

74
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Obtención de Trombina

T E S I S

María Guadalupe Jiménez Santana

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

CAPITULO		Página
I	Justificación del trabajo	1
II	Introducción	3
II.1	Componente vascular	3
II.2	Componente celular	5
II.3	Cascada de coagulación	7
II.4	Sistema de inhibidores o activadores	15
II.5	Componente hemodinámico	16
II.6	Sistema fibrinolítico	17
III	Trombina: características y propiedades	18
III.1	Características fisicoquímicas y bioquímicas	18
III.2	Mecanismo de acción fisiológica	21
III.3	Mecanismo de inactivación fisiológica	22
III.4	Unidades para expresar actividad enzimática	23
IV	Obtención y purificación de la trombina	24
IV.1	Método	25
IV.2	Medición de la actividad inicial	29
IV.2.1	Curva de calibración de tirosina	30
IV.2.2	Cuantificación de fibrinógeno	32

IV.3	Conservación de la trombina	36
IV.4	Calibración de la trombina	40
IV.5	Homogeneidad y estabilidad	48
V	Interpretación de resultados	51
VI	Conclusiones	54
VII	Bibliografía	56

CAPITULO I

JUSTIFICACION

La trombina fue obtenida por primera vez en 1958 por Seegers, Levin y Shepard (27), a partir de plasma bovino. Posteriormente Miller y col. (1) aislaron y purificaron la trombina utilizando como fuente plasma humano.

Desde entonces se han realizado estudios de obtención, purificación y caracterización de la trombina de otras especies, tales como rata, equino y porcino (1).

Dentro del programa del plan de estudios de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Química se emplea la trombina como reactivo en algunas prácticas, por lo cual se considero de interés su obtención, en la cantidad y calidad requeridas para ser utilizadas en las mismas.

Por otro lado debido a la relación existente entre la Facultad de Química y el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", se ofrecía la posibilidad de que el Instituto proporcionara material de partida para este estudio con la ventaja de disponer de un plasma perfectamente controlado para garantizar la ausencia de enfermedades que se transmiten por sangre y sus derivados.

Como objetivo principal de este trabajo se plantea desarrollar un metodo de obtención de trombina a partir de plasma humano que,

además de ser sencillo y rápido, permita obtener un extracto enzimático de actividad y estabilidad suficientes para su empleo en el curso semestral de Laboratorio de Hematología en la Facultad de Química UNAM.

CAPITULO II

INTRODUCCION

Hemostasia:

El mecanismo de hemostasia tiene como función detener la hemorragia en los vasos lesionados o deteriorados, el proceso es rápido y localizado, aunque no afecta la fluidez de la sangre en la circulación. La hemostasia incluye la interacción compleja de diferentes componentes que a continuación se mencionan:

II.1 Componente vascular

II.2 Componente celular

II.3 Componente enzimático

II.4 Sistema de inhibidores o activadores de la coagulación y de la función plaquetaria

II.5 Componente hemodinámico

II.6 Sistema fibrinolítico.

II.1 Componente vascular.

Los vasos sanguíneos son componentes importantes en el mecanismo hemostático. Todo el intercambio metabólico depende de la circulación de la sangre a través de los capilares. La permeabilidad del vaso proporciona el estímulo más importante para la trombosis después del daño vascular; la importancia de estas reacciones de estímulo varían según el tamaño de la lesión. Los capilares una vez dañados sellan directa e inmediatamente con

escasa dependencia de la hemostasia. Por otra parte las rupturas de arteriolas y vénulas son ocluidas rápidamente con una masa de plaquetas fusionadas; las venas que contienen un 70% del volumen sanguíneo pueden romperse ante un traumatismo, su hemostasia depende de la contracción vascular, así como de la activación perivascular e intravascular de los factores hemostáticos.

Asimismo las arterias son más resistentes debido a su mayor espesor en las paredes. Un traumatismo significativo puede originar una hemorragia arterial y el evitarlo constituye la función más difícil de la hemostasia.

El endotelio vascular no dañado funciona como una superficie inerte en las reacciones de coagulación sanguínea y la función plaquetaria, sin embargo la más mínima lesión al endotelio provoca inmediatamente agregación plaquetaria y activa las reacciones de coagulación.

Otra función de la pared vascular se relaciona con la actividad fibrinolítica; el endotelio vascular forma y libera a la circulación activadores del plasminógeno, que tienen importancia fisiológica en la depuración de la fibrina o trombos intravasculares. Esta liberación aumenta marcadamente por la acción de sustancias vasoactivas y por estimulación adrenérgica.

