E., McDONALD, P. C and JOHNSTON, J. M. (1981). Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J. Biol. Chem.* **14** (256):7316-7321.

PERRY, W. L. (1970). Pharmacological experiments on isolated preparations. 2a ed. Edinburgh London and New York.

PHARMACIA FINE CHEMICAL. (1990). Sephadex gel filtration in theory and practice.

PROUD, D and KAPLAN, (1988). Kinin formation disorders. *Annu Rev. Immunol.* **6**:49-83.

REYNOLDS, G. W. (1966). The aloes of tropical Africa and Madagascar. The trustees, the *Aloes* book fund. Mbabane, Swaziland.

RODRIGUEZ, B. M., CRUZ, N. I and SUAREZ, A (1988). Comparative evaluation of *Aloe vera* in the management of burn wounds in guinea pigs. *Plast. Reconstr. Surg.* **81** (3): 386-389.

RODRIGUEZ, M.S., SCHAFFEL, R., ASSREUY, J. (1992). Comparative study on the mechanism of bradykinin potentiation induced by bradykinin-potentiating peptide 9a, enalaprilat and Kinin-potentiating peptide. *European Journal of Pharmacology*; **216**: 357-362.

SCOPES, R.K (1988). Protein Purification Principles and Practice. Ed. Springer verlay. 2a ed. México.

S.D.P.U. (1974). Experiments on isolated preparations. 2a ed. Churchill Livingstone, Edinburgo.

SMIT, B.J. (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins; en: WALKER. M. Methods in molecular biology; Proteins. vol 1. Ed umana Press. United States Of America.

VAZQUEZ , B., AVILA, G., SEGURA, D. AND ESCALANTE, B. (1996). Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J. of Ethnopharmacology 55: 69-75.

VAZQUEZ , C. B ; MORALES L. R ; SEGURA C. D . (1994). Efecto analgésico y antiinflamatorio de tres extractos de ALOE VERA . XXXVII Congreso nacional de Mérida, Yucatán.

WALLER, G. R. (1978). A chemical investigation of *Aloe barbadensis*. Proc. Okla. Acad. Sci. 58: 69-76.

YAGI, A., HARADA, N., YAMADA, H., IWADARE, S. and NISHIOKA, I. (1982). Antibradykinin active material in *Aloe saponaria*. J. Pharm. Sci. 71: 73-75.

YAGI, A., HARADA, N., SHIMOMURA, K. AND NISHIOKA, I. (1987). Bradykinin-degrading glycoprotein in *Aloe arborescens* var. *natalensis*. Planta Medica 62:19 - 21