



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Aplicación de la cromatografía de exclusión molecular
(SEC-HPLC) para determinar el porcentaje de inhibición de
trombina basado en el estudio de la conversión
de fibrinógeno en fibrina

T E S I S

Para obtener el grado de

Maestro en Química

Presenta

Q.A. Emmanuel Pérez Escalante

Director

Dr. Gaaan Arturo Álvarez Romero

Codirector

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Asesores

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dra. María Elena Páez Hernández

Mineral de la Reforma, Hgo., junio 2017





M. en C. Julio César Leines Medécigo

Director de Administración Escolar
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al Candidato a Maestro en Química, **Q.A. Emmanuel Pérez Escalante**, quien presenta el trabajo “**Aplicación de la cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC) para determinar el porcentaje de inhibición de trombina basado en el estudio de la conversión de fibrinógeno en fibrina**”, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal (ICBI-AAQ)

SECRETARIO: Dra. Ma. Elena Páez Hernández (ICBI-AAQ)

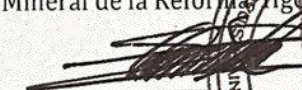
VOCAL: Dr. Gian Arturo Álvarez Romero (ICBI-AAQ)

SUPLENTE: Dr. Luis Guillermo González Olivares (ICBI-AAQ)

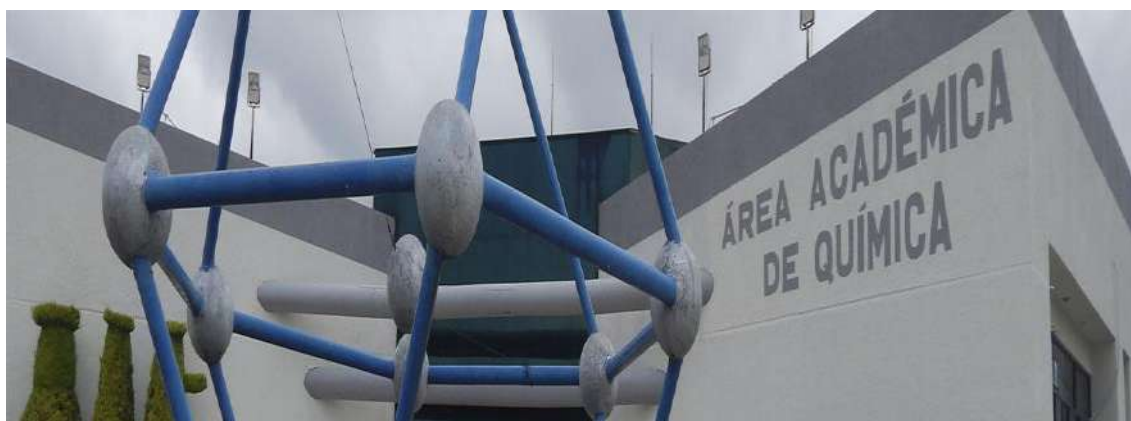
Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

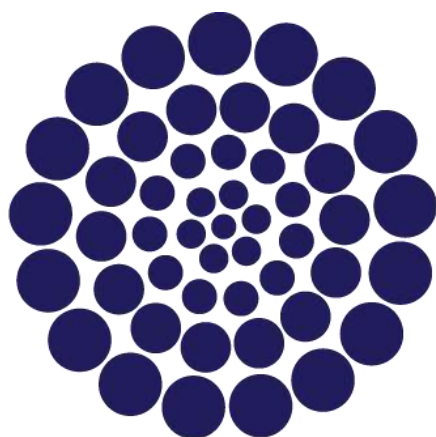
“Amor, Orden y Progreso”
Mineral de la Reforma, Hidalgo, 26 de mayo de 2017


Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICBI





El trabajo recopilado en esta tesis fue realizado en el laboratorio de Biotecnología I y el módulo de cromatografía de líquidos (HPLC) del Área Académica de Química perteneciente al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Así también, durante una estancia de investigación en el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de
manutención número 573417 para obtener el grado de Maestro en Química

AGRADECIMIENTOS

A Dios, la Virgen de Guadalupe y San Judas Tadeo por la hermosa familia con la que cuento, por brindarme salud y ayudarme a cumplir cada una de las metas de mi vida.

A mis papás Beto y Lupita por todo el amor que me brindan día a día, por su confianza plena en todo lo que hago, pero sobre todo por ser mis guías en los momentos de dudas y dificultad. Los amo.

A mis hermanos Made y Toño, por estar siempre al pendiente de mí, por sus preocupaciones y por ser un modelo a seguir desde el plano profesional hasta el personal. Los adoro.

A mis sobrinos Abril y Leo, esos pequeños angelitos que siempre están ahí brindándome alegría y que me hacen olvidar las problemáticas de cada día. Los amo muchísimo.

A esos ángeles que siempre me están guiando esté donde esté, como lo hacían cuando era solo un niño, a mi mamá Ofé, mi papá Memo y mi abuelita Gloria, sé que cada éxito que cosecho es en gran medida a sus enseñanzas.

A mis amigos: Isaí, Francisco, Jessica, Lupita, Gabby, Oscar, Pako, Ace y Alexis, gracias por cada uno de los momentos vividos, por su apoyo, por su compañía, por su amistad y por sus consejos. Los aprecio muchísimo.

A mis asesores: El Dr Guillermo y el Dr Giaan por su pleno apoyo y confianza hacia este proyecto, que a pesar de presentar ciertos inconvenientes nunca dejaron de creer en que algo bueno saldría de esta investigación.

A la Dra Alma, por todo el apoyo brindado durante mi estancia en la UAM-I por siempre estar al pendiente desde el punto de vista profesional y personal, pero sobre todo por la confianza mostrada hacia mi persona.

A los chicos del laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la UAM-I: Aurea, Lupita, Alfredo, Fer, Katia, Frank, Ángel,

Nahum, Yaz, Alicia y Marieli por toda su ayuda durante mi estancia en México, por compartir momentos agradables y por brindarme su apoyo cada día.

A mis asesores: La Dra Paéz y el Dr Galán por sus comentarios para que este trabajo se enriqueciera y por su apoyo durante toda la maestría.

Al Dr Huizar por brindarme su apoyo y compartir parte de sus conocimientos para la realización de una parte de este trabajo.

A todos ustedes muchas gracias!!!!

ÍNDICE

Introducción	2
Marco Teórico	
2.1 La trombosis: un padecimiento de incidencia mundial	5
2.1.1 Trombosis y características patológicas	5
2.1.2 Estadísticas nacionales y mundiales de incidencia de trombosis	6
2.2 El proceso de coagulación como una herramienta en el análisis de moléculas con actividad antitrombótica	7
2.2.1 El mecanismo natural de la coagulación	7
2.2.2 Conversión del fibrinógeno en fibrina	9
2.2.2.1 Moléculas involucradas en el proceso de conversión fibrinógeno-fibrina	9
2.2.2.1.1 Fibrinógeno	9
2.2.2.1.2 Fibrina	10
2.2.2.1.3 Trombina	11
2.2.2.2 El proceso de conversión de fibrinógeno a fibrina	13
2.3 Compuestos antitrombóticos	14
2.3.1 Clasificación de los compuestos antitrombóticos	14
2.3.2 Mecanismo de acción de los agentes anticoagulantes	15
2.3.2.1 Inhibidores de la actividad de la trombina	15
2.4 Métodos analíticos para la determinación del potencial inhibitorio de trombina	17
2.4.1 Metodologías basadas en técnicas espectrofotométricas	18
2.4.1.1 Métodos basados en el uso de sustratos cromogénicos	18
2.4.1.2 Métodos turbidimétricos en el análisis de inhibición de trombina	24
2.4.2 Análisis clínicos para la determinación del potencial anticoagulante	29
2.4.2.1 Ensayo de tiempo de trombina (TT) para la determinación del potencial inhibitorio de trombina	29
2.4.3 Métodos cromatográficos y electroquímicos como una alternativa en la determinación del poder inhibitorio de trombina	33
2.4.3.1 Métodos electroquímicos para la determinación de la actividad de la trombina	33
2.4.3.2 Cromatografía para la determinación de la capacidad inhibitoria de la trombina	34
2.4.3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC) como una herramienta potencial para la determinación de la capacidad inhibitoria de trombina	40
Justificación	43
Hipótesis y Objetivos	
4.1 Hipótesis	45
4.2 Objetivo General	45
4.3 Objetivos Específicos	45
Metodología Experimental	
5.1 Proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina	47
5.1.1 Sistemas de reacción analizados mediante SEC-HPLC	47
5.1.2 Condiciones de incubación y pre-tratamiento de los sistemas de reacción previo a su análisis en SEC-HPLC	47
5.2 Selección del agente solubilizante de fibrina	48
5.2.1 Determinación del mejor agente solubilizante de fibrina	48
5.2.2 Efecto de algunos agentes solubilizantes de fibrina en los sistemas de reacción	48

5.3	Separación cromatográfica de los productos de reacción mediante SEC-HPLC	49
5.3.1	Condiciones cromatográficas de análisis	49
5.3.2	Elaboración de una curva patrón de pesos moleculares	50
5.3.3	Curva estándar de fibrinógeno	50
5.3.4	Cálculo del porcentaje de inhibición de trombina	50

Resultados y Discusiones

6.1	Proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina	52
6.2	Selección del agente solubilizante de fibrina	53
6.2.1	Dispersión de fibrina mediante descenso de pH	54
6.2.2	Dispersión de fibrina mediante el uso de agentes caotrópicos	60
6.2.2.1	Adición de bromuro de sodio como dispersante de fibrina	60
6.2.2.2	Adición de urea como dispersante de fibrina	63
6.3	Separación cromatográfica de los productos de reacción mediante SEC-HPLC	67
6.3.1	Elaboración de curva patrón de pesos moleculares	67
6.3.2	Perfil cromatográfico y curva patrón de fibrinógeno	69
6.3.3	Perfil cromatográfico obtenido al utilizar urea como agente dispersante	70
6.3.4	Evaluación de la capacidad inhibitoria de la heparina mediante SEC-HPLC	74

Conclusiones	77
---------------------	----

Perspectivas	79
---------------------	----

Referencias Bibliográficas	81
-----------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Investigaciones donde se utilizó a los sustratos cromogénicos para determinar la capacidad anticoagulante	20
Tabla 2. Investigaciones donde se emplearon métodos turbidimétricos para determinar la capacidad anticoagulante	25
Tabla 3. Investigaciones donde se empleó el método tiempo de trombina (TT) para determinar la capacidad anticoagulante	31
Tabla 4. Investigaciones donde se ha empleado la RP-HPLC para realizar el seguimiento de fibrinopéptidos	36
Tabla 5. Pesos moleculares de las proteínas utilizadas como estándar	50
Tabla 6. Tiempos de retención obtenidos para cada una de las proteínas utilizadas como estándar	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cristalografía de fibrinógeno	10
Figura 2. Micrografía de gel de fibrina	11
Figura 3. Superficie electrostática molecular de la trombina	13
Figura 4. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas con adición de ácido tricloroacético (TCA)	55
Figura 5. Espectro UV-vis de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración de 0.64% (p/v)	55
Figura 6. Superficie electrostática molecular del fibrinógeno	57
Figura 7. Análisis de interacción molecular entre TCA y fibrinógeno, TCA y dominio D del fibrinógeno y TCA y dominio E del fibrinógeno	58
Figura 8. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas de reacción con adición de ácido acético	59
Figura 9. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas de reacción con adición de ácido fosfórico	60
Figura 10. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de NaBr como agente dispersante de fibrina hasta alcanzar una concentración 5.8 M	62
Figura 11. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de NaBr a 0.97 M como agente dispersante de fibrina	63
Figura 12. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de urea a 5 M como agente dispersante de fibrina	64
Figura 13. Cromatogramas obtenidos a partir de la inyección de NaBr y urea a las concentraciones donde presentaron la solubilidad del gel de fibrina	65
Figura 14. Análisis de interacción molecular entre Urea y fibrinógeno, Urea y dominio D del fibrinógeno y Urea y dominio E del fibrinógeno	66
Figura 15. Cromatogramas correspondientes a cada una de las proteínas utilizadas como estándar de peso molecular.	68
Figura 16. Curva estándar \log_{10} P.M. vs t_R	69
Figura 17. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de fibrinógeno a diferentes concentraciones	70
Figura 18. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los diferentes sistemas de reacción con adición de urea	71



INTRODUCCIÓN

La trombosis es una patología caracterizada por la formación de coágulos sanguíneos, los cuales obstruyen el flujo normal de la sangre a través de venas o arterias. Ésta influye en un 50-85% en los casos relacionados a enfermedades cardiovasculares produciendo infartos al corazón, afectaciones cerebrovasculares y tromboembolismo venoso o pulmonar.

El estudio llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud sobre Enfermedades, Lesiones y Factores de Riesgo en el año 2010 determinó que las enfermedades cardiovasculares provocaron 13.2 millones de muertes alrededor del mundo, equivalente al 25% del total de defunciones registradas en ese año, siendo los infartos al corazón la causa principal, seguido de los accidentes cerebrovasculares y el tromboembolismo. Debido al alto índice de mortalidad y morbilidad que ocasiona la trombosis es considerada un problema de salud pública en Estados Unidos y la Unión Europea, a pesar de las diversas terapias antitrombóticas existentes en la actualidad.

Las investigaciones para el estudio y desarrollo de nuevos compuestos con propiedades antitrombóticas se ha incrementado en los últimos años, tendiendo especial importancia la determinación de la capacidad anticoagulante de nuevas moléculas. Estos estudios se han enfocado en la producción de anticoagulantes derivados de productos naturales, obtenidos a partir de procesos enzimáticos, microbiológicos o químicos con la finalidad de ofrecer una alternativa a los compuestos anticoagulantes usados actualmente, como es el caso de la heparina o la warfarina.

Entre las metodologías comúnmente utilizadas para determinar el potencial anticoagulante se encuentra la aplicación de sustratos cromogénicos y electrogénicos de la trombina, los cuales están formados por la unión de polipéptidos con p-nitroanilina (p-NA) o p-aminodifenilamida (p-ADA); ligantes químicos capaces de generar una señal espectrofotométrica o electroquímica, una vez que son separados mediante hidrólisis enzimática. El principal inconveniente de estas técnicas deriva de la incapacidad que tienen para reflejar la actividad biológica total de la trombina, debido a que están enfocadas solamente a determinar la inhibición que se lleva en el centro activo de la misma.

Para solventar este inconveniente se hace uso de técnicas turbidimétricas y ensayos clínicos cuya finalidad es simular algún proceso llevado a cabo durante la coagulación sanguínea. En el caso de la turbidimetría se realiza el seguimiento del cambio en la

absorbancia producido por la conversión de fibrinógeno en fibrina, esto permite obtener un análisis cuantitativo del poder inhibitorio sobre la trombina, mientras que en los ensayos clínicos sólo se mide el tiempo en el que se alcanza la formación de fibrina.

Sin embargo, estas técnicas de análisis presentan importantes inconvenientes, ya que los ensayos clínicos no proporcionan información cuantitativa de la inhibición; mientras que las técnicas turbidimétricas presentan fuertes interferencias en la región de lectura espectrofotométrica, además de los pocos estudios para discriminar entre los compuestos capaces de unirse bivalentemente al sitio activo y exosito I de la trombina de los compuestos que únicamente se unen al exosito I.

La cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) es la única técnica analítica que proporciona información acerca del probable sitio de unión de los inhibidores de la trombina, mediante el seguimiento de la concentración de fibrinopéptidos liberados por la hidrólisis enzimática a través del tiempo. No obstante, la principal desventaja del análisis es el tiempo requerido para su completa liberación, los métodos de pre-concentración necesarios para su detección, además del uso de gradientes cromatográficos para su separación.

Dadas las desventajas de las técnicas antes mencionadas, queda de manifiesto el reto de proponer nuevas metodologías que ofrezcan información confiable sobre la capacidad antitrombótica de nuevas moléculas con potencial farmacológico. Es por ello que el objetivo de este trabajo de investigación fue determinar el potencial que tiene la cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC), técnica ampliamente usada en el análisis de proteínas por su sensibilidad y reproducibilidad, para determinar la capacidad anticoagulante de diversos compuestos, mediante el seguimiento de la conversión de fibrinógeno en fibrina. Durante el desarrollo experimental se identificaron y se evitaron algunas interferencias durante la separación cromatográfica obteniendo un perfil característico para el fibrinógeno, que fue la molécula que sirvió para determinar de forma indirecta el grado de inhibición de la trombina.



MARCO TEÓRICO

2.1 La trombosis: un padecimiento de incidencia mundial

2.1.1 Trombosis y características patológicas

La trombosis es una patología del sistema cardiovascular caracterizada por la formación de coágulos sanguíneos o trombos, constituidos principalmente por eritrocitos, plaquetas y redes de fibrina, que en conjunto, forman una densa masa hemática capaz de impedir el flujo normal de la sangre a través de venas o arterias (Catto, 2005; Mitchel 2010).

Esta patología está caracterizada por un desorden del proceso hemostático normal, originando un desequilibrio en el sistema biológico que mantiene la sangre en su forma fluida. Las alteraciones de diversas enzimas y proteínas que mantienen un equilibrio dinámico del proceso de coagulación sanguínea, propicia en ocasiones, la formación excesiva de trombos y como consecuencia accidentes cardiovasculares (Martínez-Murillo y Quintana-González, 2005).

La incidencia de la trombosis es multifactorial, destacándose dos clases de factores: los de tipo hereditario y los factores adquiridos, siendo estos últimos los mayores responsables de los índices de morbilidad y mortalidad (Martínez-Murillo y Quintana-González, 2005; Beckman *et al*, 2010).

Dentro de los factores de origen hereditario o también llamados por Virchow como trastornos de hipercoagulabilidad se encuentran deficiencias en la actividad o concentración de moléculas que actúan como antitrombóticos naturales del sistema de coagulación sanguínea como la deficiencia de antitrombina, proteína C, S; así como trastornos que promueven la excesiva formación de coágulos como lo son el síndrome de plaquetas pegajosas, la resistencia al plasminógeno y mutaciones del gen productor de protrombina (Martínez-Murillo y Quintana-González, 2005; Beckman *et al*, 2010).

Mientras que los factores hereditarios se asocian principalmente a casos aislados, los factores adquiridos son más comunes, por lo que su control es de vital importancia en el manejo epidemiológico. En éstos, los riesgos principales se encuentran asociados a hospitalizaciones y padecimientos adquiridos independientes a traumatismos cardiovasculares, teniéndose como principales fuentes de riesgo a la obesidad, la inmovilización prolongada, lesiones endoteliales internas y cáncer (Cabrera-Rayó y Nellen-Hummel, 2007; Beckman *et al*, 2010).

2.1.2 Estadísticas nacionales y mundiales de incidencia de trombosis

Debido a que la trombosis está estrechamente relacionada con casos de infartos al corazón, daños cerebrovasculares y tromboembolismo venoso, es considerada una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. De acuerdo al Estudio Global de Enfermedades, Lesiones y Factores de riesgo llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2010, diversas condiciones cardiovasculares originaron una de cada cuatro muertes en el mundo (Raskob *et al.*, 2014; Wendelboe y Raskob, 2016).

Dicho estudio calcula que, de las 52.8 millones de muertes registradas alrededor del mundo en el año 2010, el 13% fueron causados por infartos al corazón y la mitad de éstas, propiciadas por un origen trombótico. Sin embargo, los efectos negativos hacia la salud no sólo se traducen en decesos, sino también en incapacidades derivadas de las consecuencias producidas por este padecimiento. En este sentido, el infarto al corazón lidera las causas de incapacidad a nivel mundial con un incremento del 29% con respecto al año 1990 (Raskob *et al.*, 2014; Wendelboe y Raskob, 2016).

En lo que respecta a las estadísticas relacionadas con accidentes cerebrovasculares, el estudio revela que el 11% de la mortalidad se debió a este tipo de padecimientos, donde los traumatismos tromboembólicos tuvieron una relación directa en el 85% de los casos presentados en países desarrollados, mientras que del 50% en países en vías de desarrollo (Raskob *et al.*, 2014; Wendelboe y Raskob, 2016).

El problema más grave y en el que están basados los estudios epidemiológicos provocados por la trombosis, son los relacionados a los padecimientos tromboembólicos venosos, debido a que usualmente estos traumatismos no son de características fatales, por lo que no impactan directamente en los índices de mortalidad, no obstante, sí en las estadísticas de incapacidad (Raskob *et al.*, 2014).

Un estudio llevado a cabo por la Unión Europea en el año 2004, revela que sólo el 0.24% de la población total presentó algún caso de trombosis venosa, teniéndose un total de 1.2 millones de casos, de los cuales el 49% terminó siendo de características fatales. En los Estados Unidos es considerado un problema de salud pública debido a que se presentan en promedio de 300,000 a 600,000 casos por año (Beckman *et al.*, 2010; Raskob *et al.*, 2014).

En el caso de México, la secretaría de salud reporta un aproximado de 67,000 muertes por trombosis anualmente, con una tasa de incidencia anual de entre 150,000 y 200,000 casos. Igual que a nivel mundial, la principal causa de muerte por trombosis fue la relacionada a casos coronarios con un 64%, mientras que el restante 36% fue debido a trombosis de características cerebrales (González-Orozco y Zavala-Hernández, 2005; Martínez-Murillo y Quintana-González, 2005).

En lo que respecta a la trombosis venosa, México no cuenta con suficientes datos epidemiológicos de incidencia y mortalidad producida por esta enfermedad de la misma forma que ocurre a nivel mundial. A pesar de ello, el conteo realizado por algunos hospitales del país permite llegar a la conclusión de que la incidencia es de alrededor de un caso por cada 10,000 adultos jóvenes, mientras que aumenta a un caso por cada 100 en adultos mayores (Martínez-Murillo y Quintana-González, 2005; Cabrera-Rayó y Nellen-Hummel, 2007)

2.2. El proceso de coagulación como una herramienta en el análisis de moléculas con actividad antitrombótica

2.2.1 El mecanismo natural de la coagulación

El proceso de coagulación es activado cuando existe un daño tisular externo o interno, originando la liberación de 12 proteínas conocidas como *factores de coagulación*, cuya nomenclatura se basa en la asignación secuencial de números romanos. Cada factor desempeña una función específica para la regulación del proceso, teniendo como objetivo final la reparación de daños celulares originados por diversos factores, evitando principalmente, la pérdida de sangre a partir de la formación de trombos (Adams y Bird, 2009; Palta *et al*, 2014).

El equilibrio del proceso de coagulación o hemostasia es llevado a cabo por un sistema enzimático complejo, donde diferentes reacciones se desarrollan en cadena reguladas bajo condiciones específicas por *zimógenos*. Dentro de los zimógenos principales destaca la protrombina, que da origen a la trombina, enzima encargada de la transformación de fibrinógeno en fibrina (Adams y Bird, 2009; Palta *et al*, 2014).