Otra función importante del endotelio es la producción del Factor VIII. Se ha observado que su liberación por el endotelio aumenta por la estimulación adrenérgica y por diversas sustancias vasoactivas como la serotonina y la adrenalina.

II.2 Componente celular.

Las plaquetas funcionan como discos citoplasmáticos con un diámetro promedio de 3 a 4 μ y un volumen de 10 fL, la distribución de tamaño de las plaquetas es muy amplia comparada con las demás células sanguíneas. En el estado inactivo la forma discoide se conserva por un citoesqueleto circular de microtúbulos. Los receptores glucoproteínicos de su membrana median las reacciones superficiales por contacto de viscosidad cambio de forma, adherencia, contracción interna y aglutinación; la activación por contacto de los fosfolípidos de su membrana, también promueve actividad procoagulante y la producción de ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas (éstas inhiben en forma potente la adhesión y agregación plaquetaria). Las plaquetas también contienen proteínas musculares en cantidades importantes como son: actina, miosina, tropomiosina, α -actina, filamina y troponina. La energía para la contracción proviene del metabolismo aerobio de la mitocondria y de la glucólisis anaerobia que utiliza gránulos de glucógeno de reserva.

En las plaquetas existen tres tipos de gránulos de reserva:

Gránulos α

Gránulos o cuerpos densos

Vesículas lisosómicas

Los gránulos α son los más numerosos, contienen proteínas específicas de las plaquetas (factor plaquetario 4, tromboglobulina β , factor de crecimiento) y proteínas que se

encuentran también en el plasma como albúmina, fibrinógeno y los Factores V y VII de la coagulación.

Los gránulos o cuerpos densos contienen ADP de reserva, serotonina, calcio y fosfatos.

Las Vesículas lisosómicas son gránulos de reserva, pero que están en fase de formación.

La liberación del contenido granular almacenado requiere de contracción interna, los productos secretorios facilitan la aglutinación de las plaquetas y conducen a la agregación irreversible de una masa plaquetaria fusionada e impermeable. Las plaquetas son esenciales para la hemostasia normal y realizan cuatro funciones distintas en respuesta al daño vascular:

Conservación de la integridad vascular, mediante la reparación por sellado de defectos menores del endotelio.

Supresión inicial de la hemorragia mediante la formación de tapones plaquetarios primarios.

Estabilización del tapón hemostático por reforzamiento de la actividad procoagulante (factor plaquetario 3) para que la cascada de coagulación se inicie.

Acelera la reparación vascular al estimular la proliferación celular (24)

II.-3 La cascada de coagulación.

El proceso de la coagulación sanguínea es un mecanismo enzimático en cadena que puede ser iniciado por diversas causas y que de superar los mecanismos inhibidores naturales, lleva a la formación de un coágulo de fibrina.

Los factores de la coagulación, bien definidos e identificados, aceptados por el Comité Internacional de Hemostasia y Trombosis (CIHT), son trece y se detallan en la tabla # 1 (29).

TABLA # 1

FACTOR DE LA COAGULACION	masa molecular (Daltones)	forma activa
SISTEMA INTRINSECO		
Factor XII Factor de Hageman	80,000	proteína del suero
Precallcreina Factor de Fletcher	80,000	proteína del suero
Factor de Fitzgerald	120,000	cofactor
Factor XI Precursor de tromboplastina	160,000 (2 dímeros)	proteasa del suero
Factor IX	57,000	proteasa del suero
Factor VIII Factor anti-hemofílico/factor de von Willebrand	$1-2 \times 10^6$	cofactor
SISTEMA EXTRINSECO		
Factor VII Proconvertina	55,000	proteasa del suero
Factor III Factor tisular Tromboplastina	45,000	cofactor
VIA COMUN		
Factor X (factor de Factor Stuart Prower)	59,000	proteasa del suero
Factor V Proacelerina	330,000	cofactor
Factor II Protrombina	70,000	proteasa del suero
Factor I Fibrinógeno	340,000	glucoproteína
Factor XIII Estabilizador de la fibrina	300,000	transglutaminasa

El coágulo se produce dentro y fuera del vaso dañado, el que se forma dentro contribuye a la hemostasia, mientras que el que se forma fuera es de poca importancia para detener la hemorragia porque no contraresta la presión de la corriente sanguínea. El coágulo interior no requiere de humores tisulares, es generado a partir de la activación del Factor XII y XI, colágena u otra sustancia cargada negativamente. Una vez activados por estos compuestos y la presencia del calcio, se activa el Factor IX, que a su vez interactúa con el Factor VIII y un fosfolípido (Factor plaquetario 3), formando un complejo que activa el factor X, y éste a su vez al combinarse con el factor V y el calcio, formará finalmente el activador intrínseco de la protrombina o tromboplastina plasmática.

