



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Aislamiento y caracterización de compuestos fibrinogenolíticos
presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller **Hirán Alejandro Hernández Rivas** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Josmary Brazón (IVIC)

Asesor académico: Dr. Alexander Laurentín
(UCV)

Caracas, Venezuela

Octubre - 2015

Resumen

El uso de plantas medicinales es una práctica muy antigua usada por los seres humanos desde el origen de sus culturas. Dichas plantas tienen una gran cantidad de compuestos con actividad en diferentes sistemas biológicos, como es el caso de la hemostasia. En la medicina popular venezolana las mujeres en edad reproductiva que padecen de menorragia, desorden menstrual caracterizado por una pérdida de sangre de más de 100 mL por ciclo o un sangrado continuo por más de 7 días; ingieren infusiones de flores de “rosa de montaña” o *Brownea macrophylla* para controlar la pérdida de sangre. Sin embargo, se ha encontrado que el extracto acuoso floral de esta planta, además de presentar componentes procoagulantes que podrían ser usados como tratamiento para la menorragia también contiene componentes que degradan al fibrinógeno, proteína central en la coagulación de la sangre, precursor de la malla de fibrina, la cual detiene el sangrado cuando se interrumpe el flujo continuo en el sistema vascular. Esta degradación del fibrinógeno podría impedir la formación de la malla de fibrina y por ende exacerbar la pérdida de sangre en mujeres con menorragia o podría formar una malla de fibrina resistente a la degradación por los componentes del sistema fibrinolítico y de esta manera contribuir a controlar la menorragia. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar componentes fibrinogenolíticos presentes en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla*. Los resultados de este trabajo demostraron que el extracto acuoso no coaguló fibrinógeno y por ende fue incapaz de formar la malla de fibrina. El extracto acuoso se fraccionó inicialmente por Sephadex G-50 (exclusión molecular) obteniendo 6 fracciones (S1 a S6) y la fracción con mayor actividad fibrinogenolítica fue S4. La actividad de esta fracción fue inhibida por EDTA, Benzamidina, PMSF y AIA, siendo este último el más eficiente. Luego, la fracción S4 se recromatografió a través de una columna IMAC-ZN Separopore (afinidad por metaloproteasas) obteniéndose dos fracciones S4A y S4B, donde S4A fue la más activa degradando fibrinógeno. A esta fracción se le determinó el pH y temperatura óptima, siendo 3 y 37 °C respectivamente. En resumen, los componentes fibrinogenolíticos son glucoproteínas tipo α -fibrinogenasa de masas moleculares de 38,32 y de naturaleza distinta a las metaloproteasas. Al tratar de relacionar los hallazgos obtenidos en este trabajo con el uso que se le da a las flores de *Brownea macrophylla* en la medicina tradicional venezolana se puede concluir que los compuestos fibrinogenolíticos presente en el extracto acuoso floral de *Brownea macrophylla* no contribuyen a controlar la menorragia, si no que por el contrario podrían ser capaces de incrementar la pérdida de sangre, ya que el fibrinógeno degradado por el extracto, no es capaz de polimerizar en presencia de trombina para formar una malla de fibrina. Sin embargo, como la proporción de los componentes fibrinogenolíticos con respecto a los demás componentes presentes en el extracto es menor, es posible que no incremente la pérdida de sangre ya que, las mujeres que toman la infusión de flores de *Brownea macrophylla* no lo han reportado.

Índice de contenido

Introducción.....	1
Plantas medicinales.....	1
<i>Brownea macrophylla</i>	3
Hemostasia generalidades.....	7
Fibrinógeno.....	9
Degradación del fibrinógeno por proteasas que intervienen en la coagulación y la fibrinólisis.....	10
Degradación de fibrinógeno por compuestos externos.....	14
Antecedentes.....	17
Objetivos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Resultados.....	27
Discusión.....	44
Conclusiones.....	50
Recomendaciones.....	51
Bibliografía.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología foliar de <i>Brownea macrophylla</i>	6
Figura 2. Inflorescencia de <i>Brownea macrophylla</i>	6
Figura 3. Modelo celular de la coagulación.....	8
Figura 4. Coagulo de fibrina.....	8
Figura 5. Estructura del fibrinógeno.....	10
Figura 6. Polimerización y estabilización de los monómeros de fibrina.....	12
Figura 7. Sistema fibrinolítico.....	13
Figura 8. Acción de plasmina sobre el fibrinógeno.....	14
Figura 9. Cinética de polimerización de fibrinógeno pretratado con extracto acuoso.....	28
Figura 10. Cromatograma del extracto acuoso por exclusión molecular.....	28
Figura 11. Cromatograma de la fracción S4.....	30
Figura 12. Perfil de elución de la mezcla de proteínas.....	31
Figura 13. Curva de selectividad de los marcadores de masa molecular conocidos.....	32
Figura 14. Electroforesis en gel en gradiente de 4 a 20 % en condiciones no reductoras.....	33
Figura 15. Curva de movilidad relativa.....	33
Figura 16. Actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en condiciones reductoras.....	37
Figura 17. Actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en condiciones no reductoras.....	37
Figura 18. Actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad en condiciones no reductoras.....	38
Figura 19. Actividad de las fracciones S4, S4A sobre las cadenas de fibrinógeno.....	38
Figura 20. Presencia de carbohidratos en las fracciones.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Compuestos bioactivos aislados de plantas y uso clínico.....	4
Tabla 2. Fibrinogenasas aisladas y caracterizadas de otros organismos.....	16
Tabla 3. Fraccionamiento del extracto acuoso por Sephadex G-50.....	29
Tabla 4. Purificación de la fracción S4 con IMAC-Zn Separopore.....	30
Tabla 5. Purificación de componente fibrinogenolítico.....	30
Tabla 6. Masas moleculares de compuestos conocidos.....	31
Tabla 7. Masas moleculares de las fracciones obtenidas por Sephadex G-50.....	32
Tabla 8. Actividad fibrinogenolítica a distinta cantidad de extracto.....	35
Tabla 9. Efecto del tiempo sobre la actividad fibrinogenolítica.....	35
Tabla 10. Cuantificación del porcentaje de degradación de las cadenas de fibrinógeno.....	39
Tabla 11. Cuantificación del porcentaje de degradación de la molécula de fibrinógeno.....	40
Tabla 12. Cuantificación del porcentaje de degradación en condiciones no reductoras de la fracción S4 en presencia de inhibidores de proteasas.....	41
Tabla 13. Cuantificación del porcentaje de degradación de la fracción S4A en condiciones no reductoras a distintos pH.....	42
Tabla 14. Cuantificación del porcentaje de degradación de la fracción S4A en condiciones no reductoras a distintas temperaturas.....	42

Lista de abreviaturas

Fg: fibrinógeno (Factor I FI)
Fb: fibrina (Factor Ia)
FN: fibronectina
FT: factor tisular
FII: protrombina
FIIa: trombina
FV: factor V
FVII: factor VII
FVIII: factor VIII
FIX: factor IX
FX: factor X
FXI: factor XI
FXII: factor XII
FXIII: factor XIII
FvW: factor von Willebrand
Plg: plasminógeno
Pln: plasmina
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPP: plasma pobre en plaquetas
t-PA: activador de plasminógeno tipo tisular
TT: tiempo de trombina
u-PA: activador de plasminógeno tipo uroquinasa
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
Fenant: 1,10 fenantrolina
AIA: ácido yodoacético