

PRACTICA ELECTIVA-BIOQUIMICA

Inhibición de las actividades coagulante, hemolítica y proteolítica de veneno de yarará por extractos de *Plantago tomentosa* (llantén).



Alumna: Ramírez, Nadia Carolina

Directora: Bioquímica Torres, Ana María

Lugar: Laboratorio de productos naturales Profesor Armando Ricciardi, FaCENA- UNNE.

Año: 2022

INTRODUCCIÓN

El llantén, como se lo conoce vulgarmente, es una hierba originaria de Europa y Asia. En el nordeste de Argentina se encuentra la especie *Plantago tomentosa* var *napiformis*, considerada una maleza. Es utilizada en la medicina tradicional como diurético, antidiarreico, expectorante, antiulceroso y hemostático. También se utiliza para infecciones cutáneas, conjuntivitis, quemaduras y picaduras de insectos (Chiang et al., 2002, 2003; Ronsted et al., 2003)

Por otra parte el uso de plantas como antiveneno ha sido ampliamente estudiado por diferentes autores por su capacidad de aliviar uno o varios síntomas como dolor, sangrado, inflamación, infección o incluso envenenamiento.

Cerca del 98% de los accidentes ofídicos son producidos por especies que pertenecen al género *Bothrops*. *Bothrops diporus* es el principal ofidio de interés y es conocido genéricamente como “yarára chica”. Su veneno destruye los tejidos, altera la coagulación sanguínea y produce lesiones locales muy importantes y hasta ahora la única terapia existente frente a un accidente es la utilización de un suero antiveneno. Esto representa un grave problema, sobre todo en las zonas rurales donde la población se encuentra alejada de los centros de salud. Debido a esto es importante la búsqueda de tratamientos alternativos para accidentes por picaduras de víboras del género *Bothrops*.

Se sabe que los extractos de *P. tomentosa* contienen aminoácidos, azúcares, alcaloides, taninos, aceites esenciales, lactonas, terpenos, saponinas, fenoles y glucósidos iridoides (Ramírez et al., 2018). Estos compuestos pueden explicar la acción potencial de los extractos ya que algunos, como los taninos, pueden participar en la inhibición de la actividad de las fosfolipasas y/o neutralización de la actividad proteolítica y efectos hemorrágicos de los venenos.

Los objetivos de este trabajo son: obtener extractos de llantén y realizar un screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE contra el veneno de *B. diporus*; analizar en el extracto activo la capacidad de inhibir las actividades hemolítica indirecta, coagulante y proteolítica del veneno de yarára; como así también profundizar conocimientos sobre los fundamentos de técnicas como electroforesis SDS-PAGE, determinación del tiempo de coagulación (coagulómetro col 1) y de hemólisis (placas de agar sangre-fosfatidilcolina).

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal: se recolectaron tanto las partes aéreas como las raíces de *Plantago tomentosa* en el campus universitario en otoño de 2022. Además, se trabajó con muestras de primavera y verano disponibles en el laboratorio, con el objetivo de analizar y comparar la actividad de cada una (estudio estacional). Las muestras fueron nombradas como otoño (I), primavera (II) y verano (III). Un ejemplar fue enviado al herbario de Corrientes (IBONE) para determinar su especie, siendo identificado como *Plantago tomentosa* Lam. subsp. *napiformis* (Rhan) Rhan.

Preparación de los extractos: para acondicionar el material vegetal (I), se retiraron las partes atacadas por insectos/plagas, se dejó secar a temperatura ambiente sobre diarios, se eliminaron los restos de tierra y luego se lo separó en sus partes componentes. Se molieron con molinillo las hojas y raíces. El vegetal molido se pesó para calcular el rendimiento y se dividió en tres partes para preparar los extractos: acuoso (1), etanólico (2) y hexánico (3).

Los extractos se obtuvieron por maceración del material molido con el solvente correspondiente (relación 1:6).

Extracto acuoso: maceración durante 24 horas con agua destilada.

Extracto etanólico: maceración durante 48 horas con etanol 96%.

Extracto hexánico: maceración durante 48 horas con hexano.

Posteriormente los extractos se filtraron y se desecaron en rotavapor (40°C) a presión reducida hasta obtener un residuo sólido que se conservó en desecador al vacío hasta el momento de su uso, reconstituyéndose con el mismo solvente.

Veneno: se trabajó con veneno disponible en el laboratorio, el cual se obtuvo por expresión manual siguiendo la técnica de ordeño por personal capacitado del Serpentario de Corrientes. El veneno líquido obtenido de varios ejemplares de *B. diporus* se desecó a presión reducida y se guardó en el freezer hasta el momento de su uso, donde se lo reconstituyó con solución fisiológica.

Screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE

Se utilizó gel de separación al 12% y gel de concentración al 4% (Pilosoph y Bartolomai, 2000). Se sembraron patrones de bajo peso molecular (97,4 KDa, 66,2 KDa, 45 KDa, 31 KDa, 21,5 KDa, 14,4 KDa).

De cada uno de los extractos vegetales (acuoso, etanólico y hexánico) se pesaron 1,2 mg para el **extracto vegetal patrón** y 1,8 mg para el **extracto + veneno**. También se pesó 1mg de **veneno**. Se prepararon las soluciones:

Veneno patrón: a 1 mg de veneno se agregaron 300 uL de buffer muestra y 15 uL de mercaptoetanol.

Extracto vegetal patrón: a 1,2 mg de extracto se agregaron 50 uL de buffer muestra y 2,5 uL de mercaptoetanol.

Extracto + veneno: 0,25 mg de veneno en 10 uL de solución fisiológica se puso en contacto con una solución de 1,8 mg de extracto en 15 uL de agua, etanol o hexano de acuerdo a cada caso estudiado (relación veneno: extracto 1:7). Se incubó 30 minutos a 37°C y luego se agregaron 25 uL de buffer muestra para cortar la reacción y 2,5 uL de mercaptoetanol.

Todas las soluciones (veneno patrón, extracto vegetal patrón y extracto + veneno) se calentaron a baño maría a 100°C durante 5 minutos para producir la desnaturalización.

Patrón de siembra:

Calle 1: 5 uL de patrones de peso molecular.

Calle 2: 5uL de patrón de veneno de *B. diporus*.

Calles 3, 5 y 7: 3,5 uL de veneno más extracto (relación 1:7). En este caso se evalúa la capacidad neutralizante del extracto sobre el veneno. Aquellos que modifiquen el patrón de las proteínas del veneno en la electroforesis por desaparición de bandas o aparición de bandas de diferente peso molecular, son considerados activos.

Calles 4, 6 y 8: 5 uL de extracto patrón para descartar la presencia de proteínas vegetales que puedan interferir en la interpretación de los resultados.

Las corridas se realizaron a una intensidad constante de 15 mA por gel. Posteriormente se coloreó con azul de Coomassie R.

Se midieron las distancias de cada una de las bandas de los patrones de peso molecular y del veneno. Conociendo el PM de los patrones (log) y la movilidad de sus bandas, se aplicó regresión lineal. De esta forma, al calcular la inversa del logaritmo se obtuvo el PM de todas las proteínas del veneno. Se observaron las bandas del veneno en las calles de V+E considerando activo en este screening a todo extracto que modifique en alguna medida el perfil electroforético del veneno. Se indicaron los PM de las bandas modificadas.

Inhibición de la actividad procoagulante del veneno

Se utilizó un pool de plasmas obtenidos a partir de sangre anticoagulada con citrato de sodio y centrifugada 10' a altas revoluciones.

Se preparó una solución de veneno de *B. diporus* disolviendo 1 mg en 25 mL de solución fisiológica en matraz aforado.

Por otro lado se reconstituyó 1 mg de los extractos en 40 uL del solvente respectivo (agua, etanol 96° o hexano). 1mL de la solución de veneno se pre incubó con el extracto reconstituido (relación 1:25) durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente se añadió 100 uL de la solución de veneno o del sobrenadante del veneno más extracto (V+E) pre incubado a 100 uL de un pool de plasma para obtener el tiempo de coagulación del veneno (TCV) y el tiempo de coagulación del veneno más extracto (TC V+E) respectivamente. Este último permite cuantificar la capacidad del extracto de inhibir la actividad coagulante del veneno. Los extractos que fueron activos mostraron una prolongación del tiempo de coagulación por inhibición de las enzimas procoagulantes presentes en el veneno (*trombin like*). Los ensayos se realizaron por duplicado y/o triplicado utilizando un coagulómetro Col1 (Wiener). Se calculó el porcentaje de inhibición.

Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

Preparación de agar sangre – fosfatidilcolina: se pesó 3,7 g de agar base Columbia, se agregó una punta de espátula de azida de sodio (para evitar la contaminación), se disolvió en 100 mL de agua destilada y se calentó hasta hervor en vaso de precipitados.

Se lavó 3 veces el paquete globular con solución fisiológica por centrifugación para obtener los glóbulos rojos lavados. Se agregó además una solución de yema de huevo en solución fisiológica (1+2) para enriquecer el medio en fosfatidilcolina, necesaria para que

la fosfolipasa presente en el veneno (PLA2) la transforme en lisolecitina, la cual producirá hemólisis.

En una placa de Petri se colocó la solución de agar, los glóbulos rojos lavados y la yema de huevo, se mezcló y una vez que solidificó se hicieron pocillos con una pipeta Pasteur.

Se sembró 10 uL del sobrenadante de los distintos extractos previamente incubados con el veneno (relación veneno: extracto 1:25) durante 30 minutos a 37°C para evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos sobre la PLA2, responsable de la actividad hemolítica *in vitro* del veneno. Además se sembró la dosis hemolítica mínima del veneno (DHM: dosis que genera un halo de hemolisis de 10 mm de diámetro luego de 20 horas de incubación) puro como patrón.

Se incubó 20 horas a 37°C en cámara húmeda y transcurrido este tiempo se midió el halo de hemolisis. Los ensayos se realizaron por triplicado como mínimo. Se calculó el porcentaje de inhibición. Una reducción del halo respecto al producido por el veneno puro, indica inhibición de la actividad de la PLA2 del veneno.

Inhibición de la actividad proteolítica del veneno

Se realizó mediante la técnica SDS-PAGE con caseína, utilizando un gel de separación al 10% y de concentración al 4% (Pardo y Natalucci, 2002).

Se prepararon: solución madre de caseína 10 mg/mL (se reemplazó la caseína por leche descremada) disolviendo en buffer Tris-HCl 100 mM pH 8); solución de caseína patrón (Cp) diluyendo al medio la solución madre; solución madre de veneno 0,25 mg/mL en solución fisiológica; solución de veneno patrón (Vp) diluyendo al medio la solución madre; solución buffer muestra doblemente concentrada mezclando buffer Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 0,4% azul de bromofenol, 20% glicerol y 4 g de urea.

Por otra parte se reconstituyeron los extractos para extracto patrón (Ep) y veneno más patrón (V+E) con el solvente adecuado (agua, etanol 96° o hexano).

Los extractos para V+E se incubaron 1 hora a 37°C con 50 uL de la solución madre de veneno. En este período, si los extractos interactúan de alguna manera con las proteasas del veneno, se le da el tiempo y temperatura adecuados para que se produzca la inhibición. Al terminar la incubación se transfirió 50 uL del sobrenadante de los mismos en eppendorf nuevos.

Se agregó a todos los tubos de V+E, Ep y Vp, 50 uL de la dilución de caseína y se incubó 1 hora a 37°C. En este periodo, las proteasas del veneno remanente del V+E que no fueron inhibidos, las proteasas vegetales del extracto patrón (Ep) si es que las tuviera y el veneno patrón (Vp) con actividad proteolítica realizan la proteólisis de la caseína. Al finalizar la incubación se transfirieron 50 uL del sobrenadante de la reacción a eppendorf nuevos.

A todos los tubos de V+E, Ep y Vp, y además al tubo con caseína patrón (Cp) se agregó 50 uL del buffer muestra doblemente concentrada y se calentó a ebullición por 5' para desnaturalizar las proteínas.

Patrón de siembra:

Calle 1: 5 uL de caseína pura para evaluar el patrón de bandas correspondientes a la proteína.

Calle 2: 5uL de veneno preincubado 1 hora a 37°C con caseína donde no se observaron bandas debido a la proteólisis de la caseína (positivo de proteólisis).

Calles 3, 5 y 7: 5 uL del sobrenadante de los extractos preincubados con el veneno 1 hora a 37°C y luego 1 hora a 37°C con caseína. Si el extracto tiene acción inhibitoria de la actividad proteolítica, se verán las bandas correspondientes a la caseína, ya que si el veneno es inhibido por el extracto en la primera incubación, no puede producir la proteólisis de la caseína. Si el extracto no tiene actividad, el veneno producirá la proteólisis y no se observarán las bandas.

Calles 4, 6 y 8: 5 uL del sobrenadante de la incubación de caseína con el extracto vegetal para descartar la presencia de proteasas vegetales que puedan provocar la proteólisis de la caseína. La ausencia de proteasas se evidencia observando un perfil de bandas igual al de la caseína pura.

RESULTADOS Y DISCUSION:

COLECTA III-VERANO

1- Screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE

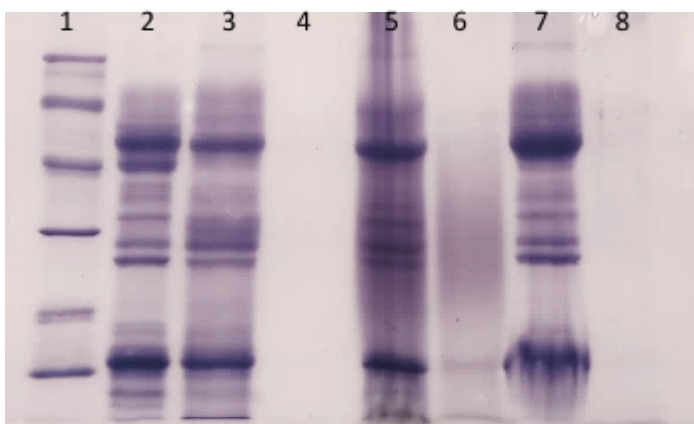


Figura 1: SDS-PAGE *Plantago tomentosa* var *napiformis* con veneno de *Bothrops diporus* Relación 1:7 V:E (partes aéreas). Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

Tabla 1: Curva de calibración de pesos moleculares.

Movilidad (mm)	log PM	PM (KDa)
6,4	1,99	97,4
13,2	1,82	66,2
22	1,65	45
31,2	1,49	31
42,6	1,33	21,5
51,1	1,16	14,4

2: curva de ca

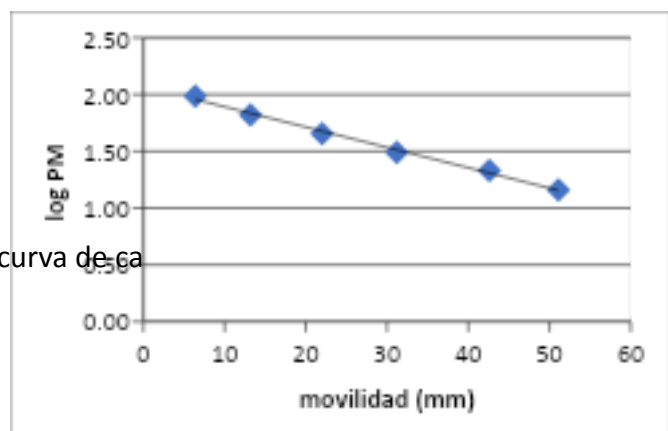


Tabla 2: Determinación del PM de los componentes del veneno de *B. diporus* y análisis de la actividad de los extractos.

Movilidad (mm) veneno	Log PM	PM (Kda)	PA1 + V	PA2 + V	PA3 + V	(↓:
12,2	1,85	71,2	-	-	-	
18,3	1,74	55,4	↓	-	-	
21,7	1,68	48,2	X	X	↓	
24,3	1,64	43,3	↓	X	-	
25,9	1,61	40,5	↓	X	-	
28,8	1,56	35,9	-	-	-	
32,8	1,48	30,5	-	-	-	
34,9	1,45	28,0	↓	↓	-	
43,9	1,29	19,3	-	X	↓	
45,2	1,26	18,3	-	X	↓	
49,5	1,19	15,3	↓	↓	-	
54	1,10	12,7	↓	X	X	
55,8	1,07	11,8	X	X	X	

disminución de la intensidad de la banda; X: desaparición de la banda; -: banda sin cambios).

Como puede observarse en la figura 1 y tabla 2, las PA1 del llantén disminuyen la intensidad de las bandas de 55,4; 43,3; 40,5; 28; 15,3 y 12,7 KDa del veneno. Además desaparecen las bandas de 48,2 y 11,8 KDa.

Las PA2 disminuyen la intensidad de las bandas del veneno de 28 y de 15,3 KDa. Mientras que las bandas de 48,2; 43,3; 40,5; 19,3; 18,3; 12,7 y 11,8 KDa desaparecen.

Por último, al ser tratado con PA3 disminuyen las bandas de 48,2; 19,3 y 18,3 KDa mientras que las bandas de 12,7 y 11,8 KDa desaparecen.

El resto de las bandas se observa sin modificaciones.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el extracto etanólico de las partes aéreas de *P. tomentosa* presentaría mayor actividad sobre el veneno de *B. diporus* que el extracto acuoso y hexánico.

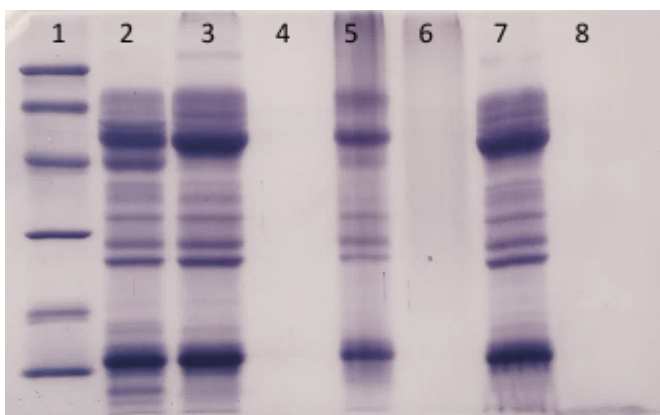


Figura 3: SDS-PAGE Relación 1:7 V:E (raíces). Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

Como se observa en la Figura 3, el extracto acuoso (R1) de la planta del llantén disminuye la intensidad de la banda de 48,2 KDa del veneno. Además desaparecen las bandas de 19,3; 12,7 y 11,8 KDa.

El extracto etanólico de raíces (R2) disminuye la intensidad de las bandas de 55,4; 48,2; 40,5; 35,9; 30,5; 28 y de 15,3 KDa. Mientras que las bandas de 43,3; 19,3; 18,3; 12,7 y 11,8 KDa del veneno desaparecen.

Por último, el extracto hexánico de raíces (R3) disminuye la intensidad de las bandas de 48,2; 19,3 y 18,2 KDa y desaparece las bandas de 12,7 y 11,8 KDa.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que el extracto etanólico de raíces (R2) de *P. tomentosa* presentaría mayor actividad sobre el veneno de *B. diporus*.

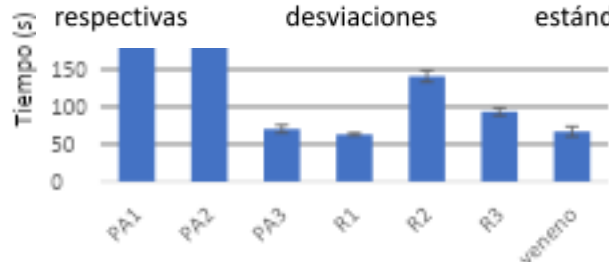
2- Inhibición de la Actividad Procoagulante

Tabla 3: medida de los tiempos de coagulación del veneno y de los diferentes extractos incubados con veneno de *B. diporus*.

	TC1	TC2	TC3	TC4	TC promedio	DE	% inhibición
PA1	189,5	196,2			192,85	4,7	29,07
PA2	243,6	253,5			248,55	7,0	41,94
PA3	64,6	75	71,3		70,3	5,3	0,77
R1	61,7	64,4			63,05	1,9	-0,90

R2	135,4	146,4			140,9	7,8	17,08
R3	89,9	97,1			93,5	5,1	6,13
veneno	59,8	62,9	71,9	73,2	66,95	6,6	

A: comparación de los tiempos de coagulación de una muestra de plasma al ser tratado con veneno y con las mezclas extracto + veneno y sus respectivas desviaciones estándares.



B: comparación de los porcentajes de inhibición de los diferentes extractos sobre el veneno de *B. diporus*.



Figura 3: Inhibición de la actividad procoagulante del veneno de *B. diporus* por extractos de *P. tomentosa* colectada en verano (III).

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 3 y Figura 3) se puede decir que el extracto etanólico de partes aéreas (PA2) de *P. tomentosa* de la estación de verano (III) es la que más prolonga el tiempo de coagulación del plasma, y por lo tanto el que mayor inhibición de la actividad coagulante presenta.

3- Inhibición de la actividad hemolítica indirecta

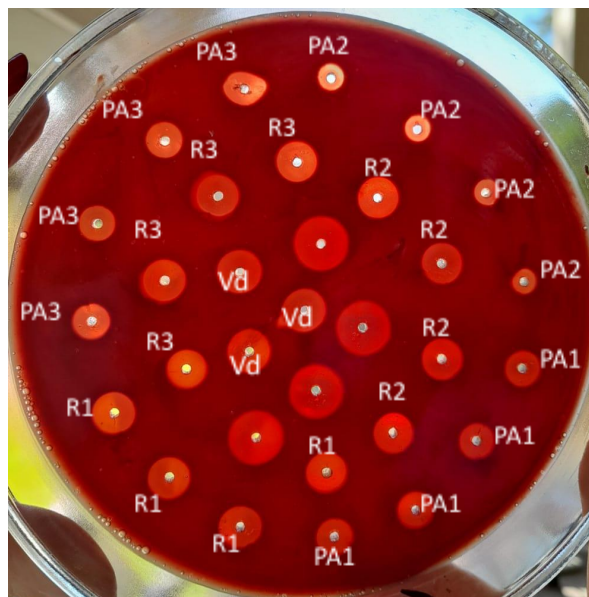


Figura 4: placa de agar sangre-fosfatidilcolina para la evaluación de la inhibición de la PLA2.

Tabla 4: medida de halos de hemólisis en placas de agar sangre – fosfatidilcolina.

	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Halo 4	Promedio	DE	% inhibición
PA1	9	9	9	9	9	0	10
PA2	6	6	6	6	6	0	40
PA3	8	8	8	8	8	0	20
R1	10	10	10	10	10	0	0
R2	10	10	10	10	10	0	0
R3	10	10	10	9	9,75	0,5	2,5
<i>B diporus</i>	10	10	10	10	10	0	

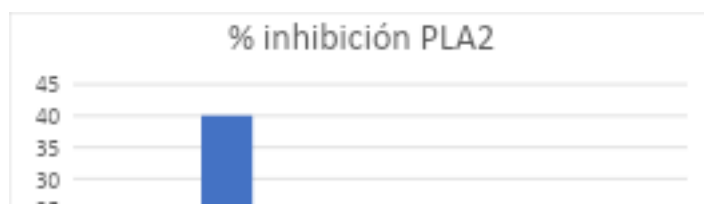


Figura 4: inhibición de la actividad de PLA2 por los extractos vegetales.

Teniendo en cuenta la medida de los halos (Tabla 4 y Figura 4), nuevamente el extracto etanólico de las partes aéreas (PA2) es el que presenta mayor actividad sobre la fosfolipasa A2 presentando un porcentaje de inhibición del 40%. Le sigue en actividad inhibitoria el extracto hexánico de las partes aéreas (PA3) con un 20%.

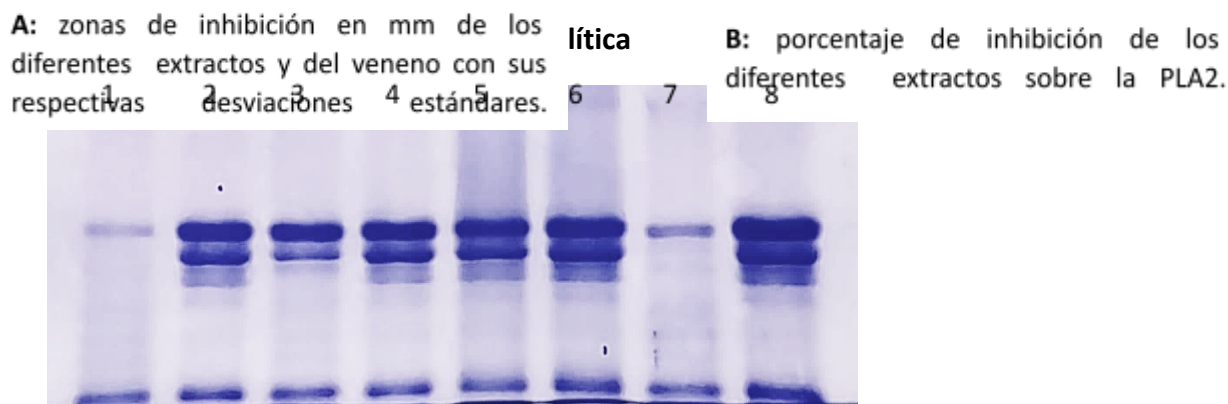


Figura 5: SDS-PAGE con caseína (partes aéreas). Calle 1: veneno más caseína; 2: caseína patrón; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

El extracto etanólico de las partes aéreas (PA2) es el único que tiene 100% de actividad inhibitoria ya que al incubar el extracto con el veneno, éste es inhibido permitiendo observar todas las bandas correspondientes a la caseína (calle 5).

El extracto acuoso (PA1) tiene cierta actividad debido a que aparecen 2 de las bandas de la caseína (calle 3). El extracto hexánico (PA3) de la misma parte de la planta prácticamente no tiene actividad ya que se observa el mismo patrón que el correspondiente al veneno más caseína (calle 7).

Por otra parte, ninguno de los extractos presenta proteasas por lo que se pueden observar todas las bandas de la caseína en las calles correspondientes (calles 4, 6 y 8).

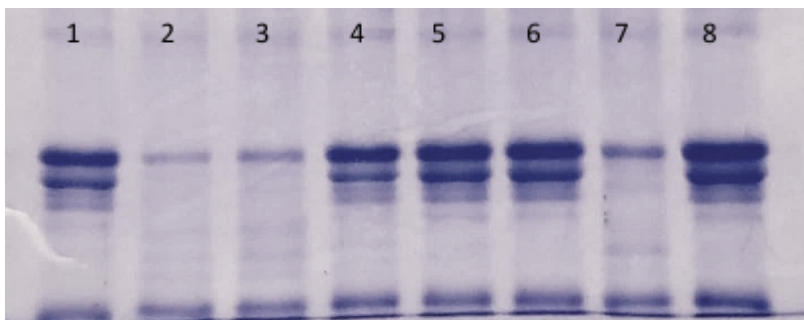


FIGURA 6: SDS-PAGE con caseína (raíces). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

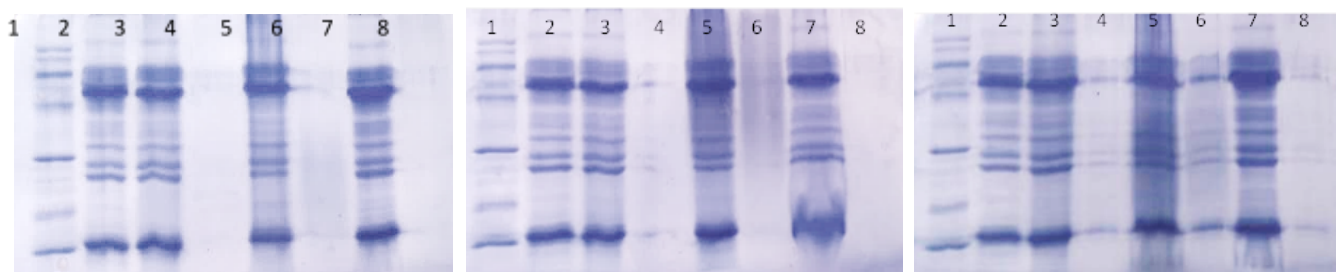
El extracto etanólico de raíces (R2) tiene 100% de actividad inhibitoria del veneno debido a que se observan todas las bandas de la caseína (calle 5).

Por otra parte, el extracto acuoso (R1) y hexánico (R3) no tienen acción inhibitoria sobre el veneno lo que se evidencia con la desaparición de las bandas de la caseína en las calles correspondientes (calles 3 y 7).

Además, se puede decir que las raíces de *P. tomentosa* no presentan proteasas vegetales capaces de provocar la proteólisis de la caseína pudiendo observarse todas las bandas de la misma (calles 4, 6 y 8).

COLECTA II-PRIMAVERA

1- Screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE



Gel A

Gel B

Gel C

Figura 7: SDS-PAGE *Plantago tomentosa* var *napiformis* con veneno de *Bothrops diporus* Relación 1:7 V:E (partes aéreas, raíces y flores).

Gel A: Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

Gel B: Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

Gel C: calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: F1+V; 4: F1; 5: F2+V; 6: F2; 7: F3+V; 8: F3.

Como puede observarse en la figura 7 Gel A, el extracto acuoso de las partes aéreas (PA1) del llantén disminuye la intensidad de las bandas de 48,2 KDa.

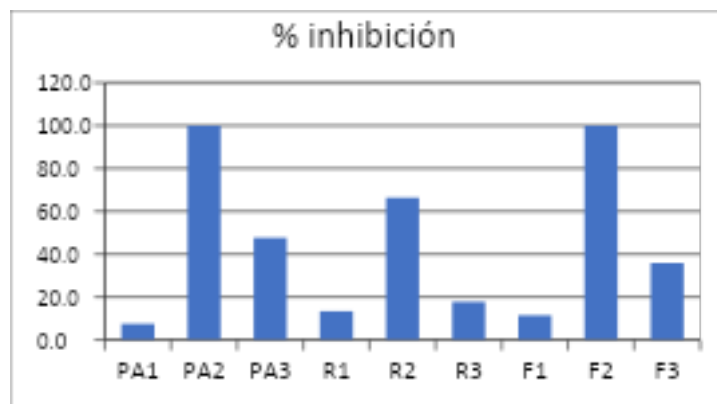
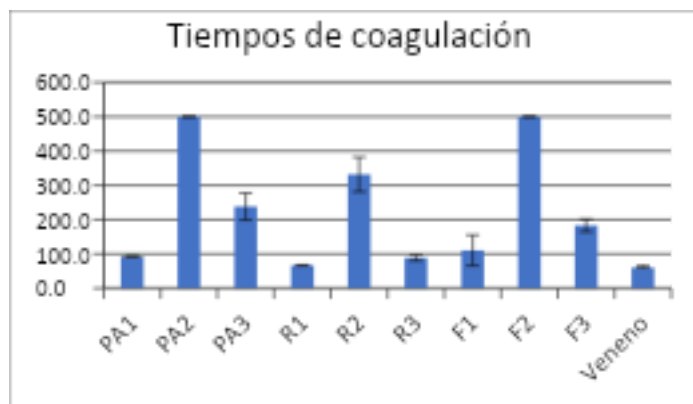
El extracto etanólico de las partes aéreas (PA2) provoca la desaparición de la banda de 48,2 KDa.

Respecto al Gel B de la figura 7 se observa que R1 del llantén disminuye la intensidad de las bandas de 55,4; y 48,2 KDa del veneno y que R2 disminuye la intensidad de la banda de 48,2; 43,3 y 40,5 KDa.

Respecto al Gel C de la figura 7 se observan todas las bandas del veneno de *B. diporus* después de ser tratadas con los diferentes extractos de las flores, excepto para F2 donde se observa una cierta disminución de la intensidad de todas las bandas.

Con el screening podemos considerar a los extractos etanólicos como los que poseen mayor actividad.

2- Inhibición de la actividad procoagulante



A: comparación de los tiempos de coagulación de una muestra de plasma al ser tratados con veneno y con las mezclas extracto + veneno y sus respectivas desviaciones estándares.

B: comparación de los porcentajes de inhibición de los diferentes extractos sobre el veneno de *B. diporus*.

Figura 8: Inhibición de la actividad procoagulante del veneno de *B. diporus* por extractos de *P. tomentosa* colectada en primavera.

Analizando la Figura 8, se observa que el extracto etanólico de partes aéreas (PA2) y el extracto etanólico de flores (F2) presentan 100% de actividad inhibitoria, seguidos por el extracto etanólico de raíces (R2) con más de 60% de inhibición.

Debido a que han dado 100% de actividad, se realizaron diluciones del extracto 1:2 (nuevamente 100% de inhibición) y 1:4 para determinar cuál es más activo:

Tabla 5: medida de los tiempos de coagulación de extractos con 100% de actividad.

Dilución 1:4	TC1	TC2	Promedio	DE
PA2	178,6	171	174,8	5,37
F2	131,2	138,3	134,75	5,02

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que tiene mayor actividad el extracto alcohólico de partes aéreas (PA2).

3- Inhibición de la actividad hemolítica

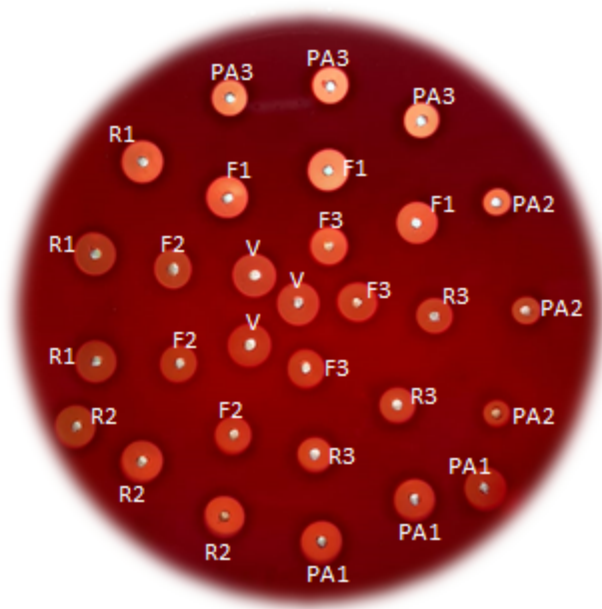
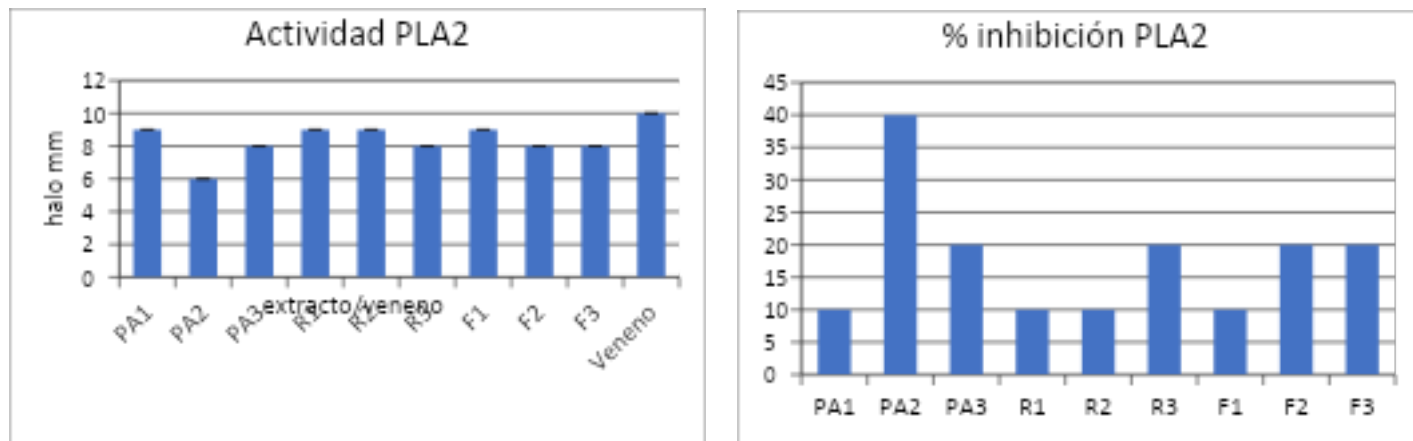


Figura 8: placa de agar sangre - fosfatidilcolina para la evaluación de la inhibición de la PLA2.



los diferentes
us respectivas
estándares.

B: porcentaje de inhibición de los
diferentes extractos sobre la PLA2.

Figura 9: inhibición de la actividad de PLA2 por los extractos vegetales.

Teniendo en cuenta la medida de los halos de la Figura 8 y 9, nuevamente el extracto etanólico de las partes aéreas (PA2) es el que presenta mayor actividad sobre la fosfolipasa A2 presentando un porcentaje de inhibición del 40%.

Además se puede observar que también tienen algo de actividad los extractos hexánicos de partes aéreas (PA3), raíces (R3) y flores (F3) y el extracto etanólico de flores (F2), todos con 20% de inhibición de la actividad de la PLA2.

4- Inhibición de la actividad proteolítica por SDS-PAGE

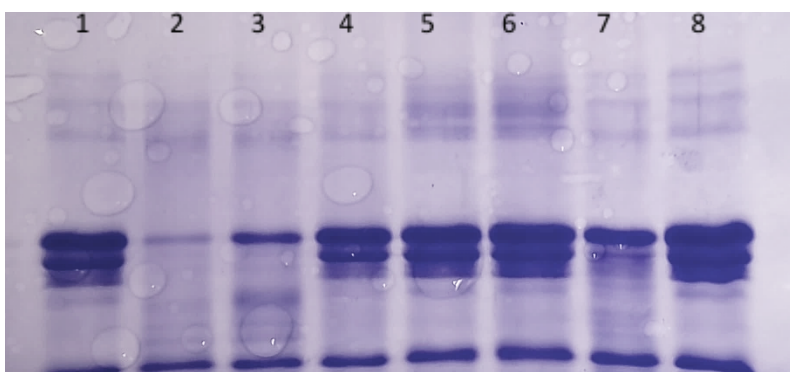


Figura 10: SDS-PAGE con caseína (partes aéreas). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

El extracto etanólico de las partes aéreas (PA2) es el único que tiene 100% de actividad inhibitoria ya que se pueden observar todas las bandas correspondientes a la caseína (calle 4).

El extracto acuoso (PA1) inhibe muy poco al veneno debido a que solo aparece una de las bandas de la caseína (calle 3), mientras que el extracto hexánico (PA3) inhibe en parte al veneno pudiendo observarse un poco más las bandas (calle 7).

Además, al observar todas las bandas de la caseína en las calles 4, 6 y 8, se puede decir que los extractos de las partes aéreas no presentan proteasas vegetales.

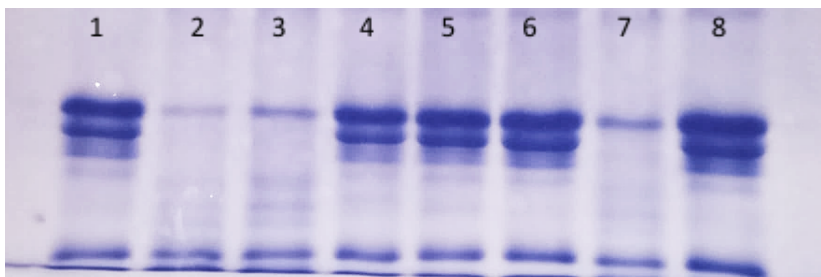


Figura 11: SDS-PAGE con caseína (raíces). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

El extracto etanólico de raíces (R2) tiene 100% de actividad debido a que se observan todas las bandas de la caseína (calle 5) en la Figura 11.

Por otra parte, los extractos acuoso (R1) y hexánico (R3) no tienen acción sobre el veneno por lo que en las calles correspondientes se observa la desaparición de las bandas (calles 3 y 7 respectivamente).

Además ninguno de los extractos presenta proteasas vegetales que puedan generar la proteólisis de la caseína (calles 4, 6 y 8).

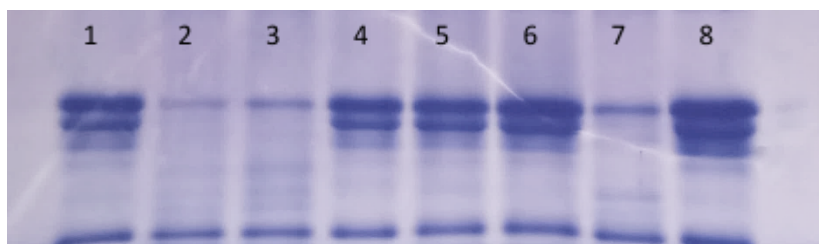


Figura 12: SDS-PAGE con caseína (flores). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: F1+V; 4: F1; 5: F2+V; 6: F2; 7: F3+V; 8: F3.

El extracto etanólico de flores (F2) tiene 100% de actividad sobre el veneno ya que se observan las mismas bandas que la caseína patrón (calle 5).

Sin embargo, el extracto acuoso (F1) y el extracto hexánico (F3) no tienen acción sobre el veneno ya que no se observan las bandas de la caseína (calles 3 y 7).

Ninguno de los extractos presenta proteasas vegetales por lo que pueden observarse todas las bandas de la caseína en las calles correspondientes (4, 6 y 8).

COLECTA I – OTOÑO

1- Screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE

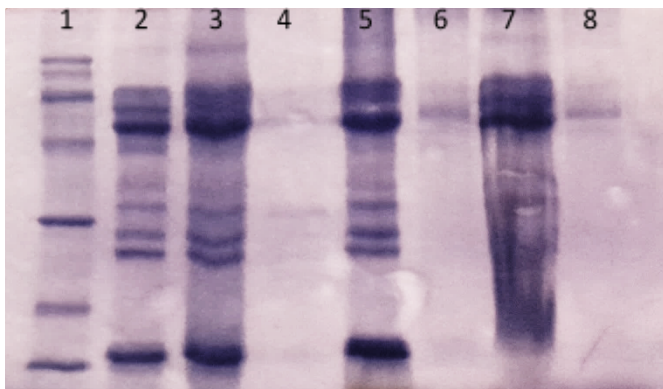


Figura 13: SDS-PAGE *Plantago tomentosa* var *napiformis* con veneno de *Bothrops diporus* relación 1:7 V:E (partes aéreas) Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

De acuerdo a lo observado en la Figura 13, PA1 y PA2 de *P. tomentosa* producen una disminución de la intensidad de las bandas de 48,2; 43,3 y 40,5 KDa.

La calle 7 correspondiente a PA3+V no presenta muy buena corrida pudiendo observarse solamente las dos primeras bandas.

Se puede decir por lo tanto que los diferentes extractos de las hojas prácticamente no tienen actividad sobre *B. diporus*.

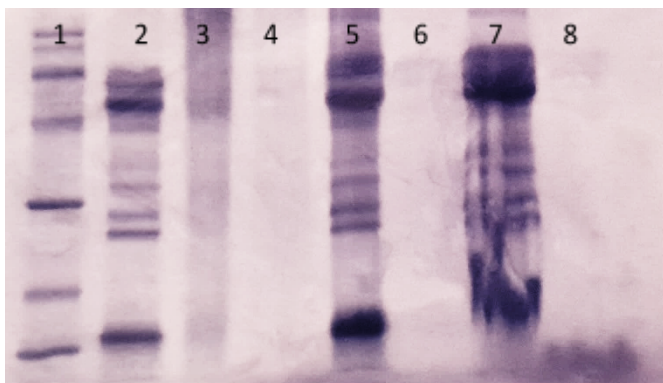


Figura 14: SDS-PAGE *Plantago tomentosa* var *napiformis* con veneno de *Bothrops diporus* relación 1:7 V:E (raíces). Calle 1: patrón de PM; 2: veneno *B. diporus*; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

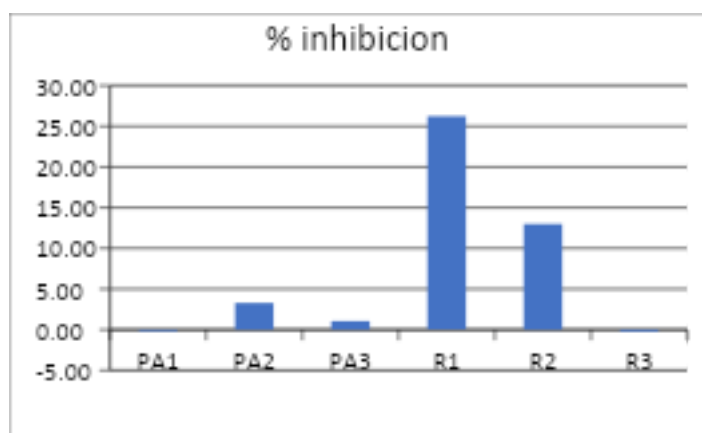
Como puede observarse en la Figura 13, desaparecen todas las bandas del veneno al ser tratado con R1 (calle 3). Por lo tanto, se puede decir que el extracto acuoso de las raíces (R1) presenta actividad sobre el veneno de *B. diporus*.

Por otro lado, R2 y R3 no presentan actividad debido a que se visualiza el mismo patrón de bandas que el veneno puro (calles 5 y 7).

2- Inhibición de la actividad procoagulante



A: comparación de los tiempos de coagulación de una muestra de plasma al ser tratados con veneno y con las mezclas extracto + veneno y sus respectivas desviaciones estándares.



B: comparación de los porcentajes de inhibición de los diferentes extractos sobre el veneno de *B. diporus*.

Figura 15: Inhibición de la actividad procoagulante del veneno de *B. diporus* por extractos de *P. tomentosa* colectada en otoño.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Figura 15, el extracto acuoso de raíces (R1) de *P. tomentosa* de la estación de otoño es la que más prolonga el tiempo de coagulación del plasma, y por lo tanto el que mayor porcentaje de inhibición de la actividad coagulante presenta con un 26%. Por otro lado, R2 también presenta algo de actividad (12% de inhibición).

3- Inhibición de la actividad hemolítica

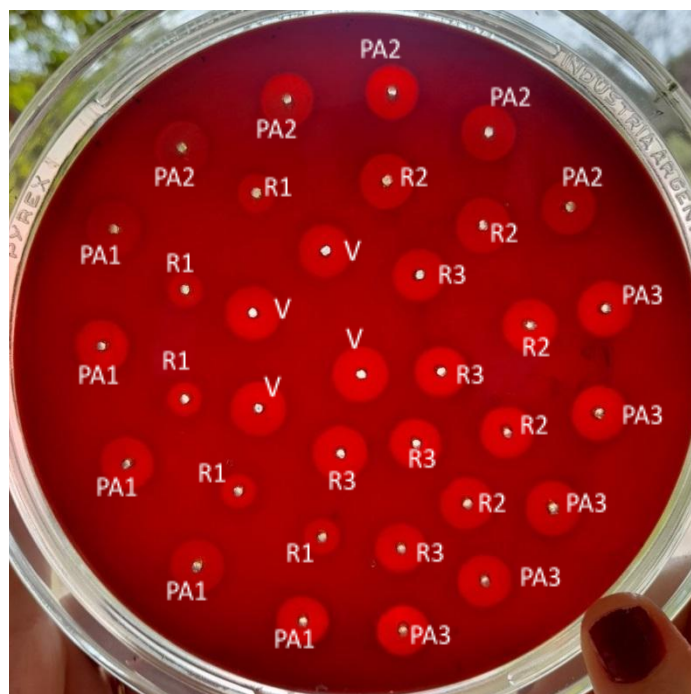
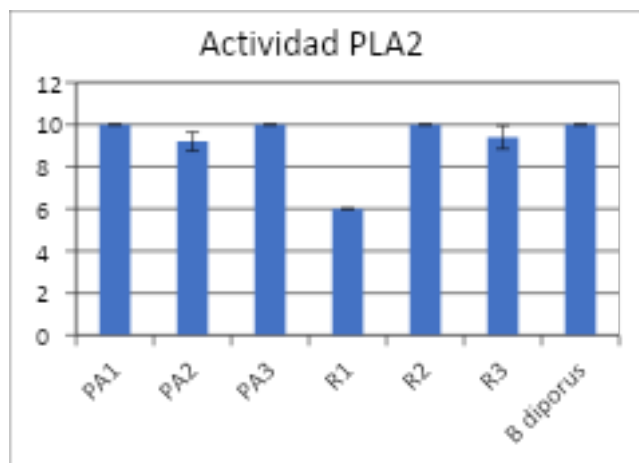
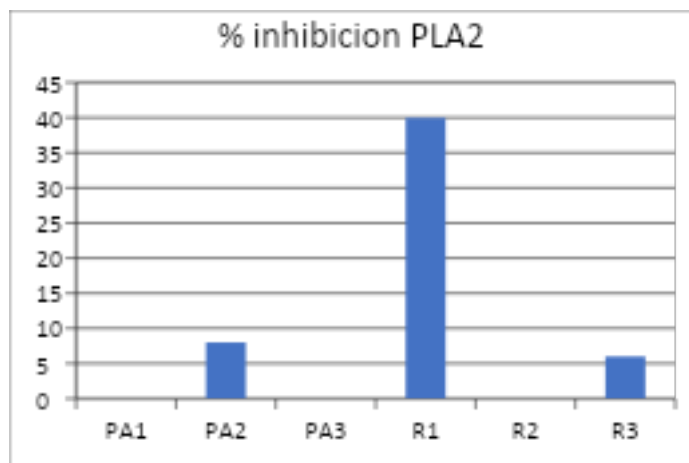


Figura 16: placa de agar sangre - fosfatidilcolina para la evaluación de la inhibición de la PLA2.



A: zonas de inhibición en mm de los diferentes extractos y del veneno con sus respectivas desviaciones estándares.



B: porcentaje de inhibición de los diferentes extractos sobre la PLA2.

Figura 17: inhibición de la actividad de PLA2 por los extractos vegetales.

Teniendo en cuenta la medida de los halos de la Figura 17-A, se puede observar que el extracto acuoso de raíces (R1) es el que presenta mayor actividad sobre la fosfolipasa A2 presentando un porcentaje de inhibición del 40% como puede observarse en la figura 17-B. Los demás extractos presentan escasa o nula actividad.

4- Inhibición de la actividad proteolítica

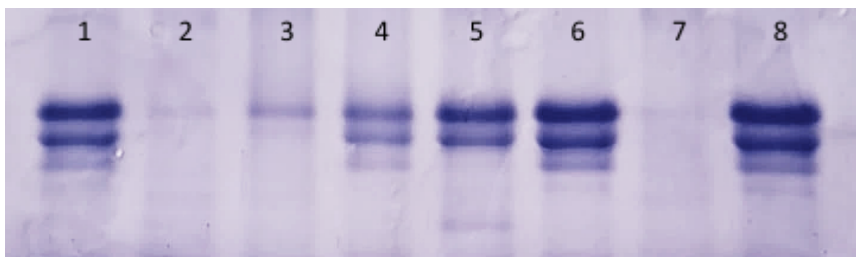


Figura 18: SDS-PAGE con caseína (partes aéreas). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: PA1+V; 4: PA1; 5: PA2+V; 6: PA2; 7: PA3+V; 8: PA3.

En la Figura 18 se puede observar que el extracto etanólico (PA2) presenta cierta actividad inhibitoria ya que al incubarlo con el veneno, éste es parcialmente inhibido permitiendo observar dos de las bandas correspondientes a la caseína (calle 5).

Por otro lado, tanto el extracto acuoso (PA1) como el hexánico (PA3) no presentan actividad inhibitoria sobre el veneno de yarará por lo que éste produce la proteólisis de las bandas de la caseína (calles 3 y 7).

Además, el extracto etanólico (PA2) y hexánico (PA3) no presentan proteasas vegetales lo que se confirma con la presencia de todas las bandas de la caseína (calles 6 y 8 respectivamente), mientras que el patrón del extracto acuoso (PA1) presenta algunas proteasas que degradan parcialmente la caseína, lo cual se puede observar con la disminución de la intensidad de las bandas en la calle 4.

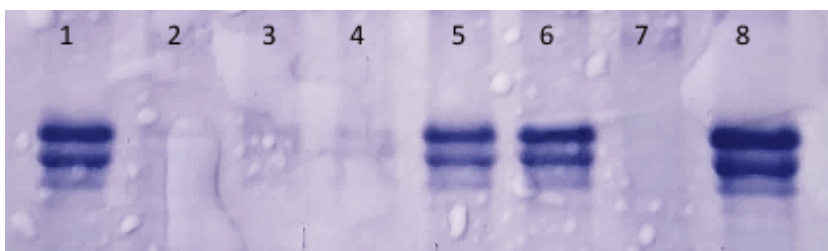


Figura 19: SDS-PAGE con caseína (raíces). Calle 1: caseína patrón; 2: veneno más caseína; 3: R1+V; 4: R1; 5: R2+V; 6: R2; 7: R3+V; 8: R3.

El extracto acuoso de raíces (R1) presenta proteasas vegetales que degradan la caseína, ya que en la calle 4 de la Figura 19 no se observan las bandas correspondientes a la misma. Por lo tanto no se puede saber si la degradación de la caseína es producto del veneno o del extracto vegetal, ya que tampoco se observan las bandas características al tratar el extracto con el veneno y la caseína (calle 3).

El extracto etanólico (R2) es el único que presenta 100% de actividad inhibitoria sobre el veneno lo que permite visualizar todas las bandas de la caseína (calle 5).

El extracto hexánico (R3) no presenta actividad inhibitoria sobre *B. diporus* debido a que no se observan las bandas de la caseína en la calle 7.

Además los extractos etanólico (R2) y hexánico (R3) no presentan proteasas vegetales que degraden la caseína y, a diferencia del extracto acuoso, se pueden observar las bandas en las calles correspondientes (calles 6 y 8).

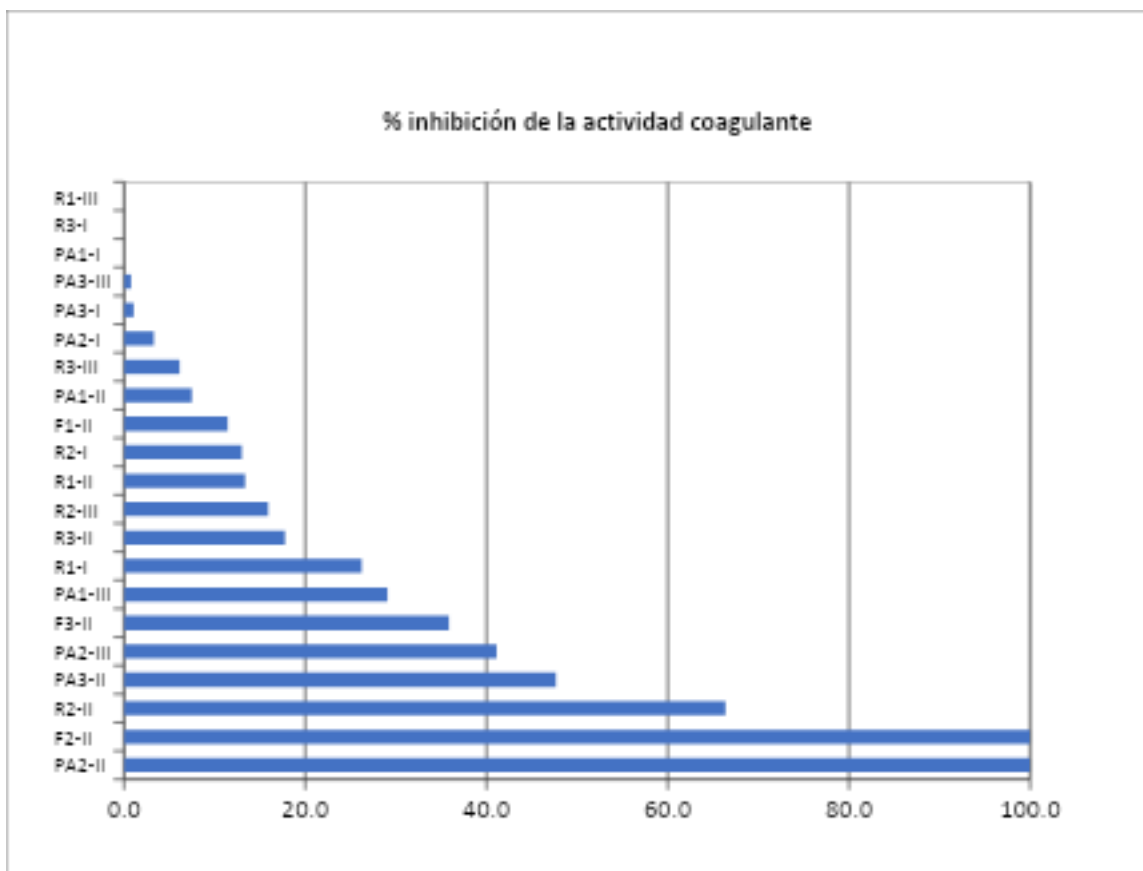


Figura 20: porcentaje de inhibición de la coagulación de los extractos (PA, F y R) de las tres estaciones estudiadas: otoño (I), primavera (II) y verano (III).

De acuerdo a la figura 20, que tiene en cuenta todos los extractos de material vegetal en las tres estaciones, se puede observar que los extractos alcohólicos de flores y partes aéreas de primavera (F2-II y PA2-II) son los únicos con 100% de inhibición de la actividad coagulante. Al hacer la dilución $\frac{1}{4}$ de ambos extractos se llegó a la conclusión de que tiene mayor actividad el extracto de partes aéreas (Tabla 5).

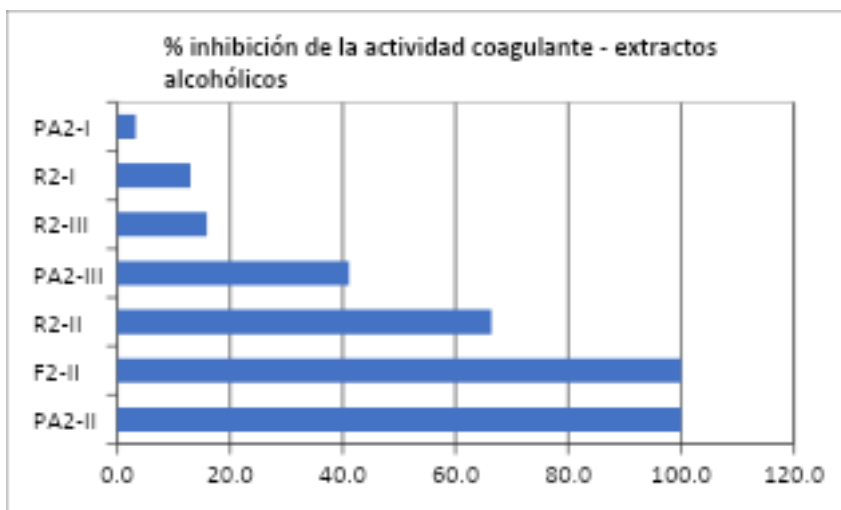


Figura 21: porcentaje de inhibición de la coagulación de los extractos alcohólicos de las tres estaciones estudiadas: otoño (I), primavera (II) y verano (III).

Si solo se estudian los extractos alcohólicos de todas las estaciones, se puede visualizar en la Figura 21 que la colecta de primavera (II) tiene mayor actividad que la colecta de verano (III), y ésta a su vez mayor actividad que la colecta de otoño (I). Aquí se puede visualizar perfectamente que la época de recolección es muy importante.

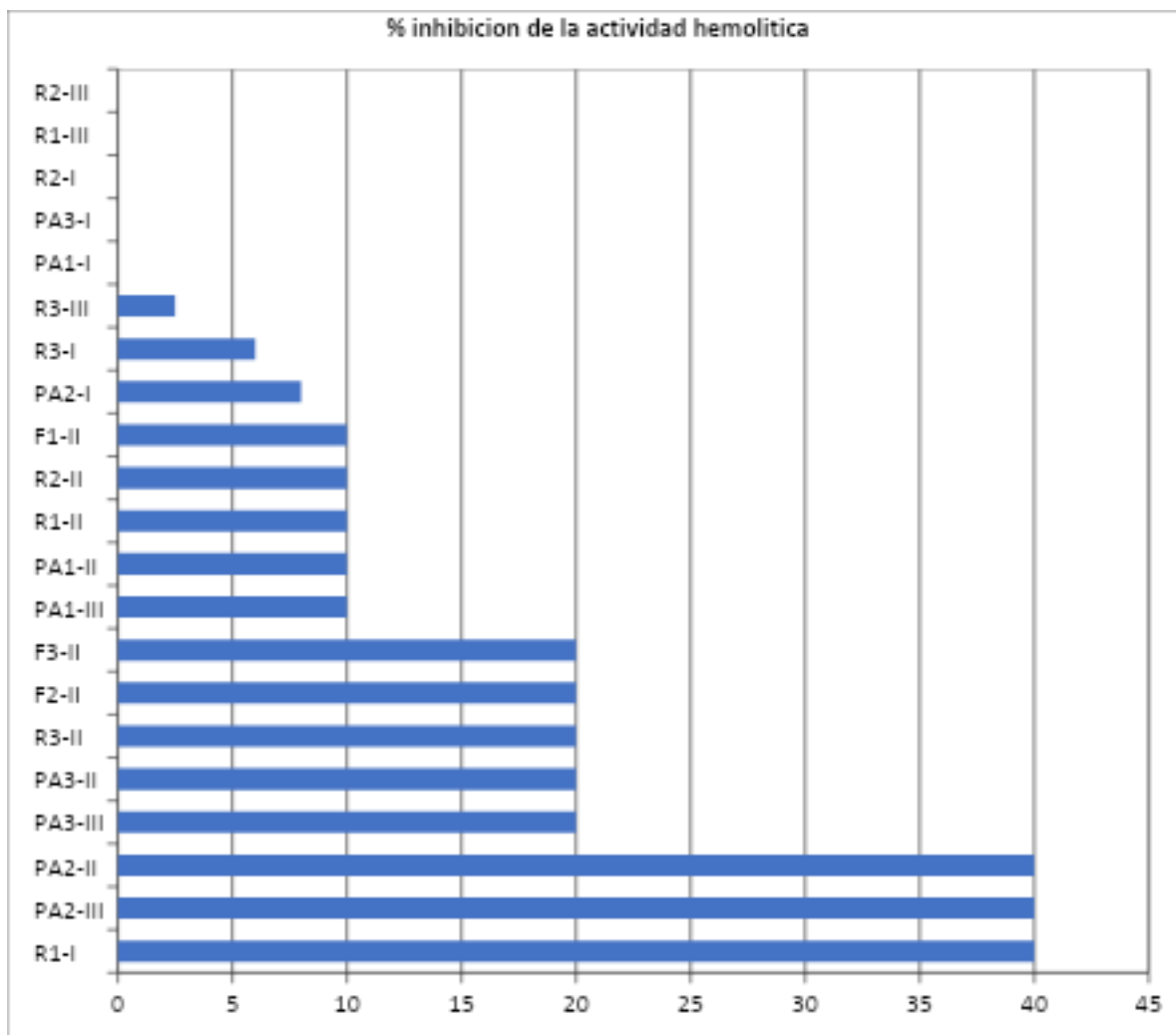


Figura 22: porcentaje de inhibición de la actividad hemolítica de los extractos (PA, F y R) de las tres estaciones estudiadas: otoño (I), primavera (II) y verano (III).

De acuerdo a la Figura 22, los extractos con mayor porcentaje de inhibición de la actividad hemolítica indirecta son R1 de otoño (I) y PA2 de primavera (II) y verano (III), todos con un 40% de inhibición.

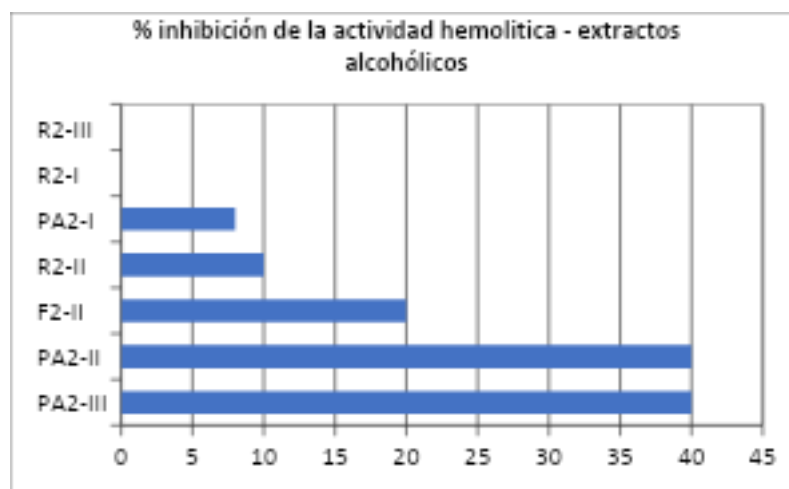


Figura 23: porcentaje de inhibición de la actividad hemolítica de los extractos alcohólicos de las tres estaciones estudiadas: otoño (I), primavera (II) y verano (III).

Si nuevamente se tienen en cuenta únicamente los extractos alcohólicos de las tres colectas, se puede observar que la colecta de verano (III) y de primavera (II), son las más activas, seguidas por la colecta de otoño (I).

CONCLUSIONES

El desarrollo de esta práctica electiva me permitió profundizar conocimientos y adquirir experiencia en técnicas analíticas como electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, determinación de la actividad coagulante en coagulómetro Col 1 y preparación de placas de agar sangre - fosfatidilcolina.

Además, se pudo detectar la actividad inhibitoria de extractos de *Plantago tomentosa* var *napiformis*, característico de nuestra región, contra el veneno de *B. diporus*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que la actividad del llantén está relacionada directamente con la época de colecta, con el órgano utilizado y con la polaridad del solvente utilizado en la preparación de los extractos.

Los extractos alcohólicos resultaron ser los más activos al analizar la inhibición de la actividad proteolítica y el screening de la actividad alexitérica por SDS-PAGE, ambos análisis cualitativos.

Por otra parte, mediante el análisis cuantitativo realizado a través de la inhibición de la actividad coagulante y hemolítica indirecta, se observó que son más activos los extractos alcohólicos de la colecta de primavera y de verano respectivamente, debiendo realizarse la colecta de material vegetal en esta época del año (particularmente en primavera) para obtener mayor proporción de bioactivos.

En conclusión, el extracto etanólico de hojas de *P. tomentosa*, es una fuente de metabolitos activos contra veneno de yarará chica, lo que indicaría que podría emplearse como un potencial agente coadyuvante para el tratamiento local del accidente, resultando necesario identificar los metabolitos secundarios involucrados en la actividad.

BIBLIOGRAFIA

Camargo, F., Torres, A., Ricciardi, G., Ricciardi, A. y Dellacassa, E. (2011). SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitéra de extractos vegetales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(5), 429-434.

Chiang, L., Chiang, W., Chang, M. y Lin, C. (2003). *In vitro* cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 31(2), 225-234.

Chiang, L., Chiang, W., Chang, M., Ng, L. y Lin, C. (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral Research*, 55(1), 53-62.

Gay, C., Leiva, L., Ruiz, R. y Acosta, O. (2004). Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops alternatus* por quelantes de metales. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE*, E-015.

Gutierrez, J. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50(2), 377-394.

Melo, P., Do Nascimento, M., Mors, W., Suarez Kurtz, G. (1994). Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon*, 32(5), 595-603.

Otero, R., Fonnegra, R., Jiménez, S., Núñez, V., Evans, N., Alzate, S., García, M., Saldarriaga, M., Del Valle, G., Osorio, R., Díaz, A., Valderrama, R., Duque, A. y Vélez, H. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part. I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 493-504.

Pardo, M. y Natalucci, C. (2002). Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(1), 57-60.

Ramírez, L., Britos, M., Torres, A. y Karaben, V. (2018). Estudio Fitoquímico de Extractos de Llantén. Facultad de Odontología UNNE.

Ramírez, L., Rea, A. y Karaben, V. (2016). Llantén: propiedades y usos medicinales. *Revista Facultad de Odontología UNNE*, 11(1), 22-26.

Ricciardi, G., Ruíz Díaz, J., García Denegri, E., Dellacassa, E. y Torres, A. (2018). Caracterización fitoquímica del aceite esencial de *Plantago tomentosa* y evaluación de la actividad antioxidante y alexitérica de sus extractos vegetales. *VI Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. II Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas*.

Ricciardi-Verrastro, B., Torrez, A., Camargo, F. y Dellacassa, E. (2016). Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) en el Nordeste de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(2), 112-121.

Ronsted, N., Franzyk, H., Molgaard, P., Jaroszewski, J. y Jensen, S. (2003). Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 242(1-4), 63-82.