El coágulo formado fuera del vaso (vía extrínseca), se inicia por la activación del Factor VII, por acción de la tromboplastina tisular una vez en presencia de calcio actuará sobre el Factor X, siguiendo un camino similar al de la vía intrínseca, para formar el factor extrínseco de la protrombina o tromboplastina tisular.

La vía común de la coagulación comprende la activación de la protrombina, ésta es activada por ambas vías, transformándose a trombina mediante reacciones específicas. Se requieren iones calcio, pues en ausencia de estos dos activadores pierde su

actividad. La molécula de protrombina se disocia para formar trombina, esta última constituye una enzima proteolítica.

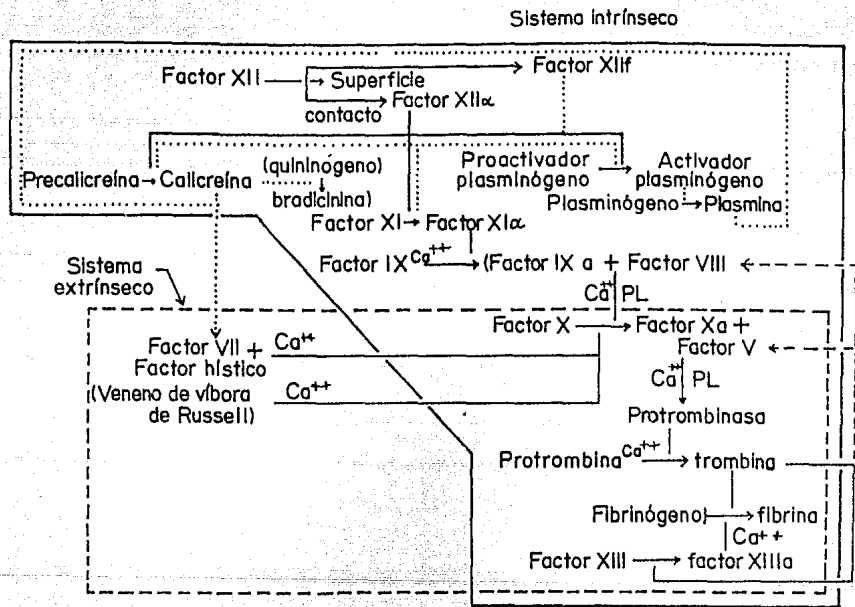
Son tres las acciones más importantes de la trombina, que contribuyen a su efecto catalítico:

Liberación del Factor plaquetario 3

Activación del factor VIII

Conversión del Factor V en una forma más activa.

El mecanismo de coagulación se representa en el esquema # 1.



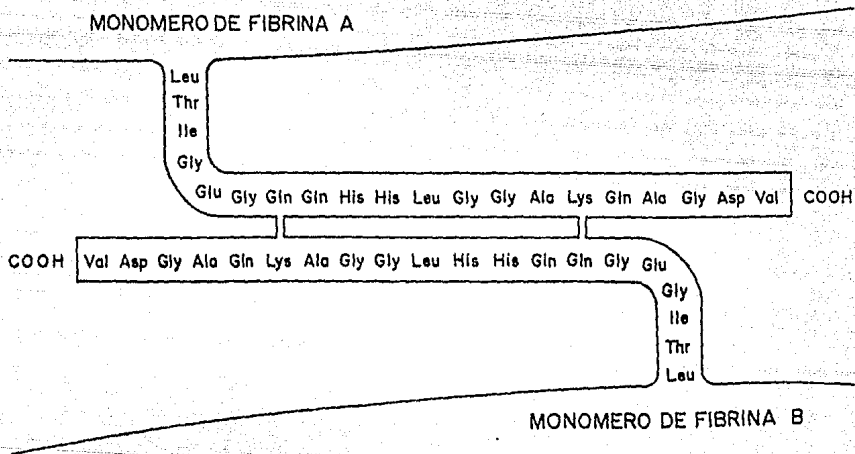
ESQUEMA # 1.
MECANISMO DE CASCADA EN LA COAGULACION
DE LA SANGRE (21).

El fibrinógeno es una glucoproteína, que juega un importante papel en el mecanismo de la coagulación, tiene una masa molecular de 340,000. Es una estructura apareada de tres cadenas homólogas $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, y γ , respectivamente. La secuencia de aminoácidos ya ha sido resuelta (30).

Se ha propuesto el ordenamiento de sus enlaces disulfuro por medio de tratamientos con reactivos que desdoblan los enlaces disulfuro y separan las cadenas peptídicas. Las cadenas proteicas poseen un extremo con un grupo amino (NH_2) y otro con un grupo carboxilo (COOH). Al determinar los aminoácidos aminoterminales de las cadenas de fibrinógeno se identificaron tres distintos existiendo dos copias de cada uno de ellos en la molécula, de alanina (cadena α), de piroglutámico (cadena β) y de tirosina (cadena γ).

La trombina sólo remueve alrededor del 3% de la masa total de fibrinógeno, primero por liberación de dos péptidos A y después de dos péptidos B, formando monómeros de fibrina, que son capaces de polimerizar sin acción enzimática, pasando de la fase líquida a la sólida.

El coágulo de fibrina se estabiliza por entrecruzamiento de dos regiones antiparalelas, para ello se establecen enlaces covalentes recíprocos entre dos pares lisina- glutamina, como se observa en el esquema # 2 (30).



ESQUEMA # 2
 ESTABILIZACION DEL COAGULO DE FIBRINA
 POR ENTRECruzAMIENTO DE DOS REGIONES
 ANTIPARALELAS (30).

La molécula de fibrinógeno alterada resultante conocida como monómero de fibrina , posee una carga negativa que permite que estas moléculas se polimericen mediante enlaces de hidrógeno, para formar cordones de fibrina. El Factor XIII activado le confiere una mayor estabilidad al coágulo de fibrina, pues cataliza el entrecruzamiento mutuo de dos grupos amino de una molécula, con los grupos carboxilo de otra (17).

II.4 Inhibidores y activadores de la coagulación

En el plasma normal existen inhibidores de la coagulación entre ellos se cuenta: la antitrombina III, la α_1 -antitripsina, la α_2 -macroglobulina y la α_2 -antiplasmina. Estos inhibidores actúan fundamentalmente para controlar los procesos hemostáticos, que se producen como fenómenos localizados, por ejemplo, por la acumulación de vesículas fosfolipídicas de la membrana plaquetaria en un sitio de agregación plaquetaria.

Los anticoagulantes circulantes también pueden encontrarse de manera anormal y se presentan como defectos hemostáticos adquiridos. Por lo general son inmunoglobulinas y pueden detectarse en las pruebas globales, como el tiempo de tromboplastina parcial, donde la prolongación no se corrige por la mezcla de 1:1 con plasma del paciente y un combinado de plasmas normales. Los inhibidores pueden estar dirigidos contra un factor específico de la coagulación o tener un mecanismo menos definido, como el que se observa en el lupus eritematoso.

Existen inhibidores del factor VIII, estos pueden presentarse de manera espontánea en ancianos, junto con afecciones inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide; también se encuentran en algunos pacientes con hemofilia A, después de la exposición al factor VIII. En las transfusiones se han descrito anticuerpos contra la fracción de von Willebrand del complejo Factor VIII/vWF. También se han descrito inhibidores de los Factores V, VII, XIII, o bien en procesos inmunitarios postparto (29).

II.5 Componente hemodinámico

La velocidad con que circula la sangre , a partir de su salida del ventrículo izquierdo, misma que disminuye conforme se va acercando a la red capilar, está condicionada principalmente por tres factores:

Energía de contracción ventricular

Elasticidad de la pared vascular

Viscosidad de la sangre

La combinación de estas tres fuerzas permite el movimiento continuo del flujo sanguíneo, ésto evita entre otras cosas la activación plaquetaria y la activación intrínseca del Factor de Hageman. La disminución de la velocidad de la sangre y su casi estancamiento en la circulación capilar favorece esa activación y por lo tanto la coagulación intravascular.

II.6 Sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico elimina los depósitos indeseables de fibrina para restablecer el flujo de los vasos ocluidos por un trombo, o para facilitar el proceso de curación que sigue a la inflamación y el daño. Es un sistema enzimático de componentes múltiples, constituido por un zimógeno circulante, activadores, cofactores e inhibidores(19).

La principal enzima es la plasmina, que circula como plasminógeno y más tarde es activada mediante proteólisis. La activación del plasminógeno puede producirse por tres vías distintas:

Via intrínseca, en la cual todos los componentes están presentes en forma de precursores.

Via extrínseca

Via exógena en la que algunas sustancias activantes como la estreptocinasa, son transfundidas para fines terapéuticos.

Una vez que la plasmina es formada se convierte en una proteasa, con una especificidad mucho mayor que la trombina, cuando la hemostasia se ha restablecido la plasmina se inactiva de inmediato por inhibidores muy potentes, como la α -2-antiplasmina y la α -2- macroglobulina.

CAPITULO III

TROMBINA CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES

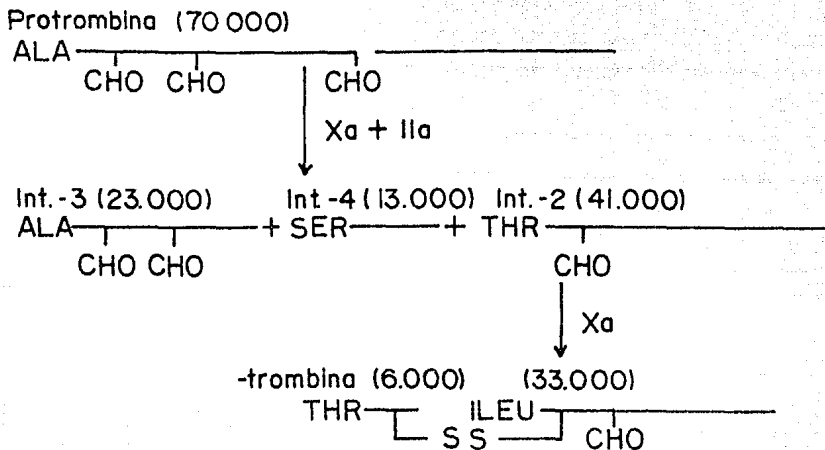
III.1 características físicas y bioquímicas

La trombina se encuentra dentro de la familia de las proteasas de serina, debido a la presencia de serina en su sitio catalítico, su clasificación es E.C.; 3.4.21.5. Por el tipo de reacción que cataliza se considera una hidrolasa. Este grupo de enzimas catalizan la ruptura de las uniones C-O, C-N, C-C, con adición de agua como se esquematiza a continuación (20), (27).



Su masa molecular relativa se considera de 39,000 D. Tiene una constante de difusión de $8.76 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y una S de $3.76 \times 10^{-3} \text{ s}$ (coeficiente de sedimentación estándar. (21), (35).

El precursor de la trombina es la protrombina; ésta se compone de una sola cadena polipeptídica que posteriormente es activada a trombina, una molécula de dos cadenas a través de una serie de intermediarios, como se observa en la siguiente representación esquemática (21). Figura # 3.



ESQUEMA # 3
 REPRESENTACION DE LA ACTIVACION DE LA
 PROTROMBINA, LA CUAL SE ESCINDE PARA
 FORMAR LA TROMBINA, UNA MOLECULA DE DOS
 CAENAS. (30).

Las masas moleculares de la protrombina, los intermediarios (INT) y las dos cadenas de la trombina, figuran entre paréntesis. CHO designa hidrato de carbono. ALA, SER, THR e ILEU, designan grupos terminales amino-libres. Cuando la protrombina es activada por el factor Xa, se forma rápidamente trombina (IIa). La protrombina reacciona con el factor Xa y la trombina (IIa), para dar intermediarios 3, intermedio 4 e intermedio 2. Después reacciona un enlace peptídico interno del intermedio 2, para dar una molécula de dos cadenas α -trombina.

Se ha aislado trombina de diferentes especies, tales como bovina, porcina y equina, encontrándose que dentro de cada especie hay diferentes variedades. La porción relativa de estas variedades en una preparación dada no altera significativamente su actividad enzimática. Estudios realizados por cromatografía de intercambio iónico, han revelado las siguientes variedades: α -trombina, β -trombina. Esta nomenclatura se basa en el orden de elución en una columna de sulfopropil-sephadex. Por ejemplo la β -trombina eluye más rápido que la α -trombina.

La estructura de la trombina consiste en dos cadenas conectadas por puentes disulfuro, la treonina y la isoleucina son los aminoácidos N-terminales. Otros estudios realizados con diisopropilfosfofluoridato han revelado parte del sitio catalítico de la trombina el cual tiene una secuencia de GLY-ASP-SER-GLY-GLU-ALA, similar a la de la familia de las proteasas de serina (1), (2), (3), (35).

II.2 Mecanismo de acción de la trombina.

La trombina actúa sobre el fibrinógeno, su principal sustrato, aunque también actúa sobre otros sustratos pequeños como ésteres y amidas. Actúa sobre el Factor XIII, V y VIII y causa agregación plaquetaria. La trombina hidroliza directamente 4 de unos 300 enlaces peptídicos de arginil-peptido y lisil peptido en el fibrinógeno. El coágulo de fibrina se estabiliza por entrecruzamiento de dos regiones antiparalelas de las cadenas γ , para ello se establecen enlaces covalentes recíprocos entre dos pares lisina-glutamina (30), tal como se observa en el siguiente esquema. figura # 4.

II.3 Mecanismo de inactivación fisiológica.

El cuerpo humano tiene mecanismos para evitar la formación de trombos, una vez que la coagulación se ha iniciado, ya que se produce la activación de enzimas proteolíticas que activan los factores de la coagulación; existen inhibidores circulantes de las proteasas y los más importantes que inactivan a la trombina se enumeran a continuación:

α -2- macroglobulina.- Contiene dos conjuntos de monómeros enlazados por puentes disulfuro, compete con los sustratos de algunas proteasas y es depurada rápidamente del plasma (21), (29).

La α -1-antitripsina.- Es muy específica, su acción principal es la inhibición de las proteasas, que intervienen en las reacciones de inflamación (29).

La antitrombina III.- Por sí misma puede inactivar progresivamente a todas las proteasas. La heparina en contacto con el endotelio dañado acelera notablemente la reacción, produciendo efecto anticoagulante inmediato y potente. (29).

La antiplasmina.- Circula en concentraciones muy bajas e inactiva a la plasmina, cuando la fibrinólisis se desencadena.

La trombina se absorbe en el coágulo, el cual se considera un importante mecanismo de inactivación fisiológica.

III.4 Unidades para expresar la actividad enzimática.

En 1971 la C.G.P.M. (Conférence Générale des Poids et Mesures), introdujo una séptima unidad básica, el mol definida como unidad para la cantidad de sustancia.

La unidad SI (Sistema Internacional) de actividad enzimática es el Katal, se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un mol de sustrato por segundo en un sistema analítico (20), (31).

Al describir la actividad enzimática se deben tener en cuenta tres condiciones. La cantidad de sustrato convertida o producto formado en mol, el tiempo de reacción en segundos y la cantidad de enzima en gramos de proteína (31).

En el caso específico de la trombina, existe una unidad especial, definida por el National Institute of Health (N. I. H.):

"Una unidad de trombina NIH se define como aquella, que en un volumen de 23.5 ml de solución de fibrinógeno al 0.36%, produce 0.37 μ moles de N-terminal glicina, en 20 minutos, a un pH de 9.0, una fuerza iónica de 0.2 y una temperatura de 25°C" (35).

CAPITULO IV.

OBTENCIÓN Y PURIFICACION DE LA TROMBINA

Una vez que se seleccione la fuente de la proteína que interesa, se debe elegir la metodología apropiada para separarla. Durante la operación de liberación y en la fase de fraccionamiento subsiguientes deben controlarse los siguientes parámetros:

Temperatura

pH

concentración proteica

Las proteínas son moléculas frágiles, por lo que su exposición a ciertas temperaturas puede desnaturalizarlas, en consecuencia, la mayoría de los procedimientos de purificación proteica deben realizarse a temperaturas próximas al punto de congelación del disolvente utilizado. Si la proteína fuera estable al calor, un tratamiento térmico breve serviría para precipitar parte del material contaminante, lo cual equivaldría a una purificación parcial. Las proteínas también son sensibles a concentraciones variadas de iones, por lo cual la purificación se realice en presencia de soluciones amortiguadoras. También conviene mantener la concentración proteica tan alta como sea posible, puesto que muchas de las proteínas tienden a desnaturalizarse en soluciones diluidas. (20), (21).

Se conocen varios métodos de purificación de las proteínas como a continuación se mencionan; casi siempre se trabaja combinando más de un método:

Cambio de pH

Desnaturalización por calor

Fraccionamiento con disolventes
orgánicos

Precipitación con sales

Cromatografía

Electroforesis

Cristalización

IV.1 METODO

Para la obtención y purificación de la trombina, se tomó como referencia el método utilizado por Kordich, el cual fue modificado en algunos pasos. Este método se fundamenta en dos propiedades de las proteínas (28).

Cambio de pH, puesto que las proteínas presentan una solubilidad mínima cerca del punto isoelectrico, al variar la concentración de H^+ , precipita la proteína deseada, mientras que las demás permanecen en solución.

Solubilidad en disolventes orgánicos, en este caso se utilizó acetona como disolvente para precipitar la trombina. (20), (23).

MATERIAL BIOLÓGICO.

El plasma humano utilizado en este trabajo fue proporcionado por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Tomando especial cuidado en el transporte del plasma, del hospital a la Facultad de Química, en una caja de unicel, con una bolsa de solución refrigerante que proporcione una atmósfera fría, al llegar a la Facultad se procede a guardarlo en el refrigerador, para empezar a trabajar inmediatamente

REACTIVOS

Agua destilada

Acido acético 2%

Solución salina 0.85%

Carbonato de sodio 2%

Cloruro de calcio 0.25 mol/L

Acetona R.A.

Bloques de hielo seco

Hielo molido. (lavado con HCl y agua destilada)

Trombina liofilizada PARKE-DAVIS de 5000 unidades
NIH/ml

Citrato de sodio 3.8%

Hidróxido de sodio 10%

Carbonato de sodio 20%

Reactivo de fenol Folin-Ciocalteu

Tromboplastina Si-Lab

Cloruro de calcio 0.02 mol/L

Solución estándar de tirosina (1 mg de tirosina =
11.7 mg de fibrinógeno)

Albumina 25% Ortho

Manitol R.A.

MATERIAL

Probeta de 100 ml

Matraz aforado de 1000 ml

Vaso de precipitado de 2000 ml

Matraz aforado de 100 ml

Tubos de ensaye de plástico

Tubos de centrifuga de 15 ml

Pipetas serológicas de 0.1, 0.2, 1.0, 5.0, y 10 ml

Pipetas Pasteur

Tubos de ensaye de 13 x 100 y de 16 x 150 mm.

Piseta

Frascos de vidrio de 3 ml con tapón de hule y de
rosca

Hielera de unicel de 40 x 30 cm

Desecador

Gasa

EQUIPO

Potenciómetro

Centrifuga clínica refrigerada

Fibrómetro BBL

Espectrofotómetro COLEMAN JrII/620

baño de incubación

Liofilizadora LAVCONCO

METODO

Sobre un baño de hielo colocar un matraz aforado de 1000 ml, agregar 100 ml de plasma fresco humano, aforar a 1000 ml con agua destilada, transferir el contenido del matraz a un vaso de precipitado de 2000 ml y ajustar el pH a 5.3 con ácido acético al 2%, centrifugar toda la mezcla a 2000 rpm durante 10 minutos y desechar el sobrenadante. Redisolver el precipitado con 25.0 ml de solución salina 0.85% y ajustar el pH a 7.0 con carbonato de sodio al 2%, agitar suavemente y dejar reposar sobre el baño de hielo; agregar posteriormente solución de cloruro de calcio 0.25 mol/L. Dejar reposar a temperatura ambiente dos horas hasta la formación del coágulo de fibrina. Retirar el coágulo con aplicadores de madera exprimiendo muy bien y dejar reposar por dos horas a temperatura ambiente. La solución corresponde a la trombina.

Añadir un volumen de acetona R.A. por cada volumen de solución de trombina y centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos para separar el precipitado y desechar el sobrenadante, resuspender el precipitado en 25 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85%. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos y descartar el precipitado. La solución es la trombina parcialmente purificada.
(28), (34).

IV.2 MEDICION DE LA ACTIVIDAD INICIAL

En este paso se determinó la actividad de la trombina midiendo el tiempo de coagulación (T.T.), utilizando un plasma cuya concentración de fibrinógeno se conoce, de la siguiente manera:

Se ajusta la temperatura del fibrómetro a 37°C y en la copa de reacción del fibrómetro se colocan 0.2 ml de plasma; se incuba por dos minutos, se agregan 0.2 ml de solución de trombina y se mide el tiempo de coagulación (T.T.). El resultado de esta determinación fue el siguiente:

2.- Actividad (tiempo de trombina) inicial

Número de determinaciones	Tiempo de coagulación (T.T.) s.
1	3.4
2	3.6
3	3.9
4	3.5
5	4.1
6	4.3
7	4.3
8	4.2
9	3.9
10	2.9

media = 3.81

D.E. = 0.455

C.V. 11.94%

IV.2.1 CURVA DE CALIBRACION DE TIROSINA.

Se prepara una solución estándar de tirosina, pesando exactamente 20 mg de tirosina R.A., a la cual se le adiciona aproximadamente 4 ml de ácido clorhídrico 0.1 N. Una vez disuelto se afora a 100 ml con agua destilada en un matraz volumétrico. Esta solución contiene 0.2 mg de tirosina/ml que equivalen a 234 mg de fibrinógeno/ml y con ella se prepara una curva de calibración, como se explica en el siguiente cuadro:

3.- CURVA DE CALIBRACION DE TIROSINA

	Adicionar en tubos separados (ml)				blanco (ml)
Estándar de tirosina (20 mg/dL)	0.2	0.5	1.0	1.5	----
Hidróxido de sodio 10%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agua destilada	6.8	6.5	6.0	5.5	7.0
Mezclar después de la adición de cada reactivo. Colocar en baño de agua hirviendo 10 minutos y enfriar.					
Carbonato de sodio 20%	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Reactivo de Fenol Folin- Ciocalteau	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Homogenizar y reposar durante 10 minutos, diluir cada tubo con agua destilada 1:3. Leer la extinción a 650 nm. Contra blanco de reactivos.

4. - RESULTADOS

mg de tirosina	E _{650 nm}	Conc. de fibrinógeno mg/dL
0.04	0.041	93.6
0.10	0.125	234.0
0.20	0.208	458.0
0.30	0.319	702.0

IV.2.2. CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO.

La sangre se obtiene por punción venosa, utilizando citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante en una proporción de 1:10 anticoagulante- sangre y se centrifuga a 1500 rpm. durante 5 minutos para separar el plasma, se mezclan varios plasmas de individuos normales. La determinación se hace utilizando un blanco de reactivos..

5. - CUANTIFICACION DE FIBRINOGENO

	muestra de plasma	blanco de reactivos
Vidrio molido (ml) aprox	0.50	0.50
Solución salina (ml)	10.0	10.5
tromboplastina (ml) Si-Lab	0.20	0.20
cloruro de calcio 0.02 mol/L	1.50	1.50
plasma (ml)	0.50	---

Agitar por inversión, incubar a 37°C , durante 10 minutos. Mezclar y centrifugar 10 minutos a 2500 rpm, descartando el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. Repetir el lavado con solución salina dos veces y descartar el sobrenadante. El siguiente paso es la disolución del coágulo de fibrina.

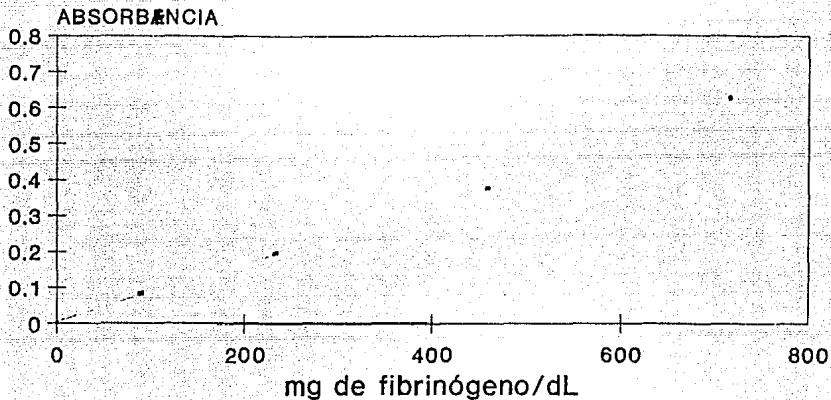
6. - DISOLUCION DEL COAGULO DE FIBRINA

Adicionar a cada tubo	problema	blanco
Hidróxido de sodio 10% (ml)	1.0	1.0
Colocar los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos, enfriar en hielo. Adicionar:		
Agua destilada (ml)	7.0	7.0
Carbonato de sodio 20% (ml)	3.0	3.0
Reactivo de Fenol (Folