

Fucoïdanos de bajo peso molecular obtenidos por irradiación gamma y su efecto inhibidor de la generación de trombina

Gustavo Adolfo Ruiz Pacco¹, César Máximo Fuertes Ruitón¹,
Johnny Vargas Rodríguez²

Resumen

Los fucoïdanos aislados y purificados del alga parda *Lessonia trabeculata*, mediante precipitaciones sucesivas con etanol 96° y complejamiento con cloruro de cetilpiridinio, fueron sometidos a irradiación gamma a dosis de 10, 30, 50 y 100 KGy en un irradiador modelo Gammacel 220 con fuente de Co-60, para obtener los polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular y evaluar su efecto anticoagulante. Hay disminución de la viscosidad, conforme aumenta la dosis irradiativa del fucoïdano, mientras la electroforesis en agarosa, evidencia la disminución de sus pesos moleculares en relación a la movilidad electroforética. Los fucoïdanos mostraron notable actividad anticoagulante frente a la prueba TTPa, que evalúa la vía intrínseca; se seleccionó esta ruta para la evaluación de la prueba de inhibición de la generación de trombina; para la concentración de 10 mg/mL se observó que el porcentaje de inhibición entre los grupos es mayor al 80 %, mientras que, a la concentración de 0,5 mg/mL, el % IGT para todas las muestras irradiadas es menor al 50 %. Las comparaciones entre grupos se realizaron a un nivel de confianza del 95 %.

Palabras clave: Anticoagulante, generación de trombina, fucoïdano, irradiación gamma.

Abstract

The isolated and purified fucoïdan of the brown seaweed *Lessonia trabeculata*, by successive precipitations with 96° ethanol and complexation with cetilpiridinio chloride, were subjected to gamma irradiation at doses of 10, 30, 50 and 100 KGy in an irradiator model Gammacel 220 with source of Co -60, to obtain sulfated polysaccharides of low molecular weight and evaluate their anticoagulant effect. There is a decrease in viscosity, as the irradiative dose of fucoïdan increases, while the agarose electrophoresis evidences the decrease of its molecular weights in relation to electrophoretic mobility. The fucoïdians showed remarkable anticoagulant activity against the aPTT test, which evaluates the intrinsic pathway; this route was selected for the evaluation of the inhibition test of thrombin generation; for the concentration of 10 mg / mL it was observed that the percentage of inhibition between the groups is greater than 80%, whereas, at the concentration of 0.5 mg / mL, the % IGT for all irradiated samples is less than 50 %. The comparisons between groups were made at a confidence level of 95%.

Keywords: Anticoagulant, thrombin generation, fucoïdan, gamma irradiation.

Introducción

Las algas pardas son conocidas por su coloración característica entre el verde olivo a marrón oscuro. Los pigmentos predominantes en sus cromatóforos son las clorofilas a, c, beta carotenos y los carotenoides violaxantina y fucoxantina. Del orden de las Laminariales, destacan las de la familia Lessoniaceae, siendo representativas en nuestro litoral: *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens*, *Macrocystis integrifolia* y *Macrocystis pyrifera*, las cuales habitan principalmente la zona sur del litoral peruano, principalmente en los departamentos de Moquegua, Arequipa e Ica⁽¹⁾.

Las algas pardas producen polisacáridos sulfatados compuestos por L-fucosa, grupos sulfato y cantidades menores de otros azúcares como D-xilosa, D-galactosa y ácidos urónicos. Estos polisacáridos son denominados comúnmente como fucanos o fucoïdanos. Los fucoïdanos sulfatados son moléculas obtenidas principalmente de organismos marinos, especialmente algas e invertebrados⁽²⁾.

Estructuralmente, estos polisacáridos sulfatados marinos de alto peso molecular (usualmente ≥ 100 kDa) son predominantemente compuestos por unidades de fucopiranosilo. El alto contenido de grupos sulfato en sus cadenas los

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Laboratorio de Química de Carbohidratos - Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara". ²Laboratorio de irradiación de alimentos. Central Nuclear "RACSO"-IPEN.

convierte en compuestos polianiónicos de dependencia electrostática intermolecular de enlace que los provee de relevantes propiedades en la salud^(3,4).

Debido a su alta heterogeneidad estructural, los polisacáridos sulfatados presentan una amplia gama de actividades en diversos sistemas biológicos. Los polisacáridos extraídos de algas pardas han mostrado notable actividad antioxidante, como los obtenidos a partir de *Laminaria japonica*; éstos presentaron actividad en dos sistemas de oxidación de lipoproteína de baja densidad. En el mismo sentido el fucoïdano extraído de *Fucus vesiculosus* mostró actividad antioxidante frente al ensayo de reducción férrica/poder antioxidante. Las propiedades biológicas de los polisacáridos sulfatados de algas pardas son diversas, también existen reportes de actividad antitumoral, antimutagénica, inmunomoduladora, anticancerígena y anticoagulante, siendo esta última de interés para el presente estudio⁽⁵⁻⁷⁾.

Los fucoïdanos sulfatados muestran grandes ventajas como recursos para la terapia anticoagulante, especialmente debido al uso masivo de heparinas. La situación se ha ido complicando al determinar que los preparados de heparina se encuentran contaminados con restos sobresulfatados de sulfato de condroitina. Este contaminante induce hipotensión asociada a caliceína cuando se administra por vía intravenosa. Casos fatales han sido descritos durante la “crisis heparínica”. Por lo que el uso del fucoïdano se constituye en una alternativa o complemento al uso de la heparina en el tratamiento de enfermedades como la trombosis venosa profunda entre otros⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Actualmente, hay alternativas farmacológicas en la terapia anticoagulante como son las heparinas de bajo peso molecular, las cuales presentan mejor desempeño al modular mejor su efecto reduciendo la posibilidad de producir algún tipo de crisis en el paciente, así como otros efectos secundarios^(11,12) en virtud a ello, se ha visto conveniente para el presente estudio, analizar el comportamiento anticoagulante de fucoïdanos del alga *Lessonia trabeculata*, los cuales han sido sometidos a un proceso físico que permitirá obtener polisacáridos de menor tamaño, los que simularían el efecto de las heparinas de bajo peso molecular, para tal fin se considera la evaluación de los metabolitos obtenidos frente a pruebas de coagulación clásicas (TP, TTPa) como barrido general, para dar lugar al estudio la inhibición de la generación de trombina, el cual explica de mejor manera la cinética de coagulación.

Material y métodos

Recolección y determinación taxonómica

La recolección de ejemplar algal de *Lessonia trabeculata* se llevó a cabo en las playas de Marcona - departamento de Ica, con el apoyo del biólogo Alex Gamarra responsable de la división de macroalgas del Instituto del Mar del Perú - Imarpe. La determinación taxonómica se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

Extracción, purificación y aislamiento de fucoïdanos⁽¹³⁻¹⁵⁾

200 g de muestra de alga seca y triturada, fue sometida a extracción en medio salino (NaCl 0.2 M) con agitación constante por 18 horas. Luego se precipitó con etanol 96 % hasta clarificación, se redisuelve el precipitado y se compleja con solución 1% de cloruro de cetilpiridinio, se separó el precipitado por centrifugación (5000 RMP x 10 min) y se aperturó con solución salina (NaCl 2M), finalmente la solución se precipita con etanol 96 %. El precipitado es rediseñado en agua destilada para su liofilización.

Irradiación gamma de los fucoïdanos⁽¹⁶⁾

Las dosis de irradiación gamma consideradas fueron de 10 KGy, 30 KGy, 50 KGy y 100 KGy. Para determinación del tiempo necesario para cada dosis se siguió la dosimetría estándar de referencia ASTM 1026 (Fricke) que consiste en la irradiación de la muestra producto con dosímetros y mapeo dosimétrico en la cámara de irradiación del equipo Gammacell 220.

Evaluación del peso molecular por viscosimetría⁽¹⁷⁾

Se realizó en el Centro de Control Analítico (CCA) - Cenprofarma de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM mediante el método de Brockfield. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente con un total de 5 repeticiones por muestra.

Evaluación de pesos moleculares por electroforesis en gel de agarosa^(13,14)

15 µg de fucoïdano es aplicado a una superficie de gel de agarosa al 1,5 %, se desarrolló por espacio de 3 horas a 110 V en solución buffer 0,05 M de 1,3 diaminopropano/acetato (pH = 9). Los fucoïdanos en el gel se fijaron con una solución al 1 % de bromuro de N-cetil-N, N, N trimetilamonio.

Pruebas de coagulación

Prueba de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activa (TTPa)^(18,19)

Los fucoïdanos irradiados fueron evaluados considerando los métodos provistos en las pruebas Soluplastin (Wiener-Lab) de tromboplastina cálcica para la determinación de Tiempo de Protrombina en una etapa y ATTP Test (Wiener-Lab), las cuáles evalúan la vía extrínseca y extrínseca de la coagulación respectivamente.

Inhibición de la generación de trombina^(20,21)

Se utilizar el agente cromógeno Chromozym TH 1.9 mM en medio buffer Tris (50 mM, pH = 8.3). La prueba se

realiza según método de Nishino y col., en una solución de plasma control (Wiener Lab), para la evaluación de vía intrínseca utilizando los reactivos de actina y CaCl₂. La lectura espectrofotométrica se realiza a 404 nm. % Inhibición = (1-trombina residual/trombina inicial)*100

Resultados

Dosis	Tiempo (minutos)	Tiempo (horas)
10 KGy	199,80 min	3,33 h
30 Kgy	599,42 min	9,99 h
50 Kgy	999,04 min	16,65 h
100 KGy	1998,07 min	33,30 h

La movilidad electroforética de los fucoïdanos en el gel de agarosa se encuentra relacionada tanto al peso molecular como al grado de sulfatación de la molécula. La disminución del recorrido conforme la muestra fue sometida a mayores dosis de irradiación es un indicador de reducción del peso molecular.

Discusión

Respecto a la evaluación del peso molecular se consideró primero la determinación de la viscosidad por viscosimetría de Brockfield, se observó que conforme aumenta la dosis de irradiación, la viscosidad disminuye, siendo menor en la muestra de fucoïdano a la dosis de 100 KGy, ello es un indicador importante porque evidencia que al aplicar la radiación gamma, las estructuras polisacáridas que brindan moderada viscosidad a la solución, se fraccionan en partes más pequeñas, más solubles y que ofrecen menor impedimento al esfuerzo de cizallamiento.

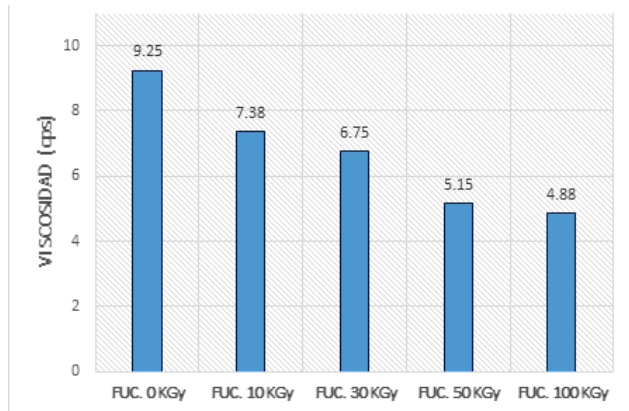


Figura 1. Cuadro comparativo de la variación de viscosidad respecto a la dosis de radiación sometida.

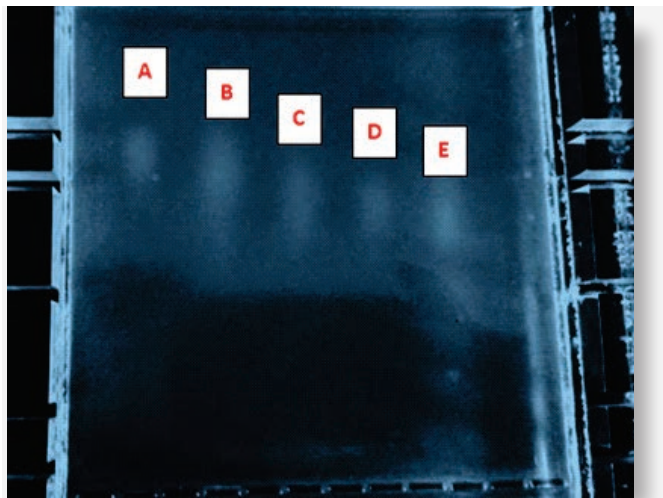


Figura 2. Electroferogramas en gel de agarosa luego de la fijación bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Movilidad electroforética reportada para fucoïdanos.

Muestra	Movilidad Electroforética
A: Fucoidano 0 KGy	0,74
B: Fucoidano 10 KGy	0,68
C: Fucoidano 30 KGy	0,63
D: Fucoidano 50 KGy	0,60
E: Fucoidano 100 KGy	0,57

Muestra	Tiempo de Protombina - TP (segundos)	Tiempo de Tromboplastina Parical Activa - TTPa (segundos)
Blanco (Plasma Normal)	14,18 ± 0,07	37,18 ± 0,60
Fucoidano Total (0 KGy)	33,37 ± 1,55	> 300 ± 0,00
Fucoidano 10 KGy	31,43 ± 1,56	> 300 ± 0,00
Fucoidano 30 KGy	19,12 ± 0,49	> 300 ± 0,00
Fucoidano 50 KGy	16,36 ± 1,09	114,61 ± 3,01
Fucoidano 100 KGy	16,48 ± 1,15	135,15 ± 4,29
ST.Heparina 1000 µg/mL	> 300 ± 0,00	> 300 ± 0,00
ST.Heparina 100 µg/mL	> 300 ± 0,00	> 300 ± 0,00
ST.Enoxaparina 1000 µg/mL	> 300 ± 0,00	> 300 ± 0,00
ST.Enoxaparina 100 µg/mL	17,57 ± 0,27	146,88 ± 12,13

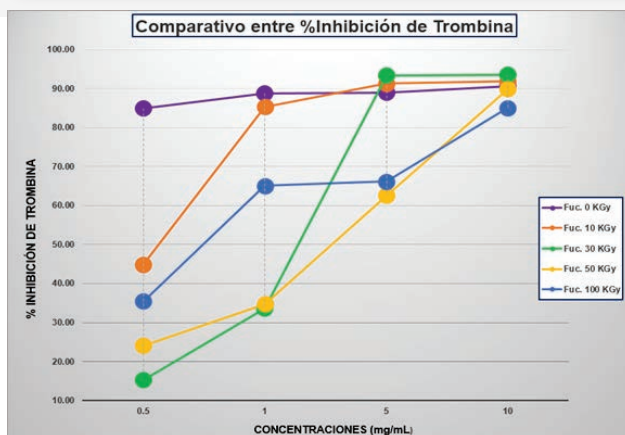


Figura 3. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las muestras de fucoidano a diversas dosis de irradiación.

Al analizar la movilidad electroforética de las muestras de fucoidano, se observa que la de 0 KGy (sin irradiar) se encuentra entre los valores de la condroitina-6-sulfato, heparina y Dextran 40 (entre 30 y 60 Kda), por lo que le correspondería un peso molecular de ~ 60 KDa, mientras las demás muestras presentan disminución del recorrido electroforético, que iría asociado con una disminución del peso molecular, para la muestra de fucoidano a mayor dosis de irradiación (100 KGy), se encuentra un recorrido más cercano al dextran sulfato de ~ 5 KDa.

El efecto anticoagulante de los fucoidanos para la prueba de tiempo de protrombina (vía extrínseca) fue

semejante al blanco de plasma sanguíneo normal, mientras que por la prueba de tiempo de tromboplastina parical activa (vía intrínseca), se vio que los fucoidanos de 0, 10, 30 KGy presentaron tiempos mayores a los 300 segundos (5 min), situación similar para los estándares de enoxaparina y heparina sódicas, resultandos activos para esta última vía. A partir de esto, se evaluó la inhibición de la generación de trombina mediante la metodología establecida por Nishino y colaboradores⁽²¹⁾, donde empleaban el agente cromogénico Chromozym TH. La comparación estadística de grupos fue en referencia a las concentraciones de estudio (A > B > C > D) a un nivel de confianza del 95 %. Se observa que a la concentración A (10 mg/mL), todos los fucoidanos presentaron IGT > 80 %, a

la concentración B (5 mg/mL) solo las muestras de 0, 10 y 30 KGy presentaron IGT > 80 %, mientras que las muestras de 50 y 100 KGy fueron < 70 %, la disminución es progresiva en las muestras; sin embargo, a la concentración D (0,5 mg/mL) se observa que la de 0 KGy (sin irradiar) aún presenta IGT > 80 %, mientras que las demás muestras su IGT fue < 50 %.

Conclusiones

- Los fucoidanos irradiados fueron evaluados respecto a su peso molecular mediante viscosimetría y electroforesis en gel de agarosa. En la primera, se observa disminución de la viscosidad conforme aumenta la dosis irradiativa, y en la segunda se observa disminución del peso molecular, según la movilidad electroforética y comparación con patrones de polisacáridos sulfatados de diferentes pesos moleculares.

- La evaluación de la inhibición de generación de trombina, se determinó para los fucoidanos irradiados, en comparación con estándares de heparina y enoxaparina, según concentraciones establecidas; se observó que, pese a la reducción de peso molecular, a la concentración de 10 mg/mL se mantiene la IGT con valores mayores al 80 % de inhibición.

Agradecimientos

Esta propuesta de investigación recibió el premio de la Fundación Instituto Hipólito Unanue (FIHU) a través de su programa de Aporte a la Investigación Científica 2015 para su financiamiento y ejecución.

Referencias bibliográficas

1. **Acleto C, Zuñiga R.** Introducción a las algas. Lima: Escuela Nueva; 1998.
2. **A guide to the seaweed industry [Internet].** Fao.org. 2018 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm>
3. **Bilan I, Grachev N, Ustuzhanina A, Shashov N, Nifatiev A, et al.** A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus*. *Carbohydrate Research*. 2004;339:511-517.
4. **Pomin V.** Fucanomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1820:1971-1979.
5. **Anastyuk S, Shevchenko N, Nazarenko E, Gorbach V, et al.** Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry. *Carbohydrate Research*. 2010;345:2206-2212.
6. **Zhang Z, Till S, Jiang C, Knappe S, Reutterer S.** Structure activity relationship of the pro and anticoagulant effect of *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014;111(3):1-9.
7. **Wiejesinghe W, Jin Jeon Y.** Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds. *Carbohydrates Polymers*. 2012;88:13-20.
8. **Sinurat E, Marraskuranto E.** Fucoidan from Brown seaweed and its bioactivity. *Marine drugs*. 2012;7(3):131-136.
9. **Fitton J.** Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine Drugs*. 2011;9:1731-1760.
10. **Rodak B, Fritsma G, Keohane E.** Hematología. México D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2014.
11. **Qureshi A, Perera A.** Low molecular weight heparin versus unfractionated heparin in the management of cerebral venous thrombosis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Med Surg [Internet]*. 2017;17:22-6 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2017.03.016>
12. **Levine M, Gent M, Hirsh J, Leclerc J, Anderson D, Weitz J, et al.** A Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin Administered Primarily at Home with Unfractionated Heparin Administered in the Hospital for Proximal Deep-Vein Thrombosis. *N Engl J Med [Internet]*. 1996; 334(11): 677-81 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199603143341101>
13. **Silva TMA.** Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. 2005;38:523-533.
14. **Albuquerque I, Queiroz K, Alves L, Santos E, Leite E, Rocha H.** Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(2):167-171.
15. **McPhee S, Ganong W, Agaard E, Girón Rojas A, Carvajal García G.** *Fisiopatología médica*, 5ta. ed. México D.F.: El Manual Moderno; 2007.
16. **Moussous O, Medjadj T.** A standard Fricke dosimeter compared to an ionization chamber used for dosimetric characterization of 60-Co photon beam. *Polish J Med Phys Eng*. 2016;22(2):19-24.
17. **Bhatia S, Sharma K, Bera T.** Structural characterization and pharmaceutical properties of porphyran. *Asian J Pharm*. 2015;9(2):93-101.
18. **Soluplastin [internet].** Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wienerlab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/soluplastin_sp.pdf
19. **APTTtest [internet].** Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wienerlab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/aptttest_sp.pdf
20. **Chromozym TH [Internet].** Sigmaaldrich.com. [cited 1 April 2018]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/chromthrobul.pdf>
21. **Nishino T, Fukuda A, Nagumo T, Fujihara M, Kaji E.** Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb Res*. 1999;96(1):37-49.