Para el estudio del proceso de hemostasia, se han propuesto dos enfoques distintos. El primero de ellos fue desarrollado en 1960, dividiendo el proceso en tres vías fundamentales:

- ❖ Vía extrínseca, caracterizada por la activación del factor tisular presente en el tejido endotelial vascular, promoviendo la complejación entre el factor tisular (III) y el factor proconvertina (VII), para a su vez, activar los factores Christmas (IX) y Stuart Prower (X), siendo este último el encargado de hidrolizar la protrombina para la generación de trombina (Turgeon, 2005; Palta *et al*, 2014).
- ❖ Vía intrínseca, que es una ruta paralela a la vía extrínseca, donde la tromboplastina (factor XI) es activado para iniciar la formación de un complejo entre los factores VIII y IX en la superficie fosfolipídica, comenzando la activación del factor X.
- ❖ Vía común, donde convergen las vías anteriores, teniendo como objetivo principal la formación de trombina, para dar paso a la conversión del fibrinógeno en fibrina (Turgeon, 2005; Palta *et al*, 2014).

El segundo enfoque del estudio de la hemostasia fue desarrollado en los últimos años de acuerdo a la secuencia de reacciones que se llevan *in vivo*, demostrándose que la vía intrínseca no es una etapa paralela a la vía extrínseca, sino más bien, una ruta a seguir para aumentar la producción de trombina. En este segundo enfoque, se distinguen cuatro etapas (Palta *et al*, 2014):

- ❖ Etapa de iniciación, donde el factor tisular (III) es unido tanto al factor proconvertina (VII) como a iones calcio, formando un complejo ternario capaz de activar tanto al factor IX como al X en una sola etapa y no en dos vías (extrínseca e intrínseca) como se propuso en el primer enfoque. En esta etapa se producen las primeras moléculas de trombina en un orden de concentración que alcanza los 10^{-12} M, para posteriormente aumentarla si fuera necesario durante etapas posteriores.
- ❖ Etapa de amplificación del proceso hemostático, donde se lleva a cabo el aumento de la concentración de trombina necesaria para la formación de un coágulo capaz de evitar el desangrado del tejido dañado previamente, este objetivo es logrado gracias a un proceso de retroalimentación, donde la trombina producida en la etapa de iniciación activa a los factores V y VIII, quienes a su vez actúan como cofactores para la hidrólisis de protrombina, acelerando de esta manera la producción de trombina (Adams y Bird, 2009; Palta *et al*, 2014).
- ❖ Etapa de propagación, que se da una vez que se ha generado la cantidad de trombina necesaria, y es donde ocurre la transformación del fibrinógeno en monómeros de fibrina, los cuales coalescen para formar polímeros lineales.

- ❖ Etapa de estabilización, aquí los polímeros lineales son finalmente entrecruzados por el factor XIII (Adams y Bird, 2009; Palta *et al.*, 2014).

2.2.2 Conversión del fibrinógeno en fibrina

La transformación de fibrinógeno en fibrina es una de las reacciones más importantes desde el punto de vista fisiológico, ya que la fibrina forma una red tridimensional que estabiliza los trombos originados. Aunado a esta importancia fisiológica, este proceso de conversión es ampliamente estudiado para el desarrollo de fármacos antitrombóticos, que son capaces de inhibir este proceso mediante la unión específica al sitio catalítico de la trombina o a uno de los exositos presentes en la misma (Adams y Bird, 2009).

2.2.2.1 Moléculas involucradas en el proceso de conversión fibrinógeno-fibrina

2.2.2.1.1 Fibrinógeno

El fibrinógeno es una glicoproteína dimérica con un peso molecular promedio de 340 kDa, la cual se encuentra constituida por tres cadenas peptídicas distintas denominadas α , β y γ , cuyos pesos moleculares son de 66.06 kDa, 54.36 kDa y 48.53 kDa respectivamente (Teijón, 2006; Kollman *et al.*, 2009). Su estructura está dividida en tres partes principales:

- ❖ Dominio E o central, correspondiente a la parte N-terminal de las tres cadenas peptídicas y donde se encuentran encriptados dos péptidos de bajo peso molecular (1.5 kDa), llamados fibrinopéptidos A y B por formar parte de las cadenas α y β (Teijón *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2003).
- ❖ Dominio D, constituida por dos dominios laterales, donde se concentra la parte C-terminal de las tres cadenas peptídicas que componen al fibrinógeno.
- ❖ La tercera parte la constituye la conexión de las cadenas α , β y γ a través de una configuración de α -hélice. Su estabilización es derivada de la acción de 29 enlaces disulfuro distribuidos en cada una de estas partes (Henschen *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1993; Spraggon *et al.*, 1997).

Esta macromolécula contiene además grupos carbohidrato en forma de oligosacáridos biantenarios compuestos por N-acetilglucosamina, galactosa, manosa y ácido siálico unidos a las cadenas β y γ mediante un enlace con la asparagina (Asn) en la posición 364 para el caso de la cadena β y en la posición 52 para la cadena γ . La influencia

principal del grupo carbohidrato radica en el proceso de coagulación, debido a que se ha demostrado una influencia del ácido siálico en la velocidad de formación de monómeros de fibrina, retrasándola a causa de la fuerte carga negativa que éste imparte (Townsend, *et al.*, 1982; Kollman *et al.*, 2009).

La estructura tridimensional del fibrinógeno se muestra en la figura 1, donde se destacan las partes principales de la molécula.

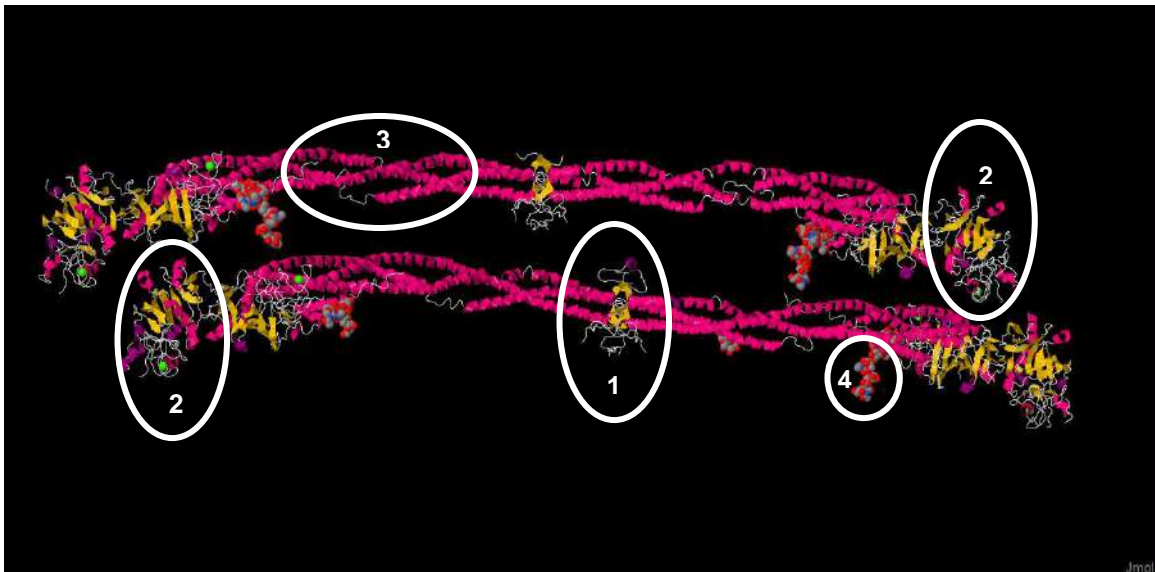


Figura 1. Cristalografía de fibrinógeno obtenida a partir del banco de datos de proteína (PDB, 3GHG). 1: Dominio E, 2: Dominio D, 3: Configuración α -hélice, 4: Grupo carbohidrato.

2.2.2.1.2 Fibrina

La fibrina es el producto de reacción generado por la liberación de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno mediante la acción proteolítica de la trombina. Su estructura es la de un hidrogel tridimensional formado por protofibrillas de monómeros de fibrina con una periodicidad de 22.5 nm (Weisel, 2005; Janmey *et al.*, 2009).

El volumen de un gel de fibrina está constituido por un 0.25% de fibrina, mientras que el restante 99.75% pertenece al líquido atrapado en las redes del polímero. En lo que respecta a su solubilidad, esta es dependiente del tipo de gel fibrina producido. En el caso de los geles de fibrina unidos por interacciones electrostáticas, éstos son estables a pH neutro, sin embargo, su solubilidad aumenta a pH ácido y en disoluciones de ácido monocloroacético (1%), urea (30%) y NaBr (10%) (Ariëns, 1972; Weisel, 2004; Maya y Thomas, 2012;). Para el caso de los geles de fibrina entrecruzados por transglutaminación, su solubilidad se reduce de manera importante

en soluciones de urea, sin embargo, su solubilización llega a concretarse al incubarse con enzimas fibrinolíticas que desestabilizan la fibrina entrecruzada.

En la Figura 2 se muestra una micrografía de un gel de fibrina preparado con $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de fibrinógeno y $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de trombina a $\text{pH}=7.4$ y con 150 mM de NaCl .

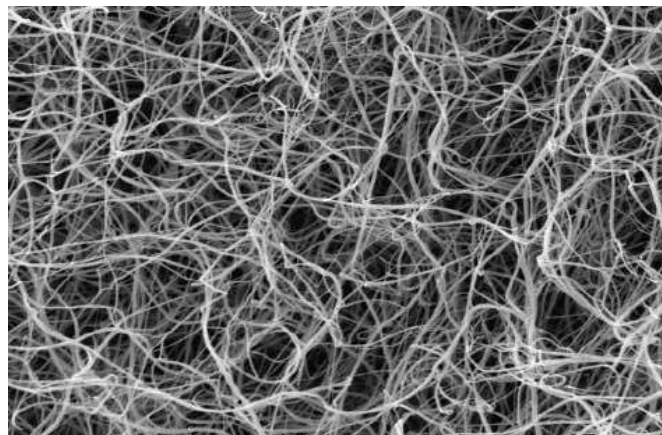


Figura 2. Micrografía de gel de fibrina tomada de Janmey *et al.*, 2009.

2.2.2.1.3 Trombina

La trombina (EC. 3.4.21.5) es una serinproteasa encargada de la hidrólisis del fibrinógeno para dar origen a la formación de fibrina. Esta enzima tiene una gran importancia desde el punto de vista fisiológico, debido a que no sólo se encarga de esta transformación, sino también está involucrada en la regulación del proceso de coagulación, activando diversos factores pro-coagulantes y anticoagulantes del sistema hemostático (Davie y Kulman, 2006; Crowley *et al.*, 2007).

Su síntesis a partir de la hidrólisis de su precursor *protrombina*, generando una estructura esférica de un peso molecular de 35.5 kDa , caracterizada por la unión covalente de grupos sulfuro presentes en dos cadenas peptídicas denominadas A y B, las cuales están compuestas por 36 y 259 residuos de aminoácidos respectivamente (Bode, 2006; Davie y Kulman, 2006).

En la estructura de la trombina destacan cuatro sitios de interés funcional, el primero de ellos es el sitio catalítico conformado por serina en la posición 195 (Ser-195), histidina en la posición 57 (His-57) y ácido aspártico en la posición 189 (Asp-189); estos tres residuos trabajan en conjunto para llevar a cabo la hidrólisis de los sustratos afines a la trombina mediante un ataque nucleofílico (Bode, 2006; Davie y Kulman, 2006).

Sobre la superficie de la trombina se encuentran las otras dos áreas de importancia catalítica, son conocidas como exositos I y II. Funcionan como agentes selectivos para la unión preferencial de sustratos o inhibidores de esta enzima. Ambos presentan aminoácidos básicos, quienes aportan una carga positiva a esta zona a pH fisiológico (7.4), lo que hace posible la unión de moléculas con carga negativa mediante interacciones electrostáticas (Davie y Kulman, 2006; Crowley *et al.*, 2007).

Mientras que el exosito I, también llamado *sitio de reconocimiento de fibrinógeno* está compuesto por lisinas en la posición 21, 106 y 107 (Lys-21, 106, 107), tirosina en la posición 71 (Tyr-71) y argininas en las posiciones 62, 68, 70, 71 y 73 (Arg-62, 68, 70, 71, 73); el exosito II está conformado por residuos principalmente de argininas (Arg-89, 98, 245) y lisinas (Lys-248-252) que mantienen interacciones electrostáticas con aminoglicanos sulfatados, como es el caso de la heparina y con cofactores que mejoran la inhibición de la trombina por acción de la antitrombina (Davie y Kulman, 2006; Crowley *et al.*, 2007).

La trombina es una enzima con una alta especificidad, originada de la afinidad por residuos de aminoácidos alifáticos en la posición cuatro de la región N-terminal del polipéptido a hidrolizar, así como de prolina (Pro) en la posición dos y Arg en la posición uno de esta región; mientras que la presencia de residuos ácidos en la posición tres de la región C-terminal, así como de Pro en la posición uno de la misma región son factores de restricción para llevar cabo la acción proteolítica por parte de esta enzima (Bode, 2006; Davie y Kulman, 2006).

El último sitio de importancia enzimática es el localizado en los residuos Tyr-190, Arg-233 y Lys-236, quienes son capaces de coordinar iones sodio a través de oxígeno presente en el carbonilo de estos aminoácidos; el sodio coordinado mejora la actividad catalítica al funcionar como un modulador alostérico, incrementando el acceso hacia el sitio catalítico por parte del fibrinógeno (Bode, 2006; Davie y Kulman, 2006; Crowley *et al.*, 2007). En la Figura 3 se muestra la estructura cristalina de la trombina así como los principales sitios de interés catalítico.

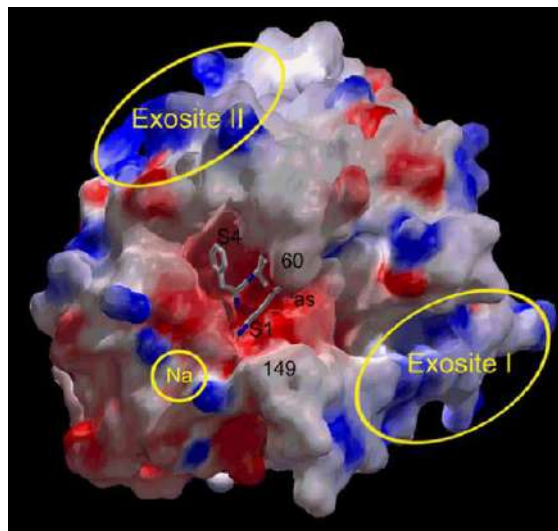


Figura 3. Superficie electrostática molecular de la trombina. Tomada de Bode, 2006.

2.2.2.2. El proceso de conversión de fibrinógeno a fibrina

La transformación del fibrinógeno en un polímero de fibrina es un proceso conformado por tres pasos principales, el primero de éstos es la proteólisis del fibrinógeno por parte de la trombina, seguido del ensamblaje de los monómeros de fibrina generados por acción de esta enzima y finalmente un proceso de entrecruzamiento de la red de fibrina (Doolittle, 2003; La Corte *et al.*, 2011).

El proceso proteolítico por parte de la trombina comienza con el acoplamiento molecular entre ésta y el dominio E del fibrinógeno, formando un complejo mediante la interacción iónica de los residuos cargados positivamente del exosito I de la trombina y los residuos de aspartato (Asp), glutamato (Glu) y tirosin-O-sulfato que poseen los fibrinopéptidos presentes en este dominio (Teijón *et al.*, 2001; Weisel, 2005).

El complejo resultante está formado por dos moléculas de trombina orientadas a los sitios opuestos de la parte central del dominio E de una molécula de fibrinógeno; esta orientación permite que la catálisis se lleve a cabo de forma adecuada liberando los fibrinopéptidos presentes en las cadenas α y β mediante un corte en el enlace arginina-glicina (Arg-Gly). La hidrólisis de este enlace propicia una modificación en la distribución de la carga neta del fibrinógeno, pasando de -20 a -7, sin embargo, el cambio de mayor significancia ocurre en la región del dominio E, la cual presenta un cambio de -8 a +5, mientras que el dominio D del fibrinógeno sólo sufre una ligera modificación pasando de -4 a -3 (Teijón, 2006; La Corte *et al.*, 2011).

Como resultado de la liberación de los fibrinopéptidos, se exponen dos sitios de unión del dominio central (E), conocidos como “knobs” A y B, cuya secuencia de

aminoácidos corresponde a la unión de Gly-Pro-Arg y Gly-His-Arg respectivamente. Estas secuencias de aminoácidos expuestos son las responsables de la modificación en la carga neta de la zona E del fibrinógeno y a su vez, funcionan como precursores de la formación de fibrina, debido a su interacción con los dominios D de los monómeros de fibrina vecinos, también llamados “holes” (Doolittle, 2003; Weisel, 2005; La Corte *et al.*, 2011).

La interacción *knobs-holes* ocurre de forma espontánea mediante una unión no covalente entre las cargas positivas presentes en los *knobs* y las cargas negativas de los *holes*, formando polímeros lineales de fibrina, cuya apariencia física es la de un coágulo blando. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de estabilización de este coágulo a través de la unión covalente de los residuos de glutamina (Gln) y lisina (Lys) por acción de una enzima transglutaminasa, encargada del entrecruzamiento de los polímeros lineales de fibrina, convirtiéndolo en un polímero en forma de red (Doolittle, 2003; Weisel, 2005; La Corte *et al.*, 2011).

2.3 Compuestos antitrombóticos

2.3.1 Clasificación de los compuestos antitrombóticos

Debido a la alta mortalidad y morbilidad causada por la trombosis y los padecimientos cardiovasculares con los que guarda relación, la aplicación y desarrollo de agentes antitrombóticos se ha vuelto una prioridad desde el punto de vista clínico a nivel mundial. Para el control de esta patología se hace uso de diferentes moléculas con distintas funciones, las cuales pueden abarcar una capacidad anticoagulante, antiagregante plaquetario o fibrinolítica y, en ocasiones, más de una propiedad con la finalidad de inhibir la formación de trombos (Hirsh y Weitz, 1999; Greineder *et al.*, 2013).

Los compuestos que bloquean los sitios de unión y activación de plaquetas son conocidos como *antiagregantes plaquetarios*. Estas moléculas tienen la capacidad de unirse selectivamente a diferentes receptores que sirven como puentes para la unión de diferentes unidades plaquetarias o que estimulan la producción de nuevas plaquetas activadas. Los fármacos más comunes son el ácido acetilsalicílico, el clopidogrel y el tirofiban (Arzamendi *et al.*, 2006; Weitz *et al.*, 2008)

La segunda capacidad con la que cuentan los agentes antitrombóticos es la actividad anticoagulante, caracterizada principalmente por la inhibición de la actividad

proteolítica de la trombina sobre el fibrinógeno, como es el caso de la heparina o hirudina. Sin embargo, existen moléculas que no sólo inhiben esta actividad enzimática, sino también, la generación de trombina, debido a que inhiben la acción de factores de coagulación cuya función es promover su formación, ejemplo de éstos son las cumarinas como la warfarina o el acenocumarol que inactivan a los factores VII, IX y X (Hirsh *et al.*, 2001; De Caterina *et al.*, 2013).

La última función con la que pueden contar los agentes antitrombóticos es la actividad fibrinolítica, cuyo objetivo es la degradación de fibrina mediante la activación del plasminógeno, enzima encargada de la disolución de los coágulos en el sistema hemostático normal. Existen dos tipos de fármacos fibrinolíticos: los no fibrinospecíficos, capaces de activar tanto al plasminógeno circulante en el torrente sanguíneo como al unido al coágulo formado; y los fibrinoespecíficos, quienes sólo activan el complejo binario plasminógeno-fibrina presente en el trombo, algunos ejemplos son la uroquinasa, estreptoquinasa y monteplasa (Ali *et al.*, 2014).

2.3.2 Mecanismo de acción de los agentes anticoagulantes

Los anticoagulantes son moléculas capaces de interferir en alguna de las etapas del proceso de coagulación, ya sea durante su iniciación o propagación, afectando principalmente el funcionamiento de factores procoagulantes como el factor VII, IX y X, además de la actividad enzimática de la trombina (Weitz *et al.*, 2008).

De manera general, es posible clasificarlos de acuerdo al tipo de inhibición que realizan:

- ❖ Anticoagulantes directos, quienes se unen a su molécula objetivo sin necesidad de intermediarios bloqueando la interacción con los sustratos.
- ❖ Anticoagulantes indirectos, los cuales mejoran la actividad de los anticoagulantes naturales del sistema hemostático, a través de una aceleración en el proceso de inhibición de las moléculas objetivo (Hirsh y Weitz, 1999; Weitz *et al.*, 2008).

2.3.2.1 Inhibidores de la actividad de la trombina

Como se ha mencionado anteriormente, la trombina es parte medular del proceso de coagulación debido a su acción proteolítica sobre el fibrinógeno, sin embargo, su importancia no sólo radica en la conversión del fibrinógeno en fibrina, sino también, en la activación de otras proteínas o factores de coagulación que se encuentran en las etapas previas a la generación de trombina, así como la modulación de factores anticoagulantes que finalizan el proceso (Stubbs y Bode; 1994; Esper *et al.* 2011).

La trombina actúa como regulador del proceso de coagulación mediante la activación de los factores V y VIII durante la etapa de amplificación, generándose una mayor cantidad de ésta; así también, promueve la agregación plaquetaria al actuar como activador plaquetario, además de estimular la producción de la enzima transglutaminasa, encargada del entrecruzamiento del polímero lineal de fibrina. A su vez, la trombina modula su propia inhibición, al activar moléculas con capacidad anticoagulante, tal es el caso de la trombomodulina, la proteína C y la antitrombina (Stubbs y Bode; 1994; Esper *et al.* 2011).

El proceso de inhibición de trombina es posible llevarlo a cabo mediante el acoplamiento de las moléculas anticoagulantes a los tres sitios de interés catalítico que presenta, los cuales corresponden a los dos exositos presentes en la periferia de la enzima y el sitio activo. Los compuestos que tienen la capacidad de actuar como anticoagulantes realizan su función de dos maneras distintas: la primera de éstas interviniendo como inhibidores directos de la trombina al unirse al centro activo, o como inhibidores indirectos al unirse al exosito II que funciona como zona de reconocimiento de heparina (Weitz *et al.*, 2008; Esper *et al.* 2011).

Los inhibidores directos de trombina, a su vez, pueden ser clasificados como *anticoagulantes directos monovalentes*, cuando sólo tienen la aptitud de bloquear el centro catalítico, como es el caso de los fármacos argatroban e inogratran; y *anticoagulantes directos bivalentes* cuando además de bloquear el centro catalítico, tienen la facultad para unirse al exosito I de la trombina, el cual, actúa como sitio de reconocimiento de sustratos. La ventaja de estos últimos es la mayor efectividad sobre la inhibición de la trombina, formando complejos de mayor estabilidad, ya que su disociación ocurre en un mayor tiempo comparado con los agentes monovalentes (Hirsh y Weitz, 1999; Esper *et al.* 2011).

La bivalirudina es un fármaco con actividad inhibitoria bivalente, es un polipéptido de 20 aminoácidos que forma un complejo reversible con la trombina, quien es capaz de hidrolizar un enlace Arg-Pro presente en el inhibidor y reestructurar su actividad catalítica. La principal ventaja de este polipéptido es su unión a la trombina circulante en el torrente sanguíneo y a la unida al trombo, lo que aumenta su efectividad (Esper *et al.* 2011).

No obstante, a pesar de las ventajas que ofrecen los inhibidores bivalentes en cuestiones como dosificación del mismo y tiempo de disociación del complejo

inhibidor-trombina, una gran desventaja es la formación irreversible de complejos con trombina como ocurre con el fármaco lepirudina, asociado principalmente a ser el causante de hemorragias por la casi nula disociación del complejo lepirudina-trombina (Esper *et al.* 2011).

En el caso de los inhibidores de trombina que actúan de forma indirecta, éstos tienen la capacidad de actuar como cofactores de los inhibidores naturales de la trombina, tal es el caso de la heparina, que mantiene una alta afinidad hacia la antitrombina, mejorando su actividad inhibitoria al formar un complejo ternario heparina-antitrombina-trombina enlazado al exosito II de la trombina. Así también la heparina, actúa en el mejoramiento del cofactor II de la heparina (HCII), que es una proteína capaz de inhibir la actividad de serinproteasas como la trombina, su poder inhibitorio es estimulado 1000 veces en presencia de heparina (Rossi *et al.*, 1999; De Caterina *et al.*, 2013).

2.4 Métodos analíticos para la determinación del potencial inhibitorio de trombina

El análisis del potencial anticoagulante de diversos compuestos de interés biológico se ha determinado por diferentes técnicas analíticas desde el descubrimiento de la heparina como inhibidor de la trombina en 1923 (Lever *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha logrado un avance significativo en los últimos años, debido a que las técnicas aplicadas desde hace veinte o treinta años siguen siendo utilizadas en la actualidad, a pesar de presentar algunas problemáticas en la reproducibilidad o precisión del método, aunado a los altos costos que algunas técnicas propician.

Las principales metodologías analíticas utilizadas para determinar la capacidad inhibitoria hacia la trombina por parte de distintas moléculas como carbohidratos sulfatados, péptidos liberados por acción proteolítica o moléculas sintetizadas de manera química, se basan en técnicas espectrofotométricas o de carácter clínico. Sin embargo, en los últimos años, la incorporación de técnicas cromatográficas o electroquímicas ha aparecido como una alternativa para el mejoramiento de los parámetros analíticos y la disminución de costos comparado a las técnicas de uso habitual (Ji *et al.*, 2012; Bouvier y Koza, 2014).

2.4.1 Metodologías basadas en técnicas espectrofotométricas

Los métodos empleados para determinar la capacidad anticoagulante de diferentes compuestos que están basadas en el cambio en una propiedad espectrofotométrica pueden ser divididas en dos grandes grupos: las técnicas basadas en la utilización de sustratos cromogénicos de la trombina y las técnicas turbidimétricas fundamentadas en el aumento de absorbancia por la formación de fibrina.

2.4.1.1 Métodos basados en el uso de sustratos cromogénicos

Los sustratos cromogénicos fueron desarrollados en la década de los 60's como respuesta a la necesidad de implementar una metodología rápida para el análisis de la actividad de trombina en los ámbitos clínicos y de investigación. En esta década se sintetizaron los primeros sustratos artificiales de la trombina, como lo fue el benzoil-arginin-p-nitroanilina (BAPNA); posteriormente para los años 70's se comenzó con la síntesis de pequeños péptidos con características más similares al enlace del fibrinógeno que es hidrolizado por parte de la trombina, aumentando el grado de especificidad de los sustratos. Ejemplo de éstos fueron el benzoil-fenilalanin-valin-arginin-p-nitroanilina (Bz-Phe-Val-Arg-pNA) conocido comercialmente como S2160 o el tosil-glicin-prolin-arginin-p-nitroanilina (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), también llamado Chromozym-TH (Hutton, 1987; Izquierdo y Burguillo, 1989).

Las técnicas espectrofotométricas que hacen uso de estos sustratos se fundamentan en el rompimiento del enlace amida entre los residuos de aminoácidos y la p-nitroanilina (pNA) por acción de la trombina, como consecuencia se libera pNA, compuesto capaz de absorber la luz alrededor de los 400 nm. La velocidad de liberación de pNA es directamente proporcional a la actividad enzimática ejercida por la trombina, por lo cual es posible calcular el grado de inhibición de trombina mediante el cambio de absorbancia que se genera en presencia y ausencia de un inhibidor enzimático (Hutton, 1987; Izquierdo y Burguillo, 1989).

La ventaja de los métodos cromogénicos es su simplicidad, automatización y rapidez. No obstante, también presentan algunas desventajas como: el no reflejar la total actividad biológica de la trombina, ya que representan sólo una pequeña porción del sustrato natural de la enzima; y el no poder ser utilizados para determinar el poder anticoagulante de inhibidores directos bivalentes, debido a que los sustratos cromogénicos solamente están diseñados para simular el mecanismo proteolítico entre el sitio activo y el enlace Arg-Gly del fibrinógeno y no el mecanismo de reconocimiento

de sustrato que ocurre en el exosítio I de la trombina (Soria *et al.*, 1980; Hutton, 1987; Rupin *et al.*, 1995).

A pesar de presentar diversas desventajas, el uso de este tipo de metodología sigue siendo muy recurrente en el análisis de moléculas con posible potencial anticoagulante. En la Tabla 1 se presentan algunos trabajos de investigación donde fue utilizado este método.

Tabla 1. Investigaciones donde se utilizó a los sustratos cromogénicos para determinar la capacidad anticoagulante.

Molécula	Agente cromogénico utilizado	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Proteasa de <i>Bacillus cereus</i> FF01	Tosil-Gly-Pro-Arg-pNA	[Tosil-Gly-Pro-Arg-pNA]: 7.5 μ M [Trombina]: 0.03 U·mL ⁻¹ Buffer: Fosfatos 50 mM pH=7.4 Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	NR	NR	Majumdar <i>et al.</i> , 2015
Hirudina purificada de extracto de sanguijuela	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238)	[S2238]: 50 μ M [Trombina]: 0.6 U·mL ⁻¹ Buffer: Fosfatos 10 mM pH=7.4, 0.12 M de NaCl, 0.01% NaN ₃ , 0.1% seroalbúmina bovina Temperatura: 25°C Medición de actividad residual	965-1200 AT-U	NR	Mao <i>et al.</i> , 1987
Ligninas sulfatadas	H-D-Hexahidrotirosol-Ala-Arg-pNA-diacetato (Spectrozyme-TH)	[Spectrozyme-TH]: 2 mM [Trombina]: 960 nM Buffer: Tris-HCl 20 mM pH=7.4, 0.10 M de NaCl, 2.5 mM de CaCl ₂ y 0.1% PEG 8000 Temperatura: Ambiente Medición de actividad residual	0.97-319 IC ₅₀ (μ g/mL)	13.4-21.4	Liang <i>et al.</i> , 2012

% DER: Desviación estándar relativa. AT-U: Unidades de antitrombina. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina. NR: No reportado.

Tabla 1. Investigaciones donde se utilizó a los sustratos cromogénicos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Agente cromogénico utilizado	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Polisacárido polifenólico de <i>Sanguisorba officinalis</i> L	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238)	[S2238]: 1.52 mM [Trombina]: 1.88 U·mL ⁻¹ [Antitrombina]: 7.5 U·mL ⁻¹ [HCII]: 0.198 mg·mL ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=8.4, 0.175 M de NaCl, 0.02% de NaN ₃ , 7.5 mM de EDTA y 0.1% PEG 400 Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	23-55 IC ₅₀ (µg/mL)	8.7-9.1	Pawlaczyk-Graja <i>et al.</i> , 2016
Derivados sulfatados de galactomanano extraídos de <i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238)	[S2238]: NR [Trombina]: 2 U·mL ⁻¹ [Antitrombina]: 1 U·mg ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4, 0.175 M de NaCl y 7.5 mM de EDTA. Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	65-87 AT-U/mg	2.53-9.21	Mestechkina <i>et al.</i> , 2008

% DER: Desviación estándar relativa. AT-U: Unidades de antitrombina. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina. HCII: Cofactor II de heparina. NR: No reportado.

Tabla 1. Investigaciones donde se utilizó a los sustratos cromogénicos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Agente cromogénico utilizado	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Galactanos y fucanos sulfatados de diferentes especies marinas	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238)	[S2238]: 100 µM [Trombina]: 15 nM [Antitrombina]: 50 nM [HCII]: 68 nM Buffer: Tris-HCl 20 mM pH=7.4, 0.15 M de NaCl y 0.1% de PEG Temperatura: Ambiente Medición de actividad residual	0.03-6 IC ₅₀ (µg/mL)	1.5-33.3	Melo <i>et al.</i> , 2004
Compuesto anti-inflamatorio extraído de regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S2238)	[S2238]: 200 µM [Trombina]: 2 nM [Antitrombina]: 10 nM [HCII]: 50 nM Buffer: Tris-HCl 20 mM pH=7.5 y 0.15 M de NaCl Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	2-20 (%)	2.6-6.8	Mendes-Silva <i>et al.</i> , 2003

% DER: Desviación estándar relativa. AT-U: Unidades de antitrombina. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina. HCII: Cofactor II de heparina. NR: No reportado.

Tabla 1. Investigaciones donde se utilizó a los sustratos cromogénicos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Agente cromogénico utilizado	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Savignina obtenida de glándulas de <i>Ornithodoros savignyi</i>	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym-TH)	[Chromozym-TH]: 250 μ M [Trombina]: 180 pM Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=8.3 con 0.227 M de NaCl Temperatura: Ambiente Medición de actividad residual	4.1 pM 22.3 nM (K_i)	2.6-4.6	Nienaber <i>et al.</i> , 1999
Serpinas derivadas de <i>Pichia pastoris</i>	Sarcosin-Pro-Arg-pNA	[Sarcosin-Pro-Arg-pNA]: 0.5 mM [Trombina]: 675 nM Buffer: NR Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	9.3×10^4 $M^{-1}s^{-1}$ (k_a)	5.4	Xu <i>et al.</i> , 2016
Derivados benzimidazólicos sintetizados químicamente	Acetato de Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	[Acetato de Tos-Gly-Pro-Arg-pNA]: NR [Trombina]: μ g/mL Buffer: NR Temperatura: 37°C Medición de actividad residual	1440-1925 IC_{50} (nM)	5.2-13.9	Chen <i>et al.</i> , 2017

% DER: Desviación estándar relativa. AT-U: Unidades de antitrombina. IC_{50} : Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina. K_i : constante de inhibición. K_a : Constante de afinidad NR: No reportado.

2.4.1.2 Métodos turbidimétricos en el análisis de inhibición de trombina

La turbidimetría es una técnica analítica utilizada desde inicios del siglo XX, su auge se dio a partir del descubrimiento del efecto Tyndall que presentaban algunas macromoléculas como proteínas y carbohidratos al ser dispersadas en un medio líquido, formando suspensiones coloidales. En el campo de la bioquímica, esta técnica comenzó a cobrar gran interés al ser estudiado el proceso de formación de coágulos en plasma sanguíneo en el año de 1931, posteriormente en 1951 se demostró el incremento en la dispersión y absorción de la luz por parte de la fibrina con el aumento del tiempo de reacción (Roth, 1966; Rosenfeld, 2012).

Desde sus inicios, esta técnica ha sido la de mayor relevancia para hacer el seguimiento de formación de polímeros de fibrina, fundamentada en la capacidad que tiene esta unidad proteica para generar un cambio en la absorción de luz al llevarse a cabo su formación. La principal ventaja de esta metodología radica en su facilidad operacional, haciéndola una técnica fácil y rápida, además de que permite el análisis de inhibidores directos bivalentes al utilizar fibrinógeno como sustrato de la trombina (Carr Jr y Hermans, 1977; Zavyalova *et al.*, 2012).

Sin embargo, la principal desventaja de este tipo de metodología es la diversidad de factores que pueden influenciar la formación de geles de fibrina como es el pH, la fuerza iónica y la temperatura, que inciden principalmente en la transparencia u opacidad del polímero formado. Aunado a esto, el método tiene un gran número de interferencias cuando es utilizado plasma sanguíneo en lugar de fibrinógeno aislado para realizar el proceso de conversión fibrinógeno-fibrina, además de presentar en algunas ocasiones poca sensibilidad al cambio de absorbancia entre los controles positivos y los sistemas a evaluar (Müller *et al.*, 1981; Rosenfeld, 2012).

Algunas de las investigaciones realizadas siguiendo este tipo de metodología son presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Investigaciones donde se emplearon métodos turbidimétricos para determinar la capacidad anticoagulante.

Molécula	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Wulfasa (enzima fibrinolítica) aislada de <i>Sparassis crispa</i>	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 20 mM pH= 7.4 con 5 mM de CaCl_2 Tiempo de reacción: 1 h Temperatura: 37°C $\lambda = 405 \text{ nm}$	17-62 (%)	7.9-8.4	Choi <i>et al.</i> , 2016
Variante genética de estafiloquinasa	[Fibrinógeno]: 14. 7 μM [Trombina]: 8 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: HEPES 20 mM pH = 7.4 con 150 mM de NaCl y 0.1% de PEG 8000 Tiempo de reacción: NR Temperatura: NR $\lambda = 405 \text{ nm}$	58-95 (%)	2.1-3.4	Wang <i>et al.</i> , 2009
Galactanos sulfatados de algas verdes Bryopsidales	Plasma citrado sin plaquetas [Trombina]: 0. 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tiempo de reacción: NR Temperatura: NR $\lambda = 405 \text{ nm}$	28 (%)	<2.2	Arata <i>et al.</i> , 2015

% DER: Desviación estándar relativa. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina. NR: No reportado

Tabla 2. Investigaciones donde se emplearon métodos turbidimétricos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Compuestos antioxidantes de <i>Oenanthe javanica</i> (isoramnetina-3-O-gaactósido y isoramnetina-3-O-hiperósido)	Plasma normal de humano citrado [Trombina]: 0.5 U·mL ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4 con 0.9% de NaCl Tiempo de reacción: 20 min Temperatura: Ambiente λ= 360 nm	0-55 (%)	2-10	Ku <i>et al.</i> , 2013
Oroxilina A aislado de <i>Scutellaria baicalensis</i>	Plasma de ratón rico en plaquetas [Trombina]: 0.5 U·mL ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4 con 0.9% de NaCl Tiempo de reacción: 20 min Temperatura: Ambiente λ= 360 nm	0-50 (%)	2.5-10	Ku <i>et al.</i> , 2014
Péptidos provenientes de amaranto liberados mediante digestión gastrointestinal in vitro	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 12 U·mL ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH= 7.2 con 0.12 mM de NaCl Tiempo de reacción: 10 min Temperatura: 37°C λ= 405 nm	0.07-0.23 IC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)	8.7-14.3	Sabbione <i>et al.</i> , 2016

% DER: Desviación estándar relativa. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina.

Tabla 2. Investigaciones donde se emplearon métodos turbidimétricos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Péptidos provenientes de amaranto liberados mediante hidrólisis con alcalasa y tripsina	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH= 7.2 con 0.12 mM de NaCl Tiempo de reacción: 10 min Temperatura: 37°C λ = 405 nm	0.74-10.87 IC ₅₀ (mg/mL)	0.01-9.2	Sabbione <i>et al.</i> , 2015
Flavonoides C-glicosilados (Orientina e isorientina) aislados de <i>Vaccinium bracteatum</i>	Plasma sanguíneo [Trombina]: 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4 con 0.9% de NaCl Tiempo de reacción: 20 min Temperatura: Ambiente λ = 360 nm	25-55 (%)	16.66-17.33	Lee y Bae 2015
Pelargonidina y Pelargonidina-3-glucósido	Plasma humano citrado [Trombina]: 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4 con 0.9% de NaCl Tiempo de reacción: 20 min Temperatura: Ambiente λ = 360 nm	6-55 (%)	6-8.88	Ku <i>et al.</i> , 2016

% DER: Desviación estándar relativa. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina.

Tabla 2. Investigaciones donde se emplearon métodos turbidimétricos para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Condiciones de análisis	Inhibición de trombina	% DER	Referencia
Hidrolizados proteicos de cacahuete	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH= 7.2 con 0.12 mM de NaCl Tiempo de reacción: 10 min Temperatura: 37°C λ = 405 nm	42.5-95 (%)	2.6- 11.8	Zhang, 2016
Péptidos de canola	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH= 7.2 con 0.12 mM de NaCl Tiempo de reacción: 10 min Temperatura: 37°C λ = 405 nm	45-95 (%)	5.6-6.7	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Péptidos derivados de la fermentación láctica con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y <i>Streptococcus thermophilus</i>	[Fibrinógeno]: 2.9 μM [Trombina]: 12 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 50 mM pH= 7.2 con 0.12 mM de NaCl Tiempo de reacción: 10 min Temperatura: 37°C λ = 405 nm	0-80 (%)	5-50	Rojas- Ronquillo <i>et al.</i> , 2012

% DER: Desviación estándar relativa. IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir al 50% la actividad de la trombina.

2.4.2 Análisis clínicos para la determinación del potencial anticoagulante

El análisis del proceso de coagulación, así como de sus posibles deficiencias, es realizado rutinariamente mediante ensayos clínicos, los cuales simulan las reacciones llevadas a cabo durante el proceso hemostático, permitiendo determinar alteraciones en alguna de las etapas de dicho proceso. Su utilización en el área de la bioquímica para la determinación del potencial anticoagulante de diversos compuestos es bastante común, ya que es posible determinar la etapa del proceso de coagulación donde intervendrá el compuesto durante su uso *in vivo* (Walker *et al.*, 1990; Barash, 2009).

Los ensayos clínicos utilizados para el análisis de la capacidad antitrombótica miden el tiempo en el que es activado algún factor pro-coagulante para la formación de fibrina en diferentes puntos del proceso de coagulación. Estos ensayos pueden ser llevados a cabo de dos formas distintas: la primera de ellas consiste en simular de forma *in vitro* las reacciones enzimáticas que ocurren en un proceso de coagulación *in vivo*, mientras que la segunda está enfocada en una determinación *ex vivo* del poder anticoagulante a través del análisis de sangre extraída de animales de laboratorio a los que se les proporciona una dosis del compuesto de interés a diferentes tiempos de exposición (Walker *et al.*, 1990; Barash, 2009).

Existen tres ensayos principales que determinan el sitio de acción del compuesto anticoagulante denominados tiempo de activación parcial de tromboplastina (APTT), tiempo de protrombina (PT) y tiempo de trombina (TT). El APTT está enfocado en determinar la capacidad inhibitoria durante la iniciación de la vía intrínseca del proceso de coagulación, a su vez el PT evalúa el tiempo necesario para la generación de fibrina una vez activado el factor VII evaluando la funcionalidad del compuesto con capacidad anticoagulante durante la vía extrínseca y común de la coagulación; en el caso del TT está enfocado en el punto final del proceso hemostático midiendo el tiempo en el que es convertido el fibrinógeno en fibrina en presencia de trombina (Walker *et al.*, 1990; Barash, 2009).

2.4.2.1 Ensayo de tiempo de trombina (TT) para la determinación del potencial inhibitorio de trombina

La determinación del tiempo en que se genera fibrina a partir de la conversión de fibrinógeno por acción de la trombina ha sido una metodología complementaria en el

análisis de moléculas con capacidad anticoagulante, especialmente cuando son utilizados los ensayos clínicos para determinar este potencial.

En la mayoría de las investigaciones se opta por utilizar algún método espectrofotométrico en lugar de esta metodología, debido a que sólo se obtienen datos del tiempo que se prolonga la formación de fibrina tomando como referencia los tiempos normales de conversión, lo que imposibilita en ocasiones, determinar de forma cuantitativa el radio de inhibición de trombina. Aunado a esto, el uso de equipos mecánicos como los coagulómetros es de vital importancia para aumentar la precisión. A pesar de estas desventajas, la técnica es fácil de operar y ofrece un resultado rápido sobre el potencial anticoagulante de los analitos de interés.

En la Tabla 3 se presentan algunas investigaciones en donde se ha hecho uso de esta metodología para la determinación del potencial anticoagulante de algunos compuestos.

Tabla 3. Investigaciones donde se empleó el método de tiempo de trombina (TT) para determinar la capacidad anticoagulante.

Molécula	Condiciones de análisis de actividad anticoagulante	Tiempo prolongado de conversión (veces)	% DER	Referencia
Proteínas de harina de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	Plasma citrado de rata [Trombina]: 2.3 U·mL ⁻¹ Tiempo de reacción: 2 min Temperatura: 37°C	1.17	4.5-5.0	Sabbione <i>et al.</i> , 2016
Polifenoles provenientes de la fermentación con <i>Lachnum singerianum</i>	Condiciones proporcionadas por el fabricante en el kit de análisis	1.38-3.03	3.2-6.1	Zong <i>et al.</i> , 2016
Sulfatos de condroitina fucosilados	Plasma citrado de rata Condiciones proporcionadas por el fabricante en el kit de análisis	0-1.87	4.65-8.70	Liu <i>et al.</i> , 2016
Galactanos sulfatados de algas verdes Bryopsidales	Plasma citrado de rata Condiciones proporcionadas por el fabricante en el kit de análisis	705	9.0	Arata <i>et al.</i> , 2015
Hidrolizados proteicos de músculo de <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Plasma citrado [Trombina]: 800 U/mL Tiempo de reacción: 3 min Temperatura: 37°C	0-2.50	2.9-6.67	Nasri <i>et al.</i> , 2012

% DER: Desviación estándar relativa

Tabla 3. Investigaciones donde se empleó el método de tiempo de trombina (TT) para determinar la capacidad anticoagulante (*continuación*).

Molécula	Condiciones de análisis de actividad anticoagulante	Tiempo prolongado de conversión (veces)	% DER	Referencia
Péptidos provenientes de amaranto liberados mediante hidrólisis con alcalasa y tripsina	Plasma humano [Trombina]: 2.3 U·mL ⁻¹ Tiempo de reacción: 2 min Temperatura: 37°C	0-4.15	1.77-10.5	Sabbione <i>et al.</i> , 2015
Exopolisacárido derivado del crecimiento de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	Plasma humano Condiciones proporcionadas por el fabricante en el kit de análisis	0-46.6	0.4-3.9	Ferreira-Mendes <i>et al.</i> , 2009
Extractos de la fermentación de un hongo endofítico	[Fibrinógeno]: 14.7 μM [Trombina]: 5 U·mL ⁻¹ Buffer: Tris-HCl 20 mM pH=7.4 Tiempo de reacción: 3 min Temperatura: 37°C	12.4	2.21-20.59	Wu <i>et al.</i> , 2009
Fosfolipasa de veneno de <i>Daboia russelii</i>	[Fibrinógeno]: 7.5 μM [Trombina]: 5 nM Tiempo de reacción: Formación de coágulo Temperatura: Ambiente	1.06-2.27	4.02-6.15	Mukherjee, 2014

% DER: Desviación estándar relativa

2.4.3 Métodos cromatográficos y electroquímicos como una alternativa en la determinación del poder inhibitorio de trombina

El uso tanto de las técnicas electroquímicas como cromatográficas para el seguimiento de la actividad de trombina se remonta al final de la década de los 80's y principios de los 90's. A pesar de ello, en los últimos años han existido diferentes modificaciones para el mejoramiento de ambas metodologías, principalmente en parámetros analíticos como reproducibilidad, precisión y límites de detección, además de ofrecer ventajas operacionales y de costo.

2.4.3.1 Métodos electroquímicos para la determinación de la actividad de la trombina

En el caso de las técnicas electroquímicas, su uso comenzó en 1980 cuando fue sintetizado un polipéptido formado por la unión de fenilalanina, ácido pipecólico y arginina con p-aminodifenilamida conocido como H-D-Phe-Pip-Arg-pADA o S2497. La p-aminodifenilamida (pADA) actúa como un grupo electroquímico funcional, generando una señal voltamperométrica al aplicar diferentes potenciales eléctricos (De Peuriot *et al.*, 1980; Izquierdo y Burguillo, 1989).

En el estudio llevado a cabo por De Peuriot *et al* (1980) se probó la alta sensibilidad del método, ya que la actividad de la trombina podía ser determinada con precisión a una concentración de trombina de $0.01 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ equivalente a 86.63 pM. Un estudio más reciente reportado por Ji *et al* (2012) utilizó al H-D-Phe-Pip-Arg-pADA como grupo electroquímico para determinar la actividad de la trombina en presencia y ausencia de argatroban, un inhibidor directo de la misma. La determinación consistió en la inmovilización de este sustrato electrogénico sobre un electrodo de trabajo de oro durante una voltamperometría diferencial de pulsos, obteniendo una desviación estándar relativa de 4.9% al utilizar una concentración de trombina de 5 fM.

A pesar de alcanzar una alta sensibilidad, el inconveniente del uso de H-D-Phe-Pip-Arg-pADA como sustrato electrogénico de la trombina es el mismo que se presenta al utilizar un sustrato cromogénico, la determinación no proporciona la actividad biológica real de la trombina, debido a que este tipo de sustratos están diseñados para interactuar únicamente con el centro catalítico de la misma y como consecuencia, su aplicación en la determinación de la capacidad anticoagulante se limita a compuestos que actúen como inhibidores directos de la trombina (Izquierdo y Burguillo, 1989).

Una alternativa al uso de H-D-Phe-Pip-Arg-pADA, es la reportada por Ko *et al.* (2015), donde se plantea el recubrimiento de un electrodo de óxido de indio/estaño (ITO) con fibrinógeno covalentemente unido a ferroceno, molécula capaz de generar una señal electroquímica. Al recubrir el ITO con fibrinógeno funcionalizado se obtiene una señal analítica de menor intensidad al aplicar una voltamperometría diferencial de pulsos, debido a la baja concentración de ferroceno presente en la superficie del electrodo; en contraste, al adicionar trombina se produce un incremento en la señal analítica, ya que el fibrinógeno funcionalizado es convertido en fibrina funcionalizada, aumentando la cantidad de ferroceno disponible en la superficie del electrodo.

Esta nueva metodología presentó un intervalo lineal para la detección de trombina de 0.1-1000 ng/mL con un límite de detección de 2.7 pM y se propuso como una herramienta con alto potencial para determinar la actividad de la trombina. No obstante, se debe considerar que no se ha estudiado el funcionamiento en presencia de algún inhibidor enzimático ni se han realizado estudios de la posible afectación en la actividad de esta enzima al utilizar un sustrato funcionalizado.

2.4.3.2 Cromatografía para la determinación de la capacidad inhibitoria de la trombina

El proceso de inhibición de la trombina es estudiado a partir de dos enfoques distintos: el primero está orientado a la capacidad que tienen diversos compuestos para bloquear el sitio activo de la trombina, disminuyendo la actividad catalítica sobre el fibrinógeno, siendo los métodos cromogénicos y electroquímicos una alternativa de uso para la determinación de este potencial (Izquierdo y Burguillo, 1989; Zavyalova *et al.*, 2012). En contraste el segundo enfoque está orientado a medir el potencial inhibitorio de moléculas que se enlazan al exosito I de la trombina como es el caso de los aptámeros. Así mismo, este enfoque estudia la posibilidad de inhibición bivalente que presentan algunos compuestos, capaces de unirse tanto al exosito I como al centro activo de la trombina. Este potencial de inhibición solamente es posible determinarlo mediante el uso de la cromatografía, debido a que es necesario determinar la velocidad de liberación de fibrinopéptidos durante el proceso hidrolítico de la trombina para establecer el tipo de inhibición que se está llevando a cabo (Izquierdo y Burguillo, 1989; Zavyalova *et al.*, 2012).

El estudio acerca de la velocidad de liberación de fibrinopéptidos durante el proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina ha sido realizado desde hace varios años

mediante técnicas de cromatografía de fase reversa (RP-HPLC), siendo utilizados columnas de octadecilo (C18) y gradientes de polaridad generados a partir de la mezcla de soluciones reguladoras de pH y solventes orgánicos como acetonitrilo o metanol. Ejemplo de esto es lo reportado por Dang *et al* (1995), quien determinó las constantes cinéticas de liberación de fibrinopéptidos bajo condiciones de alosterismo de la trombina a través del uso de esta técnica.

En la Tabla 4 se describen algunas de las investigaciones que han hecho uso de la RP-HPLC para el seguimiento de la liberación de fibrinopéptidos.

Tabla 4. Investigaciones donde se ha empleado la RP-HPLC para realizar el seguimiento de fibrinopéptidos.

Tipo de estudio	Condiciones de análisis	Condiciones cromatográficas	[Fibrinopéptidos]	Referencia
Determinación de constantes cinéticas de liberación de fibrinopéptidos	[Fibrinógeno]: 0.2 μ M [Trombina]: 0.2 nM Buffer: Tris-HCl 5 mM pH=8.0 con 200 mM de NaCl y 0.1% de PEG Tiempo de reacción: 60 min Temperatura: 25°C	Columna: C18 Fase móvil A: 80 mM de fosfatos pH= 3.1 Fase móvil B: CH ₃ CN (100%) Flujo. 1 mL·min ⁻¹ Gradiente: 0-15 min (17% de B), 15-25 min (40% de B) λ = 205 nm	FpA: 0.40 μ M FpB: 0.36 μ M	Dang <i>et al.</i> , 1995
Liberación de fibrinopéptidos en fibrinógeno normal y recombinante	[Fibrinógeno]: 0.4 μ M [Trombina]: 0.043 U/mL Buffer: Tris-HCl 50 mM pH=7.4 con 150 mM de NaCl Tiempo de reacción: 30 min Temperatura: Ambiente	Columna: C18 Fase móvil A: 80 mM de fosfatos pH= 3.1 Fase móvil B: CH ₃ CN (100%) Flujo. 1 mL·min ⁻¹ Gradiente: 0-15 min (17% de B), 15-25 min (40% de B) λ = 205 nm	Liberación FpA (%): 100 Liberación FpB (%): 80	Lord <i>et al.</i> , 1996

Tabla 4. Investigaciones donde se ha empleado la RP-HPLC para realizar el seguimiento de fibrinopéptidos (*continuación*).

Tipo de estudio	Condiciones de análisis	Condiciones cromatográficas	[Fibrinopéptidos]	Referencia
Separación de fibrinopéptidos	[Fibrinógeno]: 21.47 μM [Trombina]: 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Tris-HCl 20 mM pH=7.2 con 150 mM de NaCl Tiempo de reacción: 3 h Temperatura: 37°C	Columna: C18 Fase móvil: 0.1% TFA, CH ₃ CN (22%), pH= 2.1 Flujo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Isocrático: 10 min $\lambda= 210 \text{ nm}$	2 mol de fibrinopéptido/ mol de fibrinógeno	Ebert y Bell, 1985
Estudio de una serinproteasa similar a la trombina	[Fibrinógeno]: 8.82 μM [Trombina]: 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Fosfatos 100 mM pH=7.2 con 100 mM de NaCl Tiempo de reacción: 8 h Temperatura: 23°C	Columna: C18 Fase móvil A: TFA (0.1%) Fase móvil B: CH ₃ CN (80%) con 0.1% de TFA Flujo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Gradiente: 0-6 min (0% de B), 6-55 min (100% de B), 55-60 min (100% de B), 55-60 min (0% B), 60-65 min (0% de B) $\lambda= 210 \text{ nm}$	FpA: 2.5 nmol FpB: 1.8 nmol	Mukherjee y Mackessy, 2013

Tabla 4. Investigaciones donde se ha empleado la RP-HPLC para realizar el seguimiento de fibrinopéptidos (*continuación*).

Tipo de estudio	Condiciones de análisis	Condiciones cromatográficas	[Fibrinopéptidos]	Referencia
Purificación de fibrinopéptidos humanos	[Fibrinógeno]: 29.41 μM [Trombina]: 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Buffer: Fosfatos 50 mM pH=7.4 con 100 mM de NaCl Tiempo de reacción: 12 h Temperatura: 37°C	Columna: C18 Fase móvil A: H_3PO_4 (0.1%) pH=2.1 Fase móvil B: H_3PO_4 (0.1%) pH=2.1 con CH_3CN (50%) Flujo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Gradiente: 0-35 min (35% de B) $\lambda = 220 \text{ nm}$	NR	Koehn y Canfield, 1981

NR: No reportado

Tabla 4. Investigaciones donde se ha empleado la RP-HPLC para realizar el seguimiento de fibrinopéptidos (*continuación*).

Tipo de estudio	Condiciones de análisis	Condiciones cromatográficas	[Fibrinopéptidos]	Referencia
Fosfolipasa de veneno de <i>Daboia russelii</i>	[Fibrinógeno]: 7.5 μ M [Trombina]: 5 nM Buffer: NR Tiempo de reacción: 30 min Temperatura: Ambiente	Columna: C18 Fase móvil A: TFA (0.1%) Fase móvil B: CH ₃ CN (80%) con 0.1% de TFA Flujo: 1 mL·min ⁻¹ Gradiente: 0- 6 min (5% de B), 6-10 min (48% de B), 10-40 min (60% de B), 40-44 min (100% de B), 44-47 min (100% de B), 47-50 min (5% de B) y 50-55 min (5% de B) λ = 280 nm	NR	Mukherjee , 2014

NR: No reportado

2.4.3.2.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC) como una herramienta potencial para la determinación de la capacidad inhibitoria de trombina

La SEC-HPLC ha sido una técnica ampliamente utilizada desde su descubrimiento en 1953, en especial para la determinación cualitativa y cuantitativa de moléculas de alto peso molecular como proteínas, carbohidratos, anticuerpos monoclonales y agregados diméricos o triméricos formados reversible e irreversiblemente (Hong *et al.*, 2012; Bouvier y Koza, 2014).

El fundamento de la técnica cromatográfica está basado en la elución de los analitos de interés primordialmente por su tamaño o de manera más específica por el radio de Stokes que presentan, eluyendo primero los de mayor tamaño y al final los analitos que presentan las dimensiones menores. Si bien, la mayoría de las veces el comportamiento de elución es proporcional al tamaño, en ocasiones la forma que pueda presentar la biomolécula (globular, bastón o flexible) puede influenciar en el orden de elución (Hong *et al.*, 2012; Bouvier y Koza, 2014).

La aplicación de la SEC-HPLC en el campo de la farmacéutica, bioquímica e industria de fabricación de compuestos bio-terapéuticos es de vital importancia, ya que permite conocer el comportamiento estructural que tendrá algún compuesto bajo diferentes factores fisicoquímicos como temperatura, pH, concentración de sales o concentración de solventes orgánicos. Dichos factores influyen primordialmente en la estabilidad estructural que un compuesto bio-terapéutico pueda presentar durante su proceso de producción, determinando posibles desnaturalizaciones o reordenamientos estructurales (Bouvier y Koza, 2014; Fekete *et al.*, 2014).

Esta técnica analítica ha sido empleada como análisis rutinario de calidad debido a su alta sensibilidad, reproducibilidad y su alto rendimiento en el uso de muestra, así como la posibilidad de proporcionar información sobre masa molar y algunas características estructurales, las cuales pueden ser complementadas mediante su acoplamiento a otras técnicas de análisis como la velocidad de sedimentación o dispersión dinámica de la luz (Bouvier y Koza, 2014; Fekete *et al.*, 2014).

Dentro de la instrumentación necesaria para el desarrollo de esta técnica se encuentran el uso de columnas con fases estacionarias elaboradas principalmente de silica para el análisis de proteínas, mientras que el estireno reticulado es utilizado para el análisis de polímeros. Algunos de los principales inconvenientes es el uso fases

móviles acuosas a condiciones fisiológicas de pH y concentración de sales para obtener las formas nativas de los compuestos de interés, además de minimizar posibles interacciones con la fase estacionaria (Hong *et al.*, 2012; Bouvier y Koza, 2014; Fekete *et al.*, 2014).

En el caso de los detectores acoplados a la SEC-HPLC se encuentran el uso extendido de los detectores UV a longitudes de onda cortas (210-220 nm), ya que en esta región se presenta una mayor sensibilidad por la presencia del enlace amida presente en las proteínas, así también regiones entre 257 y 280 nm donde es posible determinar la presencia de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. En ocasiones es útil la incorporación de detectores de fluorescencia, ya que aumentan la sensibilidad y selectividad de los métodos desarrollados (Hong *et al.*, 2012; Bouvier y Koza, 2014; Fekete *et al.*, 2014).

Actualmente no se han elaborado estudios acerca de la determinación del potencial inhibitorio de algún compuesto de interés haciendo uso de la SEC-HPLC, ya sea mediante el seguimiento de la desaparición del fibrinógeno en función de la actividad de esta enzima o mediante la aparición de fibrinopéptidos como en los estudios realizados bajo RP-HPLC.



JUSTIFICACIÓN

Ante el creciente desarrollo de nuevos compuestos antitrombóticos, en especial, aquellos con características anticoagulantes, es de vital importancia contar con una metodología analítica capaz de determinar esta capacidad biológica con precisión, a fin de obtener un resultado *in vitro* lo más cercano y representativo posible al comportamiento que tendrá el compuesto de interés en un sistema *in vivo*.

Las técnicas utilizadas actualmente para determinar el potencial anticoagulante de diferentes moléculas están basadas en la interacción que mantienen éstas con el centro catalítico o exosito I y II de la trombina, determinándose el porcentaje de inhibición de esta enzima mediante métodos espectrofotométricos, turbidimétricos, clínicos, electroquímicos o cromatográficos. Sin embargo, a pesar de contar con una amplia variedad de opciones para llevar a cabo este análisis, no existe una metodología capaz de medir esta actividad biológica sin presentar interferencias en la región de lectura, que sea precisa al determinar el porcentaje de inhibición o que tenga una buena sensibilidad; obligando a aplicar más de una técnica de análisis para obtener resultados satisfactorios.

Una alternativa en la medición del potencial anticoagulante que no ha sido explorada es el seguimiento de la conversión de fibrinógeno en fibrina aplicando la cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC), técnica utilizada ampliamente para el análisis de proteínas por su sensibilidad, reproducibilidad y fácil operación. Además, esta técnica permite encontrar cambios conformacionales por agregación o desnaturalización proteica que repercuten directamente en el proceso de separación, permitiendo entender de una manera más clara las interacciones presentes durante el proceso de inhibición de trombina.

En el presente trabajo de investigación se realiza el estudio de este proceso de transformación con la finalidad de comprobar el potencial de la SEC-HPLC para ser utilizada como una nueva metodología en la determinación de la capacidad anticoagulante. Se espera establecer las ventajas que ofrece esta metodología sobre los métodos normalmente aplicados, con la finalidad de que pueda ser utilizada sin la necesidad de aplicar alguna técnica auxiliar, como hasta el momento se requiere para estos análisis.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC) puede ser utilizada para la determinación de la capacidad anticoagulante de diversos compuestos, mediante la detección y cuantificación de fibrinopéptidos o fibrinógeno residual presente en distintos sistemas catalizados por trombina. Así también es capaz de ofrecer una mayor sensibilidad, una mayor precisión en el cálculo del porcentaje de inhibición de trombina, presentar un menor número de interferencias y proporcionar una mejor visión del proceso molecular de inhibición con respecto a las técnicas aplicadas actualmente.

4.2 Objetivo General

Evaluar la aplicación de la SEC-HPLC en la determinación de la capacidad inhibitoria de trombina, mediante el seguimiento de la conversión de fibrinógeno en fibrina en múltiples sistemas de reacción enzimática, para proponer así una metodología más robusta comparada a las utilizadas actualmente.

4.3 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar el perfil cromatográfico de los sistemas de reacción actividad enzimática cero, actividad total enzimática y actividad enzimática inhibida por heparina mediante su separación en SEC-HPLC para identificar cambios producidos durante el transcurso de reacción.
- ❖ Identificar las interferencias que impiden la medición del potencial anticoagulante a través de la comparación entre los perfiles cromatográficos de soluciones estándar y los obtenidos en los sistemas de reacción enzimática.
- ❖ Cuantificar la actividad inhibitoria que ofrece la heparina haciendo uso de la SEC-HPLC para definir las ventajas que brinda esta técnica en comparación a las utilizadas actualmente.



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina

5.1.1 Sistemas de reacción analizados mediante SEC-HPLC

Se prepararon tres diferentes sistemas de reacción tomando en cuenta lo reportado previamente por Lord *et al.* (1996), Zhang *et al.* (2008) y Ebert y Bell (1985) con algunas modificaciones.

- ❖ El sistema denominado *actividad enzimática cero* (A_0), el cual estuvo conformado por 30 μL de buffer soporte Tris-HCl 50 mM pH=7.2 y 150 mM de NaCl junto con 70 μL de una solución madre de fibrinógeno a $7.143 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en buffer soporte.
- ❖ El sistema denominado *actividad total enzimática* (A_{100}) que correspondió a la adición de 10 μL de buffer soporte, 20 μL de una solución madre de trombina igualmente disuelta en buffer soporte con una concentración de $50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 70 μL de la solución madre de fibrinógeno.
- ❖ El sistema denominado *actividad enzimática inhibida por heparina* (A_H) el cual estuvo compuesto por 10 μL de solución madre de heparina a $600 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelta en buffer soporte, 20 μL de la solución madre de trombina y 70 μL de la solución madre de fibrinógeno.

Cada sistema fue elaborado por duplicado alcanzando concentraciones finales de $5.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($14.70 \mu\text{M}$) para el fibrinógeno, $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ (91.3 nM) para la trombina y $60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para la heparina.

5.1.2 Condiciones de incubación y pre-tratamiento de los sistemas de reacción previo a su análisis en SEC-HPLC

Los tres distintos sistemas de reacción (A_0 , A_{100} y A_H) fueron mantenidos en un baño en seco Barnstead Thermolyne a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4.5 h, ya que en este tiempo se observó la formación del gel de fibrina en el sistema A_{100} sin presencia de líquido residual. Posteriormente, de acuerdo al estudio, a cada sistema se le adicionaron diferentes concentraciones de agentes solubilizantes de fibrina para luego centrifugarlos a 10,000 rpm por 10 min manteniendo una temperatura de 4°C . Transcurrido éste tiempo, el sobrenadante obtenido fue almacenado a temperatura ambiente hasta su inyección en el sistema cromatográfico.

5.2 Selección del agente solubilizante de fibrina

5.2.1 Determinación del mejor agente solubilizante de fibrina

Con el objetivo de determinar que compuesto presenta las mejores características de solubilización de fibrina sin interferir durante el análisis de la capacidad anticoagulante, así como para obtener un producto analizable por SEC-HPLC, se probaron los agentes solubilizantes de polímeros lineales de fibrina que se muestran a continuación.

- ❖ Ácido tricloroacético (TCA) al 7% (p/v) (adición de 10 μ L) de acuerdo a lo establecido por Beck *et al.* (1971) y Riedel *et al.* (2011).
- ❖ Ácido acético al 50% (v/v) al 50% tal como lo establece Zhou *et al.* (2010).
- ❖ Ácido fosfórico al 5% (v/v) (adición de 30 μ L) según lo reportado por Ebert y Bell (1985).
- ❖ NaBr a una concentración final de 10% (p/v) como lo ha reportado Ariëns (1972) y Maya y Thomas (2012).
- ❖ Urea a una concentración final de 30% (p/v) como lo ha reportado Ariëns (1972) y Maya y Thomas (2012).

5.2.2 Efecto de algunos agentes solubilizantes de fibrina en los sistemas de reacción

El efecto de la adición de TCA a los sistemas de reacción (A_0 y A_{100}), fue determinada durante la separación cromatográfica en SEC-HPLC bajo las condiciones que se mencionan posteriormente. Aunado a esto con la finalidad de determinar una posible ruptura del fibrinógeno a causa de la incorporación de TCA a los sistemas de reacción, se realizó un análisis teórico del acoplamiento molecular entre este ácido y el fibrinógeno. Para ello se obtuvo la estructura cristalina del fibrinógeno (3GHG) reportada en el banco de datos de proteínas (PDB), ésta fue procesada mediante la plataforma APBS Baker *et al.* (2001), obteniéndose la superficie electrostática molecular a las condiciones de pH utilizadas en los sistemas de reacción.

A su vez, se realizó el análisis de acoplamiento molecular (docking) entre el fibrinógeno y TCA, tanto para la estructura completa del fibrinógeno (3GHG) como para los dominios E (2a45) y D de éste (1FZA) mediante el uso del software ArgusLab versión 4.0.1 determinándose las energías de acoplamiento respectivas.

Para determinar el efecto de la adición de NaBr y urea como agentes solubilizantes de fibrina se procedió a preparar 1 mL de sistemas A₀ y A₁₀₀ por duplicado obteniendo concentraciones finales de fibrinógeno de 1mg·mL⁻¹ (2.94 μM) y de trombina de 2.5 U·mL⁻¹ (22.8 nM). Los sistemas fueron incubados a 37°C por 3 h y posteriormente se les añadieron a cada uno 100 mg de NaBr o 300 mg de urea.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a las mismas condiciones descritas con anterioridad y el sobrenadante fue analizado por espectroscopía UV-vis en un barrido de 190-800 nm usando un espectrofotómetro Genesys 10 UV-vis considerando como blanco buffer Tris-HCl 50 mM pH=7.2 en 150 mM de NaCl. Así mismo fue analizada una solución de fibrinógeno preparada a la misma concentración presente en los sistemas de reacción (1mg·mL⁻¹) sin adición de ningún agente solubilizante de fibrina.

Con el objetivo de apoyar los resultados experimentales se procedió a realizar un análisis teórico de la interacción molecular entre la urea y el fibrinógeno, utilizando las mismas condiciones descritas con anterioridad en el análisis de acoplamiento molecular (docking) entre el TCA y el fibrinógeno.

5.3 Separación cromatográfica de los productos de reacción mediante SEC-HPLC

5.3.1 Condiciones cromatográficas de análisis

Para la separación de los productos de la reacción enzimática de cada uno de los sistemas de reacción se utilizó una columna SRT-SEC-150 SEPAX Technologies, Inc (USA) (300 mm X 7.6 mm X 5 μm) con rango de exclusión de 0.5-150 kDa y que de acuerdo al fabricante es capaz de separar proteínas con un peso molecular de hasta 670 kDa. La separación se realizó mediante un método isocrático por 60 minutos a un flujo de 0.5 mL·min⁻¹, utilizando como fase móvil buffer de KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0.1 M a pH= 6.8. La detección de los analitos de interés se llevó a cabo a 220 nm.

El análisis correspondiente fue realizado en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Perkin Elmer Series 200 acoplado a sistema de detección UV-vis (190-380 nm) con sistema de inyección manual (20 μL).

5.3.2 Elaboración de una curva patrón de pesos moleculares

Se realizó la inyección de seis proteínas utilizadas como estándar de peso molecular bajo las condiciones cromatográficas mencionadas con anterioridad. El peso de cada una de éstas se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Pesos moleculares de las proteínas utilizadas como estándar.

Proteína	Peso Molecular (kDa)
Ureasa de <i>Canavalia ensiformis</i>	544.62
Seroalbúmina bovina	66.34
Ovoalbúmina	45.00
Lactoglobulina	18.40
Aprotinina	6.50
Glu ¹ - Fibrinopéptido B	1.57

5.3.3 Curva estándar de fibrinógeno

Se realizó una curva patrón de fibrinógeno por duplicado a cinco diferentes concentraciones, preparadas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH=7.2 y 150 mM de NaCl. Las concentraciones correspondieron a 1.0 mg·mL⁻¹ (2.94 μM), 3.0 mg·mL⁻¹ (8.82 μM), 5.0 mg·mL⁻¹ (14.70 μM), 7.0 mg·mL⁻¹ (20.59 μM) y 9.0 mg·mL⁻¹ (26.47 μM).

5.3.4 Cálculo del porcentaje de inhibición de trombina

Los cromatogramas obtenidos después de la separación mediante SEC-HPLC fueron procesados usando el software de análisis TC-NAV (Perkin Elmer) obteniendo el área bajo la curva de manera manual y calculando el porcentaje de inhibición de trombina mediante la ecuación 1, la cual fue adaptada de la propuesta por Yang *et al.* (2007)

$$\text{inhibición de trombina (\%)} = \left(1 - \frac{A_0 - A_H}{A_0 - A_{100}}\right) \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

donde:

A₀: Área bajo la curva del sistema *actividad enzimática cero*

A₁₀₀: Área bajo la curva del sistema *actividad total enzimática*

A_H: Área bajo la curva del sistema *actividad enzimática inhibida por heparina*



RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina

El proceso de conversión de fibrinógeno en fibrina por acción proteolítica de la trombina está gobernado por un cambio en la solubilidad del fibrinógeno, producido por la liberación de fibrinopéptidos presentes en el dominio E de éste, teniendo como consecuencia, la producción de un polímero lineal de fibrina, insoluble a pH neutro (Doolittle, 2003; La Corte *et al.*, 2011).

Este fenómeno fue comprobado durante el análisis de los tres diferentes sistemas enzimáticos de reacción (A_0 , A_{100} y A_H), donde se observó la formación de fibrina como un gel compactado en el sistema A_{100} bajo las condiciones experimentales propuestas. De acuerdo a lo reportado por Weisel (2005) y Janmey *et al.* (2009) este polímero tiene la capacidad de atrapar hasta el 99.75% de líquido que lo rodea durante su formación, por lo que no se encontró un volumen remanente del medio de reacción después de finalizar la transformación del fibrinógeno.

En el caso de los sistemas A_0 y A_H , no se apreció visualmente la formación de fibrina, ya que el sistema A_0 fungió como control negativo de la reacción enzimática al sólo contener fibrinógeno y buffer soporte dentro de su composición, mientras que en el caso del sistema A_H , la presencia de heparina inhibió esta formación a través de la interacción electrostática entre los grupos sulfato presentes en su estructura y los residuos de Lys y Arg cargados positivamente del exosítio II de la trombina (Carter *et al.*, 2005; Crawley *et al.*, 2007). Como consecuencia de esta interacción electrostática, se origina un complejo heparina-trombina que reduce la actividad de esta enzima sobre el fibrinógeno; adicionalmente, la heparina posee la capacidad de romper los enlaces hidrógeno que permiten la agregación de los monómeros de fibrina producidos durante el proceso de conversión, evitando así, su polimerización (Li *et al.* 2004; Gardenhire, 2015).

La producción del polímero lineal de fibrina llevada a cabo en el sistema A_{100} fue considerado como punto final de reacción según lo descrito por Ng *et al.* (1993), completando su formación en 4.5 h, tiempo significativamente menor al reportado en otras investigaciones similares como las realizadas por Koehn y Canfield (1981) y Mukherjee y Mackessy (2013), donde la reacción enzimática finalizó en 12 y 8 h respectivamente; y significativamente mayor a las reportadas por Ebert y Bell (1985),

Dang *et al.* (1995) y Mukherjee (2014), quienes presentaron un tiempo final de reacción de 3, 1 y 0.5 h respectivamente.

En el caso de los trabajos donde el tiempo de reacción fue mayor al encontrado en esta investigación, es debido a un fenómeno de saturación por parte de la trombina, generado por la alta concentración de fibrinógeno (29.41 μM) con respecto a la concentración de trombina utilizada (1-2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), provocando una disminución en la velocidad de reacción (Bettelheim *et al.*, 2010). En contraste, en las investigaciones donde el tiempo fue menor, la velocidad del proceso enzimático presenta la influencia de una menor concentración de fibrinógeno (7.5 μM) como en el caso de Mukherjee (2014), o una alta concentración de enzima (100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) como lo reportado por Ebert y Bell (1985), condiciones que disminuyen el tiempo en que se lleva a cabo la conversión.

Basado en lo anterior, se puede inferir que la concentración de enzima utilizada (10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) fue la que tuvo un mayor efecto sobre el tiempo de producción del gel de fibrina, puesto que altas concentraciones de enzima favorecen la velocidad de reacción (Bettelheim *et al.*, 2010).

6.2 Selección del agente solubilizante de fibrina

La acción enzimática de la trombina sobre el fibrinógeno produce la formación de polímeros lineales de fibrina insolubles a condiciones de pH neutro, lo que imposibilita su inclusión en un sistema cromatográfico de líquidos para llevar a cabo su separación. No obstante, estos polímeros lineales pueden ser dispersados a través de condiciones ácidas de pH o mediante el uso de agentes caotrópicos como el NaBr y urea (Ariëns, 1972; Maya y Thomas, 2012).

Aunado a la importancia que tiene la dispersión de fibrina para llevar a cabo la separación cromatográfica, la necesidad de liberar el medio acuoso atrapado en este hidrogel mediante un método químico se vuelve un factor crucial desde el punto de vista analítico, ya que su aplicación minimiza las pérdidas del analito de interés, en comparación a métodos mecánicos como el propuesto por Koehn y Canfield (1981), donde se recupera el medio de reacción mediante la compresión del gel formado sobre membranas de nylon, haciendo que los porcentajes de recuperación del analito oscilen entre el 80 y 87%, además de que, la reproducibilidad del método se ve comprometida.

Es por ello que se estudió la inclusión de TCA, ácido fosfórico y ácido acético en el sistema A₁₀₀, ya que este tipo de ácidos han sido utilizados como agentes dispersantes de fibrina en investigaciones similares, realizadas por Martinelli y Sheraga (1978), Ebert y Bell (1984) y Ng *et al.* (1993) para el análisis de fibrinopéptidos por RP-HPLC, debido a que cumplen con dos objetivos principales, propiciar la disolución del polímero de fibrina generado por la conversión catalítica del fibrinógeno mediante el descenso de pH, además de inactivar la reacción enzimática a través de la precipitación de la trombina, la cual ocurre a un pH menor a 5.0 (Machovic *et al.*, 1980).

Así también, se estudió la inclusión de NaBr y urea por su capacidad de dispersar la fibrina, además de reducir la actividad de trombina según lo reportado por Shulman *et al.* (1953) y Anfinson *et al.* (1957). De esta forma se podrá seleccionar al agente dispersante de fibrina más adecuado para el análisis en SEC-HPLC.

6.2.1 Dispersión de fibrina mediante descenso de pH

Además de Martinelli y Sheraga (1978), Beck *et al.* (1971) y Riedel *et al.* (2011) también han reportado el uso de TCA para dispersar fibrina en el seguimiento de fibrinopéptidos por RP-HPLC, ya que al utilizar concentraciones bajas del mismo es posible descender el pH de manera efectiva.

La adición de 10 μ L de este ácido propició la completa dispersión del polímero de fibrina con un descenso de pH hasta 1.48, mismo que asegura la inactivación de la reacción enzimática, ya que la trombina precipita a un pH menor a 5.0, según lo reportado por Machovic *et al.* (1980).

Los cromatogramas resultantes para la incorporación de TCA en los sistemas A₀ y A₁₀₀ (Figura 4), mostraron dos señales analíticas sin cambios significativos en ambos sistemas. La primera de ellas fue detectada a los 19.40 ± 0.05 min con una intensidad baja (11.55 mV), mientras que la segunda mostró una intensidad mayor (284.4 mV) y fue encontrada a los 26.27 ± 0.05 min.

Al realizar la inyección de una solución de TCA a la concentración final alcanzada en los sistemas de reacción, se obtuvo la señal en 26.27 ± 0.05 min, por lo que se asoció esta respuesta al TCA. Para corroborar esta suposición, también se obtuvo un espectro UV-vis (Figura 5) de una solución del ácido, la cual mostró fuerte absorción a la longitud de onda utilizada para la determinación (220 nm).

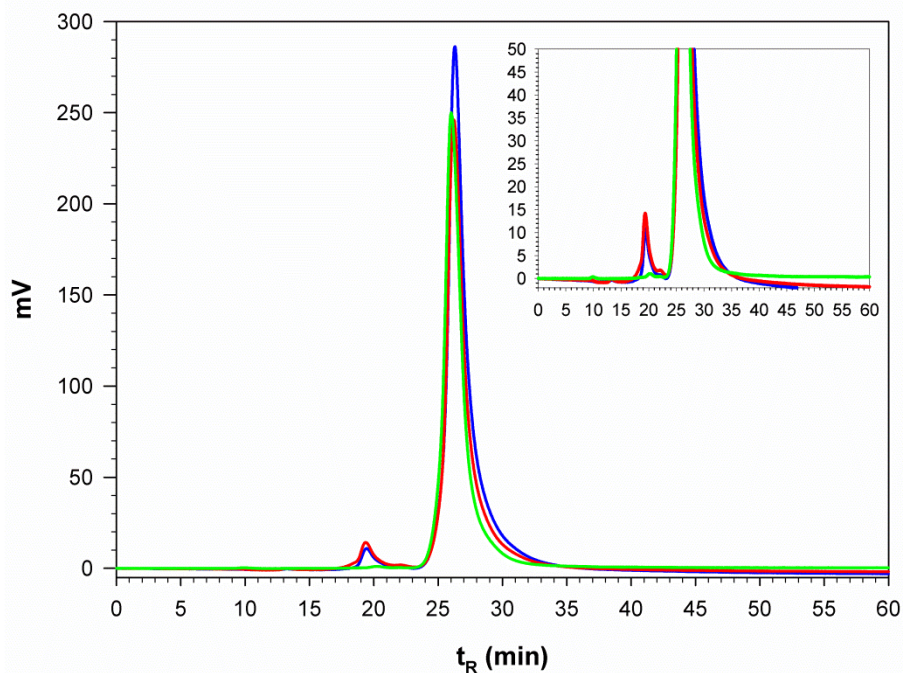


Figura 4. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas de reacción con adición de ácido tricloroacético (TCA). — Sistema A₀, — Sistema A₁₀₀ y — TCA al 0.64%.

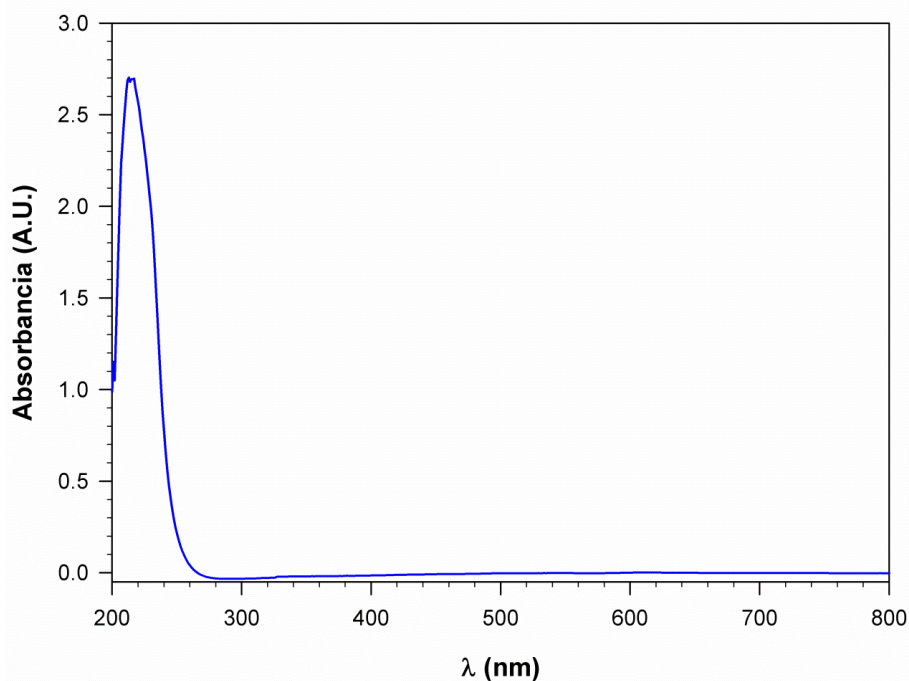


Figura 5. Espectro UV-vis de ácido tricloroacético (TCA) a una concentración de 0.64% (p/v).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

De acuerdo a Hong *et al.* (2012) y Fekete *et al.* (2014), la sílica utilizada como fase estacionaria en las columnas de cromatografía de exclusión molecular puede presentar en ocasiones, fenómenos de interacción electrostática con algunas proteínas cargadas, por lo tanto, un comportamiento similar puede llevarse a cabo con el TCA, quien al contener átomos de cloro dentro de su estructura presentaría propiedades similares a las proteínas cargadas.

Por otro lado, la absorción que presenta este ácido a los 220 nm, hace posible su detección como una señal adicional durante la separación cromatográfica, mismo comportamiento que ha sido previamente reportado por Martinelli y Scheraga (1979), al realizar la separación de fibrinopéptidos bovinos a través de RP-HPLC en muestras reales.

En lo que respecta a la señal encontrada a los 19.40 ± 0.05 min, esta es atribuible a una fracción peptídica desprendida del fibrinógeno por un proceso de desnaturalización, originado a partir de la inestabilidad de esta proteína a pH's menores a 5.5 y, en mayor proporción, a la interacción con el TCA adicionado a los medios de reacción (Seegers, 1967).

Conforme a lo descrito por Rajalingam (2009), este ácido proporciona una desestabilización proteica a través de interacciones electrostáticas con la proteína, originadas por el momento dipolar producido a partir de la electronegatividad presente en los átomos de cloro. Esto, lleva a un reordenamiento estructural de la proteína, y como consecuencia, a un aumento en las interacciones intermoleculares, promovido por una mayor accesibilidad de las superficies no polares, lo que lleva a un fenómeno de coalescencia, aunado al poder deshidratante del TCA sobre el agua enlazada a la proteína, propiciando una precipitación.

En esta investigación, la desestabilización proteica ejercida por el TCA sobre el fibrinógeno fue analizada mediante un estudio teórico de acoplamiento (docking) entre ambas moléculas. Para esto, se obtuvo la estructura cristalina del fibrinógeno (3GHG) del banco de datos de proteínas (PDB) y que ha sido reportada por Kollman *et al.* (2009); ésta fue procesada mediante plataforma de solvatación APBS, Baker *et al.* (2001), generándose así la superficie electrostática molecular del fibrinógeno al pH impuesto en los sistemas de reacción enzimática y con ello conocer la distribución de carga presente.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Figura 6 se muestra la superficie electrostática obtenida, donde se aprecia que el fibrinógeno mantiene áreas predominantemente de color rojo al pH impuesto en los sistemas de reacción enzimática (7.2); indicando que esta proteína presenta en mayor proporción una carga negativa dentro de su estructura. Este resultado es concordante según lo reportado por Teijón (2006) y La Corte *et al.* (2011), donde se plantea que la carga neta del fibrinógeno a pH neutro es de -20, concentrándose la mayor proporción de la carga negativa en el dominio E de su estructura.

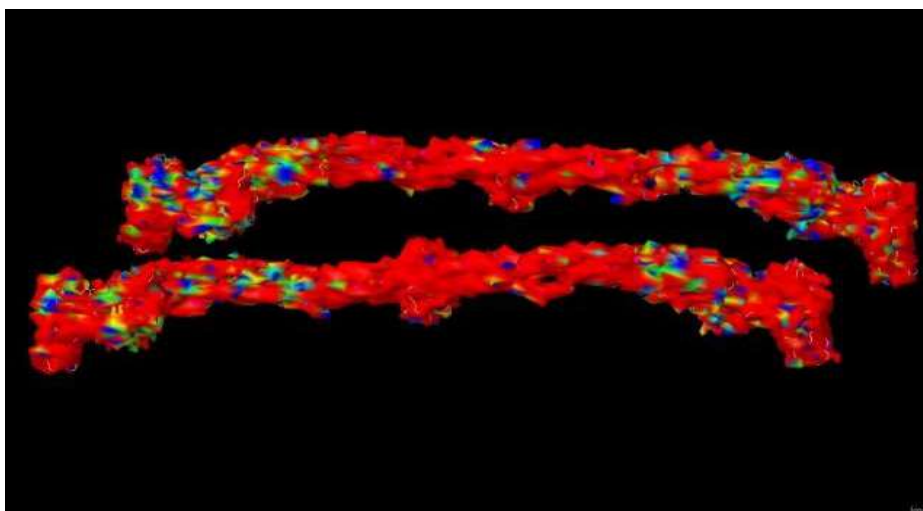


Figura 6. Superficie electrostática molecular del fibrinógeno. Las superficies rojas indican carga negativa mientras superficies azules cargas positivas.

Una vez generada la superficie electrostática molecular se procedió a determinar las energías de acoplamiento presentes entre el TCA y fibrinógeno mediante el software ArgusLab versión 4.0.1. Este análisis se realizó tomando en cuenta la estructura completa del fibrinógeno (3GHG) así como los dominios D (1FZA) y E (2a45) de éste, obteniendo energías de interacción de $-7.77 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $-7.82 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $-7.47 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente. Así también, en la Figura 7 se puede observar el sitio de unión óptimo entre el TCA y la estructura cristalina evaluada, además de la orientación que adquiere la molécula del ácido con respecto a la carga neta presente en el fibrinógeno.

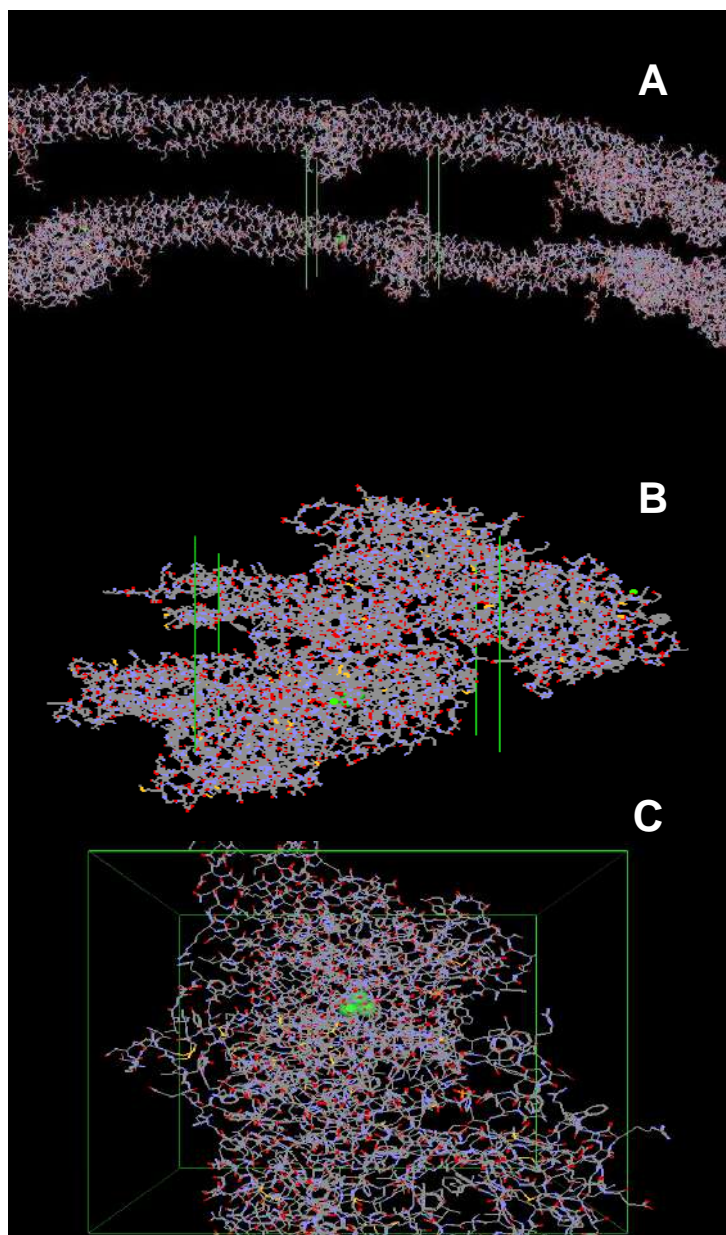


Figura 7. Análisis de interacción molecular entre A) TCA y fibrinógeno, B) TCA y dominio D del fibrinógeno y C) TCA y dominio E del fibrinógeno.

Este análisis de acoplamiento molecular aunado a la separación realizada por SEC-HPLC demuestran una interacción favorable entre estas moléculas, provocando una desnaturalización sobre el fibrinógeno que impide obtener un perfil cromatográfico que diferencie al sistema enzimático A_0 del sistema A_{100} , imposibilitando el cálculo del porcentaje de inhibición de trombina.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Además del TCA, se estudió la incorporación del ácido acético y ácido fosfórico a los sistemas A_0 y A_{100} , sin embargo, no presentaron resultados favorables durante la separación. En el caso de la adición de ácido acético, el perfil cromatográfico obtenido no mostró diferencias significativas entre los sistemas analizados, presentando un caso similar al obtenido previamente para el TCA como se puede visualizar en la Figura 8.

Mientras que, para la adición de ácido fosfórico a los sistemas A_0 y A_{100} (Figura 9) se observó una disminución en la señal analítica correspondiente al sistema A_{100} en comparación a la obtenida en el sistema A_0 , resultado que no es favorable de acuerdo a la hipótesis planteada, ya que en base a ésta y a lo reportado por Ebert y Bell (1985), se debió encontrar un aumento en la señal para el sistema A_{100} por la generación de fibrinopéptidos.

Ante los resultados obtenidos bajo la adición de ácido acético y fosfórico en los sistemas de reacción, se determinó que es imposible su incorporación como agentes solubilizantes de fibrina, ya que no existen resultados satisfactorios en el perfil cromatográfico, para realizar un análisis del porcentaje de inhibición de trombina utilizando heparina como anticoagulante modelo.

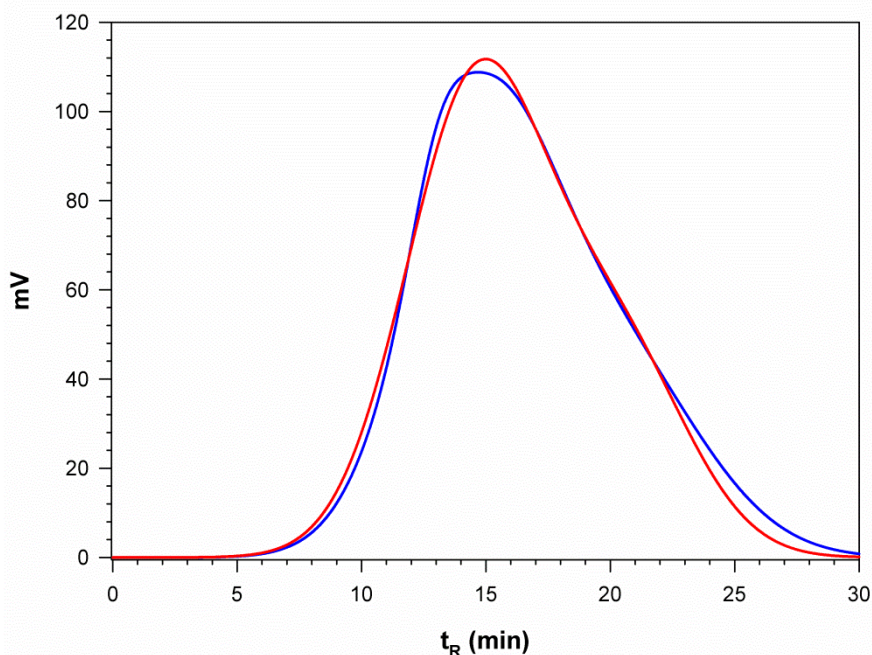


Figura 8. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas de reacción con adición de ácido acético. — Sistema A_0 y — Sistema A_{100} .

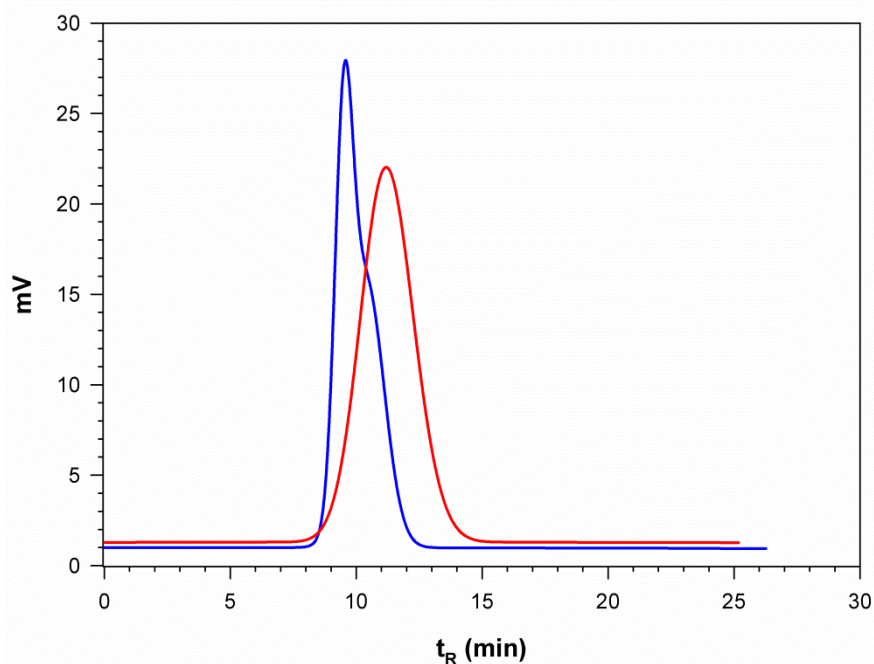


Figura 9. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los sistemas de reacción con adición de ácido fosfórico. — Sistema A₀ y — Sistema A₁₀₀.

6.2.2 Dispersión de fibrina mediante el uso de agentes caotrópicos

La aplicación de compuestos caotrópicos como NaBr y urea para la dispersión de fibrina ha sido previamente reportada por Ariëns (1972) y Maya y Thomas (2012), por lo que fueron probadas como agentes dispersantes del gel producido en el sistema A₁₀₀ y con ello determinar cuál de las dos sales proporcionaba una mayor efectividad en la disolución del polímero de fibrina sin generar alteraciones en los analitos de interés o produjera interferencias durante la separación cromatográfica.

6.2.2.1 Adición de bromuro de sodio como dispersante de fibrina

Según lo reportado por Schwartz *et al* (2010), el ion bromuro es uno de los agentes caotrópicos más fuertes después del ion yoduro y tiocianato, esta propiedad permite obtener un cambio en la solubilidad de las proteínas al modificar la interacción entre la estructura de éstas y el medio de solvatación en el que se encuentran.

En el caso de los polímeros de fibrina, la modificación en su solubilidad mediante la incorporación de bromuro de sodio se debe a la disrupción de las interacciones electrostáticas y enlaces hidrógeno que estabilizan su agregación, originando la formación reversible de monómeros de fibrina, quienes presentan alta solubilidad a pH neutro, permitiendo nuevamente la obtención de un medio líquido.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

De acuerdo a Shulman *et al.* (1953), las concentraciones de NaBr mínimas para la solubilización de fibrina oscilan entre 0.5 a 2 M de esta sal, sin embargo, a pesar de alcanzar una concentración de 0.97 M como lo reporta Ariëns (1972) y Maya y Thomas (2012), no se encontró una completa dispersión del gel producido en el sistema A₁₀₀, lo que demuestra que esta concentración no es suficiente para establecer un rompimiento total de los enlaces no covalentes del polímero de fibrina que permitan desplazar el equilibrio hacia la formación de monómeros de fibrina. No obstante, al alcanzar una concentración de 5.8 M se completó la disolución del gel de fibrina.

Una vez establecida la concentración necesaria de NaBr, se procedió a realizar un análisis mediante espectroscopia UV-vis para determinar si existía un cambio conformacional en los sistemas de reacción A₀ y A₁₀₀ originado por la adición de esta sal, ya que se observó la presencia de un precipitado. En la Figura 10 se presentan los espectros de absorción obtenidos, donde se aprecia una disminución en la absorbancia de la banda característica del fibrinógeno a los 280 nm, en comparación a la encontrada en una solución de esta misma proteína sin adición del agente dispersante, utilizada como control. La disminución observada es debida a la precipitación del fibrinógeno en presencia de bromuro de sodio, puesto que su solubilidad disminuye a causa de una desnaturalización proteica, la cual se ve favorecida a partir de concentraciones 2 M de este agente dispersante (Anfinsen *et al.*, 1957).

Aunado a la desnaturalización presentada por el fibrinógeno, el espectro UV-vis mostró una diferencia significativa en la banda de absorción a los 280 nm entre los sistemas de fibrinógeno y fibrina con adición de este agente dispersante; lo que demuestra el proceso de conversión a pesar de la precipitación generada por la adición de NaBr. En el trabajo de Demchenko (1986), se menciona que existe un efecto batocrómico hacia los 298 nm por la producción de monómeros de fibrina al adicionar sales neutras, debido a un efecto anómalo sobre el triptófano. Sin embargo, este cambio no fue observado en el espectro correspondiente, por lo que se sugiere que la banda que se esperaría para el sistema fibrina/NaBr sería más bien producida por el fibrinógeno no transformado en este monómero.

Por otra parte, se encontró una alta absorción de la sal de bromuro a los 220 nm, longitud de detección utilizada para la separación cromatográfica, presentando un comportamiento similar al obtenido previamente por el TCA.

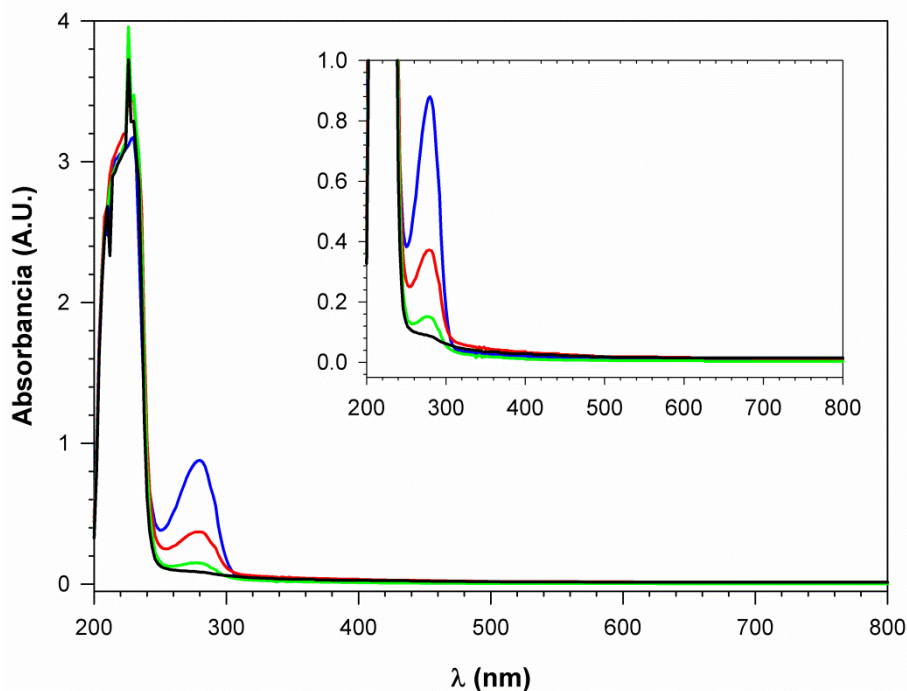


Figura 10. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de NaBr como agente dispersante de fibrina hasta alcanzar una concentración 5.8 M. — Fibrinógeno sin adición de NaBr, — Fibrinógeno con adición de NaBr, — Fibrina con adición de NaBr y — NaBr 5.8 M.

Adicionalmente, se obtuvieron los espectros UV-vis correspondientes a la incorporación de esta sal a una concentración final de 0.97 M (Figura 11), observándose una menor desnaturalización por parte del fibrinógeno, ya que esta proteína presenta una mayor estabilidad bajo estas condiciones como lo reporta Anfinsen *et al.* (1957).

En éste espectro también se observó la absorción del bromuro de sodio a 220 nm, así como la disminución en la respuesta por parte de la banda correspondiente al sistema fibrina/NaBr confirmando el proceso de transformación enzimática, sin embargo, al no solubilizar por completo el gel de fibrina, esta señal analítica puede presentar un error por defecto, ya que en el hidrogel de fibrina podría encontrarse atrapado aún fibrinógeno residual.

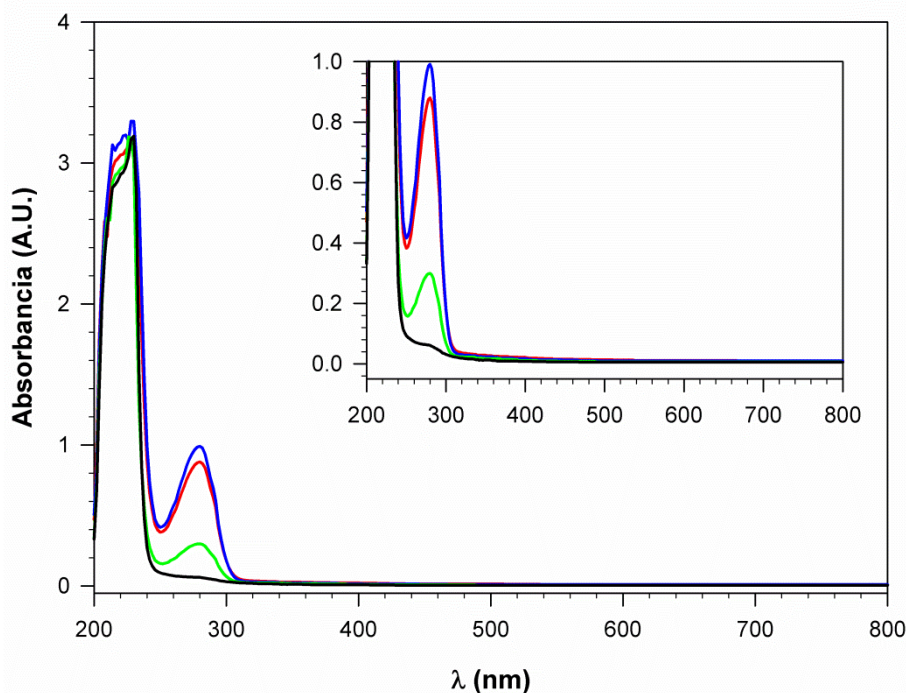


Figura 11. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de NaBr a 0.97 M como agente dispersante de fibrina. — Fibrinógeno sin adición de NaBr, — Fibrinógeno con adición de NaBr, — Fibrina con adición de NaBr y — NaBr a 0.97 M.

6.2.2.2 Adición de urea como dispersante de fibrina

Al incorporar este agente dispersante al sistema enzimático de reacción A_{100} hasta una concentración final de 5 M, se observó la completa disolución del polímero lineal de fibrina como lo establece Maya y Thomas (2012). Esta disolución de fibrina es lograda mediante el poder caotrópico que presenta la urea, la cual posee la capacidad de interactuar con grupos polares de las proteínas, romper los enlaces hidrógeno que se encuentran presentes en la estructura de éstas, además de los involucrados entre las proteínas y su medio de solvatación, propiciando un debilitamiento en las uniones hidrofóbicas, lo que origina un aumento de su solubilidad y en algunos casos su desnaturalización (Shulman *et al.*, 1953; Salvi, 2005; Ball y Hallsworth, 2015).

La urea actúa primeramente sobre los enlaces intermoleculares de hidrógeno presentes en el polímero de fibrina, provocando su despolimerización. Posteriormente evita su re-asociación interviniendo en las cadenas laterales de los monómeros de fibrina, manteniéndolos en solución debido a las fuerzas de repulsión existentes entre monómeros. No obstante, si la urea es retirada del medio de reacción mediante diálisis

RESULTADOS Y DISCUSIONES

el proceso muestra una reversibilidad hacia la formación del polímero (Anfinsen *et al.*, 1957; Lorand, 2005).

Después de determinar el buen funcionamiento de la urea para la solubilización del gel de fibrina, se procedió a realizar una espectroscopía UV-vis con el objetivo de descartar cambios conformacionales por su adición como ocurrió con el NaBr. En la Figura 12 se muestra el espectro correspondiente, donde la concentración de urea utilizada (5 M) provocó una disminución en la banda característica del fibrinógeno a los 280 nm, lo cual indica un proceso de desnaturalización como lo reportan Brosstad y Godal (1977); así mismo, Anfinsen *et al.* (1957), han descrito que la adición de urea a esta concentración promueve la pérdida de alrededor del 10% de fibrinógeno a un pH neutro, condiciones similares a las utilizadas en los ensayos enzimáticos realizados en esta investigación.

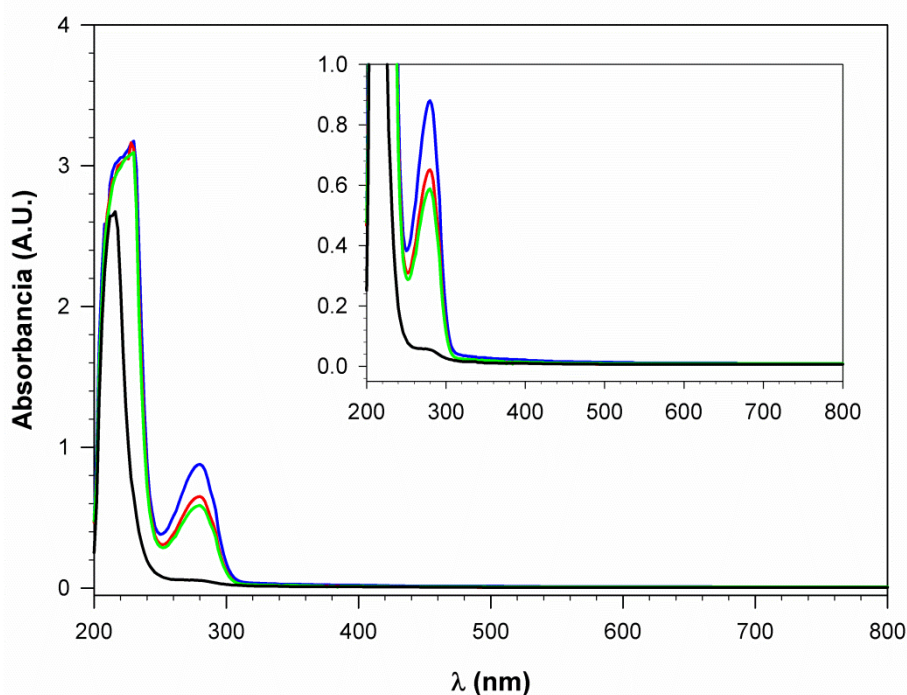


Figura 12. Espectros UV-vis obtenidos a partir de la adición de urea a 5 M como agente dispersante de fibrina. — Fibrinógeno sin adición de urea, — Fibrinógeno con adición de urea, — Fibrina con adición de urea y — Urea 5 M.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Así también se observó un cambio en la absorción de la banda a los 280 nm en el sistema fibrina/urea con respecto al fibrinógeno/urea, comprobando así, el proceso de transformación de fibrinógeno en fibrina. Sin embargo, esta fue significativamente menor a la encontrada en los sistemas donde se adicionó NaBr, resultado que puede estar influenciado por la actividad autoprotolítica de la trombina, ocasionando una disminución en la actividad coagulante de esta enzima sobre el fibrinógeno (Bode, 2006).

Adicionalmente, se encontró que la urea mantiene una absorción a los 220 nm, con una intensidad menor a la que presenta el NaBr a 5.8 M pero similar a la proporcionada por el TCA a 0.64% (p/v), por lo que se inyectó una solución de urea y NaBr a las concentraciones donde proporcionaron la completa dispersión del gel de fibrina para determinar su comportamiento durante la separación cromatográfica.

Después del análisis se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 13, en el cual se encontró que ambos agentes dispersantes eluyeron en la parte final del volumen de la columna, además de ser detectados a la longitud de onda utilizada durante la separación cromatográfica (220 nm), siendo la sal de bromuro la que presentó una intensidad de señal mayor (960 mV) en comparación a la urea (6.5 mV).

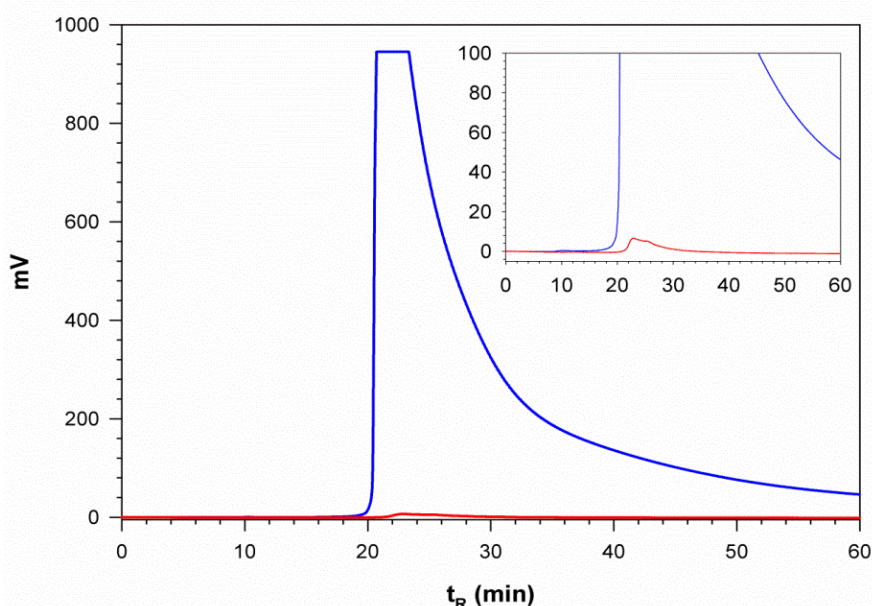


Figura 13. Cromatogramas obtenidos a partir de la inyección de NaBr y urea a las concentraciones donde presentaron la solubilidad del gel de fibrina. — NaBr 5.8 M y — Urea 5 M.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Ante los resultados obtenidos del análisis de solubilidad, espectroscopía UV-vis y separación cromatográfica mediante SEC-HPLC de cada uno de los agentes dispersantes de fibrina estudiados, se determinó que la urea presentó las mejores condiciones de aplicación, ya que mostró una excelente solubilización del gel de fibrina, además de una menor precipitación de fibrinógeno, así como una menor interferencia durante el proceso de separación.

Los resultados experimentales fueron apoyados mediante un estudio teórico de acoplamiento molecular (docking) entre el fibrinógeno y la urea, encontrándose una menor interacción entre ambas moléculas (Figura 14), en comparación a la obtenida previamente para el caso del TCA.

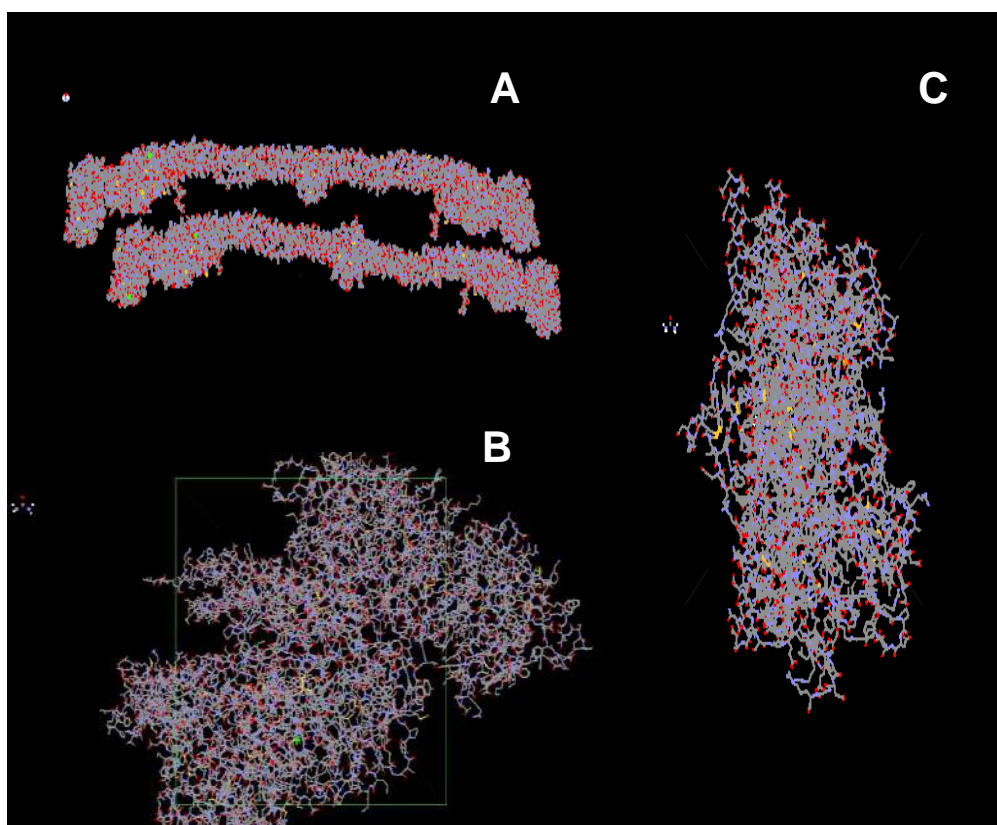


Figura 14. Análisis de interacción molecular entre A) Urea y fibrinógeno, B) Urea y dominio D del fibrinógeno y C) Urea y dominio E del fibrinógeno.

Las energías de acoplamiento resultantes fueron $-5.05 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para el análisis entre la estructura completa del fibrinógeno (3GHG) y la urea, mientras que de $-5.16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $-5.07 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ en el caso de la interacción de urea con el Dominio D (1FZA) y dominio E (2a45) del fibrinógeno respectivamente. Estos resultados indican

una menor probabilidad de que se lleve a cabo una interacción molecular entre la urea y el fibrinógeno, y como consecuencia, una menor precipitación del mismo.

Además de estas ventajas, la urea tiene la capacidad de disminuir la actividad enzimática de la trombina, de acuerdo a Anfinsen *et al.* (1957) a una concentración de 6 M se han encontrado sólo trazas de su actividad, mientras que Lima *et al.* (2004), han determinado la pérdida total en la actividad de la trombina sobre el sustrato cromogénico S2238 cuando se utiliza una concentración 5 M de urea, evitando la hidrólisis de este tripéptido unido a la p-NA. Por esto, su inclusión en los sistemas de reacción enzimática permite cumplir dos funciones fundamentales: la disolución del gel de fibrina y la inactivación de la reacción enzimática.

Debido a todos estos beneficios se decidió incorporar a la urea como agente dispersante en los sistemas de reacción para realizar el análisis de los productos mediante SEC-HPLC.

6.3 Separación cromatográfica de los productos de reacción mediante SEC-HPLC

6.3.1 Elaboración de curva patrón de pesos moleculares

Se realizó una curva estándar de pesos moleculares con un rango que osciló entre los 1.57 y los 544.62 kDa, haciendo uso de seis proteínas de diferente tamaño. Los tiempos de retención correspondientes a cada una de éstas, así como los cromatogramas correspondientes se muestran la Tabla 6 y Figura 15 respectivamente.

Tabla 6. Tiempos de retención obtenidos para cada una de las proteínas utilizadas como estándar.

Proteína	Peso Molecular (kDa)	t _R (min)
Ureasa de <i>Canavalia ensiformis</i>	544.62	10.07±0.01
Seroalbúmina bovina	66.34	13.45±0.06
Ovoalbúmina	45.00	14.53±0.02
Lactoglobulina	18.40	14.83±0.01
Aprotinina	6.50	18.96±0.04
Glu ¹ - Fibrinopéptido B	1.57	19.51±0.04

RESULTADOS Y DISCUSIONES

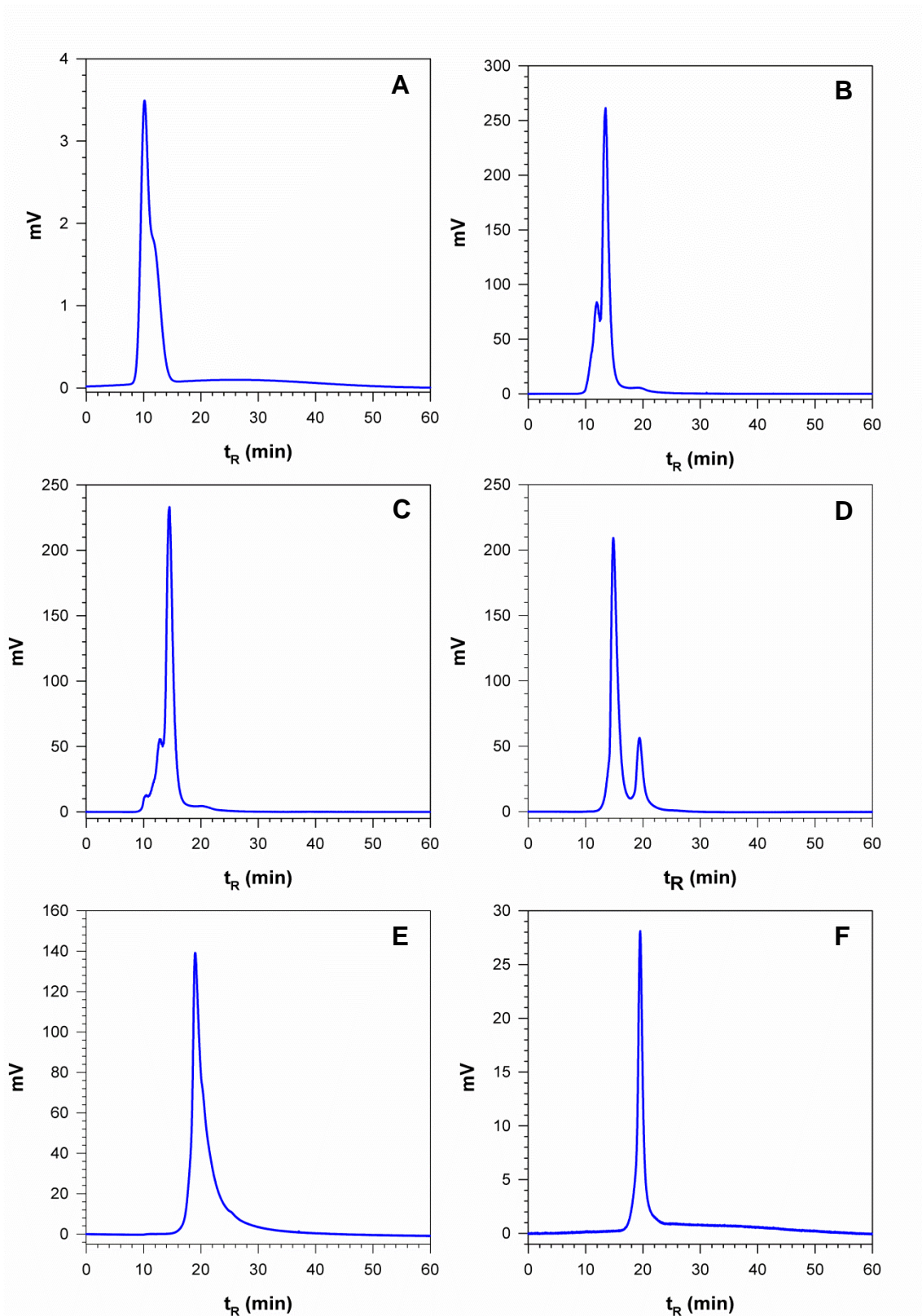


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a cada una de las proteínas utilizadas como estándar de peso molecular. A) Ureasa de *Canavalia ensiformis*, B) Seroalbúmina bovina, C) Ovoalbúmina, D) Lactoglobulina, E) Aprotinina y F) Glu¹- Fibrinopéptido B.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A través de los resultados obtenidos, se realizó el análisis estadístico de \log_{10} P.M vs t_R mediante un ajuste por mínimos cuadrados con la finalidad de obtener un modelo matemático que permitiera calcular de manera aproximada los pesos moleculares de los productos de la reacción enzimática al ser separados por SEC-HPLC. El método está basado en lo reportado por Hong *et al.* (2012).

El gráfico resultante se muestra en la Figura 16 donde con el ajuste lineal se obtuvo un coeficiente de correlación $r^2 = 0.950$ con una pendiente de $-0.241 \text{ kDa}\cdot\text{min}^{-1}$ y una ordenada al origen de 5.083 kDa , con la siguiente ecuación que permite el cálculo de pesos moleculares.

$$\log_{10} \text{ P.M.} = -0.241 t_R + 5.088$$

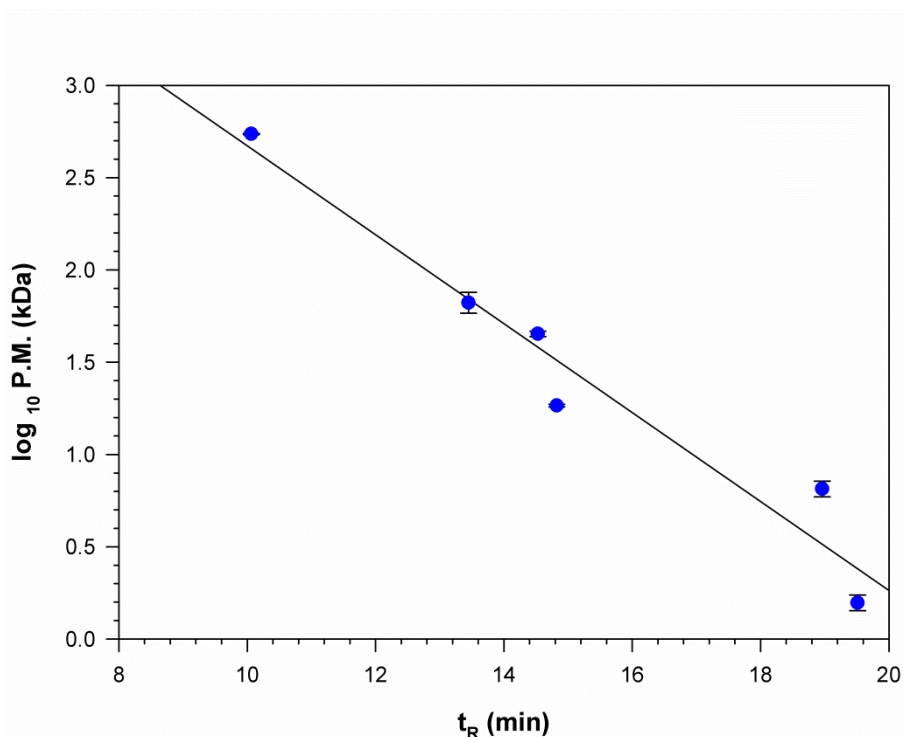


Figura 16. Curva estándar \log_{10} P.M. vs t_R .

6.3.2 Perfil cromatográfico y curva patrón de fibrinógeno

Se inyectó un estándar de fibrinógeno en un intervalo de concentraciones de $2.94 \mu\text{M}$ hasta $26.27 \mu\text{M}$, obteniéndose un perfil similar en todas las réplicas (Figura 17). El cromatograma obtenido mostró dos picos distintos: el primero con un tiempo de retención de $10.52 \pm 0.12 \text{ min}$, equivalente a un peso molecular de 357.3 kDa , el cual es aproximado al peso molecular del fibrinógeno (340 kDa) reportado por Kollman *et al.* (2009); y el segundo presentó un tiempo de retención de $19.31 \pm 0.06 \text{ min}$

correspondiente a 2.72 kDa, el cual pudo ser originado por el proceso de preparación de la solución como lo reporta el mismo autor, debido a la inestabilidad de la estructura α -hélice que presenta el fibrinógeno.

En todos los casos, el primer pico eluido presentó la mayor proporción de área con un porcentaje mayor al 95% respecto al área total normalizada, ya que esta señal corresponde a la estructura completa del fibrinógeno. Por otra parte, el intervalo de concentraciones de fibrinógeno analizado presentó una tendencia lineal con un factor de correlación $r^2 = 0.9881$ (Figura 17), obteniéndose una pendiente de $2180.3 \text{ mV}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ y una ordenada al origen de $-5957.1 \text{ mV}\cdot\text{s}$.

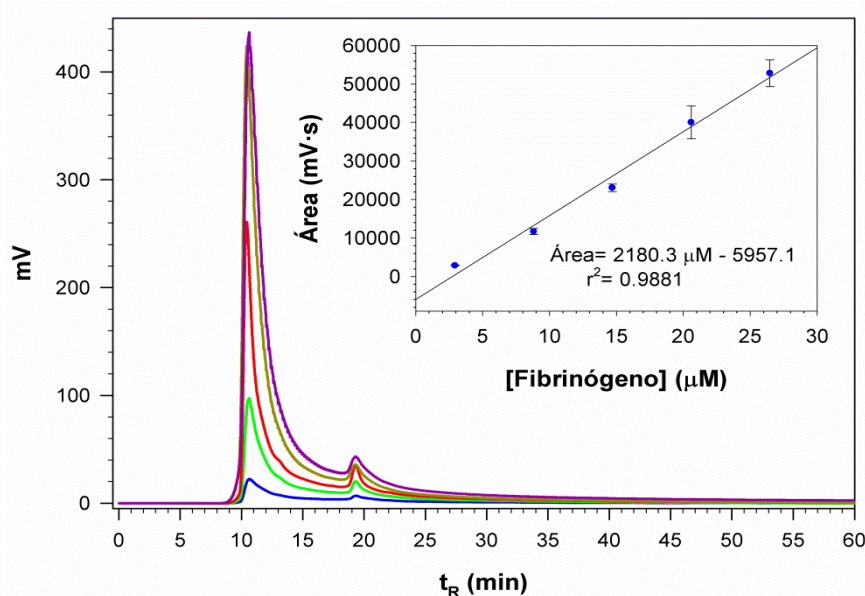


Figura 17. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de fibrinógeno a diferentes concentraciones. — 2.94 μM , — 8.82 μM , — 14.70 μM , — 20.59 μM y — 26.47 μM .

6.3.3 Perfil cromatográfico obtenido al utilizar urea como agente dispersante

Con la finalidad de determinar si existía un efecto de la adición de urea en los sistemas de reacción (A_0 , A_{100} y A_H) que repercutiera en el perfil cromatográfico derivado del análisis mediante SEC-HPLC, se realizó la adición de urea a cada sistema de reacción como se había determinado previamente, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la Figura 18.

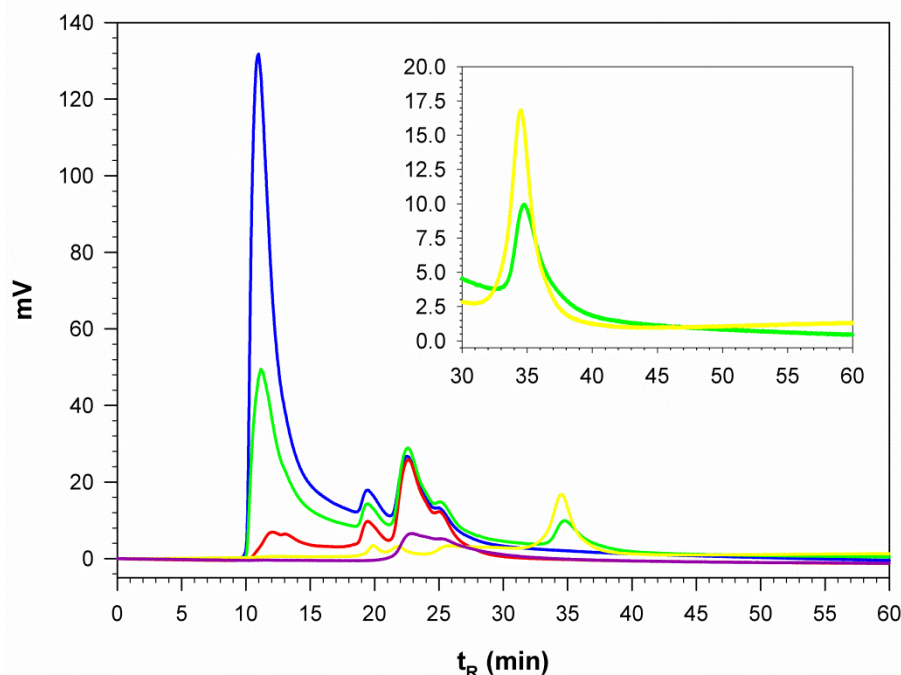


Figura 18. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis de los diferentes sistemas de reacción con adición de urea. — Sistema A₀, — Sistema A₁₀₀, — Sistema A_H, — Heparina a 60 U·mL⁻¹ y — Urea 5 M.

Se encontró que los dos picos observados anteriormente en el análisis de la soluciones patrón de fibrinógeno tuvieron un incremento del tiempo de retención pasando de los 10.52 ± 0.12 min a los 11.27 ± 0.41 min en el caso del primer pico y como consecuencia una disminución en el peso molecular de 357.3 kDa a los 235.5 kDa; mientras que para el segundo pico aumentó de 19.31 ± 0.06 min a 19.48 ± 0.07 min, con una disminución en el peso molecular de 2.72 kDa a 2.47 kDa, indicativo de un reordenamiento estructural sufrido por el fibrinógeno originado por las propiedades caotrópicas de la urea.

Adicionalmente, se obtuvo un disminución en la intensidad de señal para el pico correspondiente a los 11.27 ± 0.41 min del sistema A₀ tratado con urea con respecto a la señal generada por el fibrinógeno sin este tratamiento a una concentración de 14.70 μ M, la cual fue utilizada en los sistemas de reacción; determinándose que la concentración de fibrinógeno después de este tratamiento correspondió a sólo 10.73 μ M, debido a un efecto de dilución así como por una reacción entre fibrinógeno y la urea. Aunado a esto, Anfinsen *et al.* (1957) han determinado que la mayor estabilidad del fibrinógeno en presencia de urea se da a un pH= 7.6, con una desnaturalización

RESULTADOS Y DISCUSIONES

del fibrinógeno de alrededor del 10%, sin embargo, el pH obtenido después de la incorporación de urea a los sistemas de reacción fue de 7.4, factor que pudo influenciar en una pérdida mayor de fibrinógeno en su forma nativa por la incorporación de urea.

Por otro lado, Brosstad y Godal (1977) han reportado que la exposición del fibrinógeno a la urea modifica su solubilidad en una relación directa con el tiempo de contacto, produciendo cambios conformacionales por la formación de algunos productos de desnaturalización que se mantienen en solución. Estos cambios, son producidos por la capacidad que tiene la urea para modificar la solvatación de las proteínas mediante su efecto caotrópico entre los enlaces hidrógeno presentes entre el medio de solvatación y la proteína (Lorand, 2005; Schwartz, 2010).

Este fenómeno puede explicar la aparición de un tercer pico a los 22.58 ± 0.06 min (Figura 18) derivado de la reacción entre la urea y el fibrinógeno sin reaccionar de cada uno de los sistemas enzimáticos analizados, una vez que no se encontró diferencia en la intensidad de la señal de este tercer pico en comparación a la disminución de la señal presentada en los dos picos eluidos previamente.

De acuerdo a lo reportado por Proc *et al.* (2010), la urea comienza el proceso de desnaturalización de las proteínas mediante la unión a histidinas cargadas, posteriormente se une a aminoácidos positivamente cargados (Lys y Arg) y finalmente a grupos amida para propiciar la disrupción de los enlaces hidrógeno. De acuerdo a esta información, el pico identificado a los 22.58 ± 0.06 min puede ser resultado de este mecanismo de acción, así mismo, se demuestra que el fibrinógeno presenta una mayor estabilidad ante la urea al pH impuesto en los sistemas de reacción, ya que el mecanismo de desnaturalización está restringido a la unión de la urea a sitios cargados positivamente. Estos sitios a su vez, se encuentran en una menor proporción en el fibrinógeno a las condiciones impuestas para los ensayos enzimáticos, como se determinó anteriormente con la superficie electrostática molecular generada durante el análisis teórico (Figura 6).

Por otra parte, esta fracción desprendida del fibrinógeno debe presentar un peso molecular menor a 1.57 kDa, ya que el tiempo de elución fue mayor al presentado por el Glu¹-fibrinopéptido B utilizado como estándar (19.51 ± 0.04). Así también, esta señal encontrada a los 22.58 ± 0.06 min puede estar compuesta por la urea que se incorporó

RESULTADOS Y DISCUSIONES

a cada uno de los sistemas analizados, debido a que este componente también fue detectado durante la separación cromatográfica con un tiempo de retención similar (22.87 ± 0.03 min) (Figura 18).

Siguiendo con el análisis de los cromatogramas, se encontró una cuarta señal a los 34.88 ± 0.07 min únicamente en el sistema A_H, la cual fue identificada como heparina cuando se inyectó un patrón de ésta a la misma concentración presente en el sistema A_H (Figura 18). Según lo descrito por Posse *et al.* (2006) y Lever *et al.* (2012) la heparina sódica utilizada para este análisis presenta un peso molecular de alrededor de 16 kDa, por lo que se esperaría una elución en un tiempo aproximado a los 15 min, no obstante, al ser un glucosaaminoglucano sulfatado, la presencia de los grupos SO_3^- unidos a su estructura pueden generar interacciones electrostáticas con la fase estacionaria de la columna (de la misma forma que lo hace el TCA y NaBr) propiciando un mayor tiempo de retención.

Así mismo, se encontró una disminución del 56.16% para el área correspondiente a la heparina en el sistema A_H con respecto al área proporcionada por este compuesto a una concentración de $60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, misma que fue colocada en éste sistema de reacción; lo que sugiere un acoplamiento entre la trombina y la heparina como lo describe Lyttleton (1954) y Carter *et al.*, (2005), para formar un complejo que disminuye la actividad enzimática. También es importante señalar que la heparina es un compuesto estable a concentraciones 6 M de urea de acuerdo a lo descrito por Giddings (1976), e incluso es capaz de darle estabilidad a ciertas proteínas como lo describe Zakrzewska *et al.* (2009), por lo que se descarta una desnaturalización por parte de la urea sobre la heparina que haya provocado la disminución de la señal analítica observada.

La disminución encontrada por parte de la molécula utilizada como anticoagulante modelo y la posibilidad de cuantificar la concentración unida a la enzima, es una gran ventaja, ya que se puede predecir la dosis necesaria a suministrar en un sistema biológico, además de monitorear tiempos de separación del complejo enzima-inhibidor. Esta posible aplicación no ha sido descrita previamente por ningún método utilizado para la determinación de la actividad anticoagulante de diferentes compuestos, por lo que la SEC-HPLC se convierte en una herramienta con un alto potencial para estudiar la inhibición de trombina.

6.3.4 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la heparina mediante SEC-HPLC

Al haber evaluado el perfil cromatográfico obtenido con la adición de urea, se decidió hacer el cálculo del porcentaje de inhibición tomando como referencia el área del primer pico eluido, ya que éste presentó cambios significativos en cada uno de los sistemas de reacción, considerando la disminución en la concentración de fibrinógeno por su transformación en fibrina.

Mediante los datos del área bajo la curva obtenidos en los cromatogramas correspondientes a cada sistema, se determinó que la concentración de heparina utilizada presenta un poder inhibitorio del $43.19 \pm 2.02\%$ con un coeficiente de variación (CV) del 4.67%, el cual se considera estadísticamente favorable al ser comparado con los obtenidos por Pawlaczyk-Graja *et al.* (2016) y Majumdar *et al.* (2015), quienes mediante técnicas de análisis clínico, obtuvieron CV's de 7.85% retardando el tiempo parcial de tromboplastina (aPTT) 3.45 veces a una concentración de heparina de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 3.35% al retardar 1.16 veces la coagulación de plasma sanguíneo haciendo uso de una concentración de heparina de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Adicionalmente, al comparar el CV obtenido en este trabajo de investigación con otras técnicas empleadas para determinar la capacidad anticoagulante, se puede decir que la nueva metodología propuesta presenta una alta competitividad comparada con técnicas espectrofotométricas que mantienen un CV por encima al encontrado, ejemplo de ello es el trabajo de Melo *et al.* (2004) al obtener una $\text{IC}_{50} = 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre la trombina para galactanos sulfatados y Chen *et al.* (2017) quienes determinaron una $\text{IC}_{50} = 1140 \text{ nM}$ para el caso de derivados de benzimida, obteniendo coeficientes de variación de hasta 33.3% y 13.9% respectivamente.

Otro ejemplo son las técnicas turbidimétricas que presentan CV's de entre 14.30% y 17.33% según lo reportado por Sabbione *et al.* (2016) al calcular una $\text{IC}_{50} = 0.07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para hidrolizados de amaranto y Lee y Bae (2015) al inhibir la formación de fibrina en un 25% mediante la incorporación de orientina un flavonoide C-glicosilado.

Aunado a esto, el método establecido ofrece una mayor respuesta al cambio en la señal analítica al incorporar el inhibidor a los medios de reacción, comparado al obtenido en técnicas turbidimétricas como las reportadas por Ku *et al.* (2014) o Yang

RESULTADOS Y DISCUSIONES

et al. (2007), donde el cambio en la absorbancia es de sólo 0.2 A.U, al colocar concentraciones de entre 0 y 30 μM de pelargonidina en el caso de los estudios llevados a cabo por Ku *et al.* y concentraciones de 0-90 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de hidrolizados de clara de huevo para el análisis propuesto por Yang *et al.* Así también, la metodología propuesta presenta ventajas sobre el seguimiento de fibrinopéptidos por RP-HPLC reportado por Dang *et al.* (1995), quienes necesitan realizar un pretratamiento y concentración de la muestra para obtener concentraciones de 0.4 μM de éste fibrinopéptido, complicando el desarrollo analítico; lo cual también fue comprobado en esta investigación al realizar la separación de Glu¹ fibrinopéptido B a una concentración de 500 ppm (318.47 μM) obteniendo una señal de sólo 27.4 mV como se muestra en la Figura 15 F.



CONCLUSIONES

El seguimiento de la conversión de fibrinógeno en fibrina bajo la aplicación de la SEC-HPLC fue posible gracias a la incorporación de urea como agente solubilizante de fibrina, el cual, permitió la dispersión de este polímero generando mínimas interferencias durante el análisis de la capacidad antitrombótica utilizando heparina como anticoagulante modelo.

La metodología propuesta para la determinación del porcentaje de inhibición de trombina permite tener la reproducción de la actividad biológica total de la trombina, limitante principal de los métodos cromogénicos y electrogénicos. Adicionalmente, proporciona un índice de unión de la trombina con el inhibidor, información que no ha sido descrita en otras metodologías de determinación de la actividad anticoagulante.

Por otro lado, parámetros como el coeficiente de variación así como una mayor respuesta al cambio en la señal analítica al incorporar el inhibidor estudiado presentan ventajas sobre los métodos comúnmente utilizados especialmente sobre las técnicas turbidimétricas y de seguimiento de fibrinopéptidos por RP-HPLC, lo que permite determinar que la nueva metodología propuesta presenta un gran potencial para su aplicación como método de determinación de la actividad anticoagulante de diversos compuestos.



PERSPECTIVAS

- ❖ Es necesario evaluar diferentes concentraciones de heparina para establecer hasta que concentración de la misma es posible determinar un porcentaje de inhibición de trombina.
- ❖ Se deben plantear cinéticas de seguimiento del proceso de conversión con la finalidad de obtener datos que muestren el comportamiento de los sistemas enzimáticos de reacción antes de la formación del gel de fibrina.
- ❖ Se deben optimizar tanto el método de separación como la reacción enzimática de transformación a fin de hacer más eficiente la metodología.
- ❖ Es necesario probar otros compuestos anticoagulantes con diferentes características de unión a la trombina y validar el buen funcionamiento de la metodología desarrollada.
- ❖ Se debe validar la metodología una vez optimizada realizando un contraste con técnicas espectrofotométricas y turbidimétricas para determinar si los resultados son similares, además de determinar con claridad las ventajas que ofrece la nueva metodología.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R. L., y Bird, R. J. (2009). Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, 14(5), 462-470.

Ali, M. R., Salim Hossain, M., Islam, M. A., Saiful Islam Arman, M., Sarwar Raju, G., Dasgupta, P., y Noshin, T. F. (2014). Aspect of thrombolytic therapy: a review. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-7.

Anfinsen, C.B., Anson, M.L., Bailey, K., y Edsall, J.T. (1957). *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 12). Academic Press.

Arata, P. X., Quintana, I., Canelón, D. J., Vera, B. E., Compagnone, R. S., y Ciancia, M. (2015). Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green seaweeds of the order Bryopsidales. *Carbohydrate polymers*, 122, 376-386.

Ariëns, E. J. (1972). *Drug Design: Medicinal Chemistry: A Series of Monographs* (Vol. 3). Academic Press.

Arzamendi, D., Freixa, X., Puig, M., y Heras, M. (2006). Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(8), 2H-10H

Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., y McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10037-10041.

Ball, P., y Hallsworth, J. E. (2015). Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(13), 8297-8305.

Barash, P. G. (Ed.). (2009). *Clinical anesthesia*. Lippincott Williams & Wilkins.

Beck, E., Shainoff, J., Vogel, A. y Jackson, D. (1971). Functional evaluation of an inherited abnormal fibrinogen: fibrinogen "Baltimore". *The Journal of Clinical Investigation*, 50(1), 1874-1884.

Beckman, M. G., Hooper, W. C., Critchley, S. E., y Ortel, T. L. (2010). Venous thromboembolism: a public health concern. *American Journal of Preventive Medicine*, 38(4), S495-S501.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., y Farrell, S. O. (2010). *Introduction to General, Organic and Biochemistry*. Cengage Learning.
- Bode, W. (2006). Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 36(2), 122-130.
- Bouvier, E. S., y Koza, S. M. (2014). Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 85-94.
- Brosstad, F., y Godal, H. C. (1977). Qualitative changes in fibrinogen following exposure to agents used for preparation of fibrin monomers. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 6(3), 149-156.
- Cabrera-Rayo, A., y Nellen-Hummel, H. (2007). Epidemiología de la enfermedad tromboembólica veosa. *Gaceta Médica de México*, 143(1), 3-5.
- Carr Jr, M. E., y Hermans, J. (1977). Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules*, 11(1), 46-50.
- Carter, W. J., Cama, E., y Huntington, J. A. (2005). Crystal structure of thrombin bound to heparin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2745-2749.
- Catto, A. (2005). Epidemiology of coagulopathy. En A.D. Blann, G.Y.H. Lip y A.G.G Turpie (Ed), *Thrombosis in clinical practice*: (pp. 18-35). Oxfordshire, UK: CRC Press.
- Chen, D., Shi, J., Liu, J., Zhang, X., Deng, X., Yang, Y., Cui, S., Zhu, Q., Gong, G., y Xu, Y. (2017). Design, synthesis and antithrombotic evaluation of novel non-peptide thrombin inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(2), 458-470.
- Choi, J. H., Lee, H. J., y Kim, S. (2016). Purification and antithrombotic activity of wulfase, a fibrinolytic enzyme from the fruit bodies of the edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf. ex. Fr. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(6), 608-614.
- Cooper, A. V., Standeven, K. F., y Ariëns, R. A. (2003). Fibrinogen gamma-chain splice variant γ' alters fibrin formation and structure. *Blood*, 102(2), 535-540.
- Crawley, J. T. B., Zanardelli, S., Chion, C. K. N. K., y Lane, D. A. (2007). The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 5(s1), 95-101.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dang, O. D., Vindigni, A., y Di Cera, E. (1995). An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13), 5977-5981.

Davie, E. W., y Kulman, J. D. (2006, February). An overview of the structure and function of thrombin. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 32, No. S 1, pp. 003-015). Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

De Caterina, R., Husted, S., Wallentin, L., Andreotti, F., Arnesen, H., Bachmann, F., Baigent, C., Huber, K., Jespersen, J., Kristensen, S.D., Lip, G.Y., Morais, J., Rasmussen, L.H., Sieghbahn, A., Verheugt, F.W., y Weitz, J.I. (2013). General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). *Thrombosis and haemostasis*, 109(4), 569-579.

De Peuriot, M. D., Nigretto, J. M., y Jozefowicz, M. (1980). Electrochemical activity determination of trypsin-like enzymes II—Thrombin. *Thrombosis research*, 19(4-5), 647-654.

Demchenko, A. P. (1986). *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Springer Science & Business Media.

Doolittle, R. F. (2003). Structural basis of the fibrinogen–fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography. *Blood reviews*, 17(1), 33-41.

Ebert, R. F., y Bell, W. R. (1985). Assay of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 148(1), 70-78.

Esper, R. C., Delgadillo, C. R. A., y Ríos, D. S. (2011). Inhibidores directos de trombina. *Medicina Interna de México*, 27(1), 38-51.

Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., y Guillarme, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, 161-173.

Ferreira-Mendes, S., dos Santos, O., Barbosa, A. M., Vasconcelos, A. F. D., Aranda-Selverio, G., Monteiro, N. K., Dekker, R.F.H., Sá-Perreira, M., Tovar, A.M.F., de Souza Mourão, P.A., y da Silva, M. D. L. C. (2009). Sulfonation and anticoagulant activity of

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. *International journal of biological macromolecules*, 45(3), 305-309.

Gardenhire, D. S. (2015). *Rau's respiratory care pharmacology*. Elsevier Health Sciences.

Giddings, J. C. (Ed.). (1976). *Advances in chromatography* (Vol. 14). CRC Press.

González-Orozco, A.E., y Zavala-Hernández, C. (2005). Trombofilias primarias. *Revista de Hematología*, 6(1), 9-17.

Greineder, C. F., Howard, M. D., Carnemolla, R., Cines, D. B., y Muzykantov, V. R. (2013). Advanced drug delivery systems for antithrombotic agents. *Blood*, 122(9), 1565-1575.

Henschen, A., Lottspeich, F., Kehl, M., y Southan, C. (1983). Covalent structure of fibrinogen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 408(1), 28-43.

Hirsh, J., Dalen, J. E., Anderson, D. R., Poller, L., Bussey, H., Ansell, J., y Deykin, D. (2001). Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest Journal*, 119(1_suppl), 8S-21S.

Hirsh, J., y Weitz, J. I. (1999). New antithrombotic agents. *The Lancet*, 353(9162), 1431-1436.

Hong, P., Koza, S., y Bouvier, E. S. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923-2950.

Huang, S. M., Cao, Z. Y., & Davie, E. W. (1993). The role of amino-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen. *Biochemical and biophysical research communications*, 190(2), 488-495.

Hutton, R. A. (1987). Chromogenic substrates in haemostasis. *Blood reviews*, 1(3), 201-206.

Izquierdo, C., y Burguillo, F. J. (1989). Synthetic substrates for thrombin. *International Journal of Biochemistry*, 21(6), 579-592.

Janmey, P. A., Winer, J. P., y Weisel, J. W. (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(30), 1-10.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ji, J., Gan, J., Kong, J., Yang, P., Liu, B., y Ji, C. (2012). Electrochemical detection of the activities of thrombin and its inhibitor. *Electrochemistry Communications*, 16(1), 53-56.
- Ko, H., Park, S., y Kim, K. (2015). Aptamer-free electrochemical detection of thrombin based on coagulation reaction of ferrocene-labeled fibrinogen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 742, 70-73.
- Koehn, J. A., y Canfield, R. E. (1981). Purification of human fibrinopeptides by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 116(2), 349-356.
- Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., y Doolittle, R. F. (2009). Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 48(18), 3877-3886.
- Ku, S. K., Kim, T. H., Lee, S., Kim, S. M., y Bae, J. S. (2013). Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. *Food and chemical toxicology*, 53, 197-204.
- Ku, S. K., Lee, I. C., y Bae, J. S. (2014). Antithrombotic activities of oroxylin A in vitro and in vivo. *Archives of pharmacal research*, 37(5), 679-686.
- Ku, S. K., Yoon, E. K., Lee, W., Kwon, S., Lee, T., y Bae, J. S. (2016). Antithrombotic and antiplatelet activities of pelargonidin in vivo and in vitro. *Archives of pharmacal research*, 39(3), 398-408.
- La Corte, A. C., Philippou, H., y Ariens, R. A. (2011). Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 83, 75-127.
- Lee, W., y Bae, J. S. (2015). Antithrombotic and antiplatelet activities of orientin in vitro and in vivo. *Journal of Functional Foods*, 17, 388-398.
- Lever, R., Mulloy, B., y Page, C. P. (Eds.). (2012). *Heparin a century of progress* (Vol. 207). Springer Science & Business Media.
- Li, W., Johnson, D. J., Esmon, C. T., y Huntington, J. A. (2004). Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature structural & molecular biology*, 11(9), 857-862.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Liang, A., Thakkar, J. N., Hindle, M., y Desai, U. R. (2012). Dynamic affinity chromatography in the separation of sulfated lignins binding to thrombin. *Journal of Chromatography B*, 908, 45-51.
- Lima, L. M. T., Zingali, R. B., Foguel, D., y Monteiro, R. Q. (2004). New insights into conformational and functional stability of human α -thrombin probed by high hydrostatic pressure. *European journal of biochemistry*, 271(17), 3580-3587.
- Liu, X., Hao, J., Shan, X., Zhang, X., Zhao, X., Li, Q., Wang, X., Cai, C., Li, G., y Yu, G. (2016). Antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates and their depolymerized fragments from two sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, 152, 343-350.
- Lorand, L. (2005). Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(7), 1337-1348.
- Lord, S. T., Strickland, E., y Jayjock, E. (1996). Strategy for recombinant multichain protein synthesis: fibrinogen B β -chain variants as thrombin substrates. *Biochemistry*, 35(7), 2342-2348
- Lyttleton, J. W. (1954). The antithrombin activity of heparin. *Biochemical Journal*, 58(1), 15-23.
- Machovic, R., Regoeczi, E. y Hatton, M. (1980). Altered inactivation of trinitrophenylated thrombin by antithrombin iii in the presence of heparin. *Thrombosis Research*, 17(3), 383-391.
- Majumdar, S., Dutta, S., Das, T., Chattopadhyay, P., y Mukherjee, A. K. (2015). Antiplatelet and antithrombotic activity of a fibrin (ogen) olytic protease from *Bacillus cereus* strain FF01. *International journal of biological macromolecules*, 79, 477-489.
- Mao, S. J., Yates, M. T., Blankenship, D. T., Cardin, A. D., Krstenansky, J. L., Lovenberg, W., y Jackson, R. L. (1987). Rapid purification and revised amino-terminal sequence of hirudin: A specific thrombin inhibitor of the bloodsucking leech. *Analytical biochemistry*, 161(2), 514-518.
- Martinelli, R. A., y Scheraga, H. A. (1979). Assay of bovine fibrinopeptides by high performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 96(1), 246-249.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Martínez-Murillo, C., y Quintana-González, S. (2005). Factores de riesgo para trombosis. *Revista de Hematología*, 6(1), 1-8.

Maya, J.J., y Thomas, S. (2012). *Natural Polymers: Nanocomposites* (Vol. 2). RSC Publishing.

Melo, F. R., Pereira, M. S., Foguel, D., y Mourão, P. A. (2004). Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20824-20835.

Mendes-Silva, W., Assafim, M., Ruta, B., Monteiro, R. Q., Guimarães, J. A., y Zingali, R. B. (2003). Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thrombosis research*, 112(1), 93-98.

Mestechkina, N. M., Shcherbukhin, V. D., Bannikova, G. E., Varlamov, V. P., Drozd, N. N., Tolstenkov, A. S., Makarov, V.A., y Tikhonov, V. E. (2008). Anticoagulant activity of low-molecular-weight sulfated derivatives of galactomannan from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) seeds. *Applied biochemistry and microbiology*, 44(1), 98-103.

Mitchel, R. (2010). Trastornos hemodinámicos, enfermedad tromboembólica y shock. En V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto y J.C. Aster. *Patología estructural y funcional*: (pp. 111-134). Barcelona, España: Elsevier.

Mukherjee, A. K. (2014). A major phospholipase A 2 from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. *Biochimie*, 99, 153-161.

Mukherjee, A. K., y Mackessy, S. P. (2013). Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3476-3488.

Müller, M., Lasarczyk, H., y Burchard, W. (1981). Fibrinogen—fibrin transformation: 2. Influence of temperature, pH and of various enzymes on the intermediate structures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3(1), 19-24.

Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Châabouni, M.K., y Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3), 835-841.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ng, A. S., Lewis, S. D., y Shafer, J. A. (1993). Quantifying thrombin-catalyzed release of fibrinopeptides from fibrinogen using high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*, 222, 341-358.
- Nienaber, J., Gaspar, A. R. M., y Neitz, A. W. H. (1999). Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental parasitology*, 93(2), 82-91.
- Palta, S., Saroa, R., & Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), 515-523.
- Pawlaczyk-Graja, I., Balicki, S., Ziewiecki, R., Matulová, M., Capek, P., y Gancarz, R. (2016). Polyphenolic-polysaccharide conjugates of *Sanguisorba officinalis* L. with anticoagulant activity mediated mainly by heparin cofactor II. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1019-1029.
- Posse, R. S. A., Catay, E. R., Toledo, R. A., y Cabral, M. L. V. (2006). Heparina de bajo peso molecular versus heparina no fraccionada. *Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina*, 155, 12-14.
- Proc, J. L., Kuzyk, M. A., Hardie, D. B., Yang, J., Smith, D. S., Jackson, A. M., Parker, C.E., y Borchers, C. H. (2010). A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *Journal of proteome research*, 9(10), 5422-5437.
- Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J. J., y Kumar, T. K. S. (2009). Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science*, 18(5), 980-993.
- Raskob, G. E., Angchaisuksiri, P., Blanco, A. N., Buller, H., Gallus, A., Hunt, B. J., Hylek, E.M., Kakkar, A., Konstantinides, S.V., McCumber, M., Ozaki, Y., Wendelboe, A., y Weitz, J.I. (2014). Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Thrombosis Research*, 134(5), 931-938.
- Riedel, T., Suttner, J., Brynda, E., Houska, M., Medved, L. y Dyr, E. (2011). Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood Journal*, 117(5), 1700-1706.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., y García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*, 26(2), 147-154.
- Rosenfeld, L. (2012). *Origins of Clinical Chemistry: The Evolution of Protein Analysis*. Elsevier.
- Rossi, E. B., Duboscq, C. L., y Kordich, L. C. (1999). Cofactor II de la heparina (HCII), un inhibidor de trombina cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 59(1), 95-104.
- Roth, M. (1966). Light-scattering techniques for use in biological microchemistry. *Microchemical Journal*, 10(1-4), 433-443.
- Rupin, A., Menecier, P., de Nanteuil, G., Laubie, M., y Verbeuren, T. J. (1995). A screening procedure to evaluate the anticoagulant activity and the kinetic behaviour of direct thrombin inhibitors. *Thrombosis research*, 78(3), 217-225.
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C., y Scilingo, A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204-214.
- Sabbione, A. C., Rinaldi, G., Añón, M. C., y Scilingo, A. A. (2016). Antithrombotic Effects of *Amaranthus hypochondriacus* Proteins in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 19-27.
- Sabbione, A. C., Scilingo, A., y Añón, M. C. (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 171-177.
- Salvi, G., De Los Rios, P., y Vendruscolo, M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(3), 492-499.
- Schwartz, C. P., Uejio, J. S., Duffin, A. M., England, A. H., Kelly, D. N., Prendergast, D., y Saykally, R. J. (2010). Investigation of protein conformation and interactions with

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

salts via X-ray absorption spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14008-14013.

Seegers, W. H. (Ed.). (1967). *Blood clotting enzymology*. Academic Press.

Shulman, S., Katz, S., y Ferry, J. D. (1953). The conversion of fibrinogen to fibrin. *The Journal of general physiology*, 36(6), 759-766.

Soria, C., Soria, J., Abramowitz, C., y Desnoyers, P. (1980). Restrictions in the use of synthetic substrates for the measurement of the antithrombin activity of chemical compounds. *Thrombosis research*, 19(3), 435-440.

Spraggon, G., Everse, S. J., y Doolittle, R. F. (1997). Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature*, 389(6650), 455-462.

Stubbs, M. T., y Bode, W. (1994). Crystal structures of thrombin and thrombin complexes as a framework for antithrombotic drug design. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1(3), 431-452.

Teijón, J. M. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural* (Vol. 1). Editorial Tébar.

Teijón, J. M., López, C. T., y Seguí, B. C. (2001). *Bioquímica estructural conceptos y tests*. Editorial Tébar.

Townsend, R. R., Hilliker, E., Li, Y. T., Laine, R. A., Bell, W. R., y Lee, Y. C. (1982). Carbohydrate structure of human fibrinogen. Use of 300-MHz ¹H-NMR to characterize glycosidase-treated glycopeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 257(16), 9704-9710.

Turgeon, M. L. (2005). *Clinical hematology: theory and procedures*. Lippincott Williams y Wilkins.

Walker, H.K., Hall, W.D., y Hurst, J.W. (3 Ed.) (1990). *Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*. Butterworths.

Wang, M., Wang, Y., Wang, J., Zou, M., Liu, S., Xu, T., Cai, X., Wu, C., Wang, J., y Xu, D. (2009). Construction and characterization of a novel staphylokinase variant with thrombin-inhibitory activity. *Biotechnology letters*, 31(12), 1923-1927.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Weisel, J. W. (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical chemistry*, 112(2), 267-276.
- Weisel, J. W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Advances in protein chemistry*, 70, 247-299.
- Weitz, J. I., Hirsh, J., y Samama, M. M. (2008). New antithrombotic drugs: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *CHEST Journal*, 133(6), 234S-256S.
- Wendelboe, A. M., y Raskob, G. E. (2016). Global Burden of Thrombosis. *Circulation research*, 118(9), 1340-1347.
- Wu, B., Wu, L., Ruan, L., Ge, M., & Chen, D. (2009). Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPCC 480097. *Current microbiology*, 58(5), 522-527.
- Xu, T., Lew-Tabor, A., y Rodriguez-Valle, M. (2016). Effective inhibition of thrombin by Rhipicephalus microplus serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 180-187.
- Yang, W. G., Wang, Z., y Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4), 449-451.
- Zakrzewska, M., Wiedlocha, A., Szlachcic, A., Krowarsch, D., Otlewski, J., y Olsnes, S. (2009). Increased protein stability of FGF1 can compensate for its reduced affinity for heparin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25388-25403.
- Zavyalova, E. G., Protopopova, A. D., Yaminsky, I. V., y Kopylov, A. M. (2012). Kinetic characterization of inhibition of human thrombin with DNA aptamers by turbidimetric assay. *Analytical biochemistry*, 421(1), 234-239.
- Zhang, S. B. (2016). In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food chemistry*, 202, 1-8.
- Zhang, S. B., Wang, Z., y Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(6), 521-527.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zhou, G. Huang, X. y Qu, Y. (2010). The binding effect of aptamers on thrombin. *Biochemical Engineering Journal*, 52(1). 117-122.

Zong, S., Ji, J., Li, J., Yang, Q. H., y Ye, M. (2016). Physicochemical properties and anticoagulant activity of polyphenols derived from *Lachnum singerianum*. *Journal of Food and Drug Analysis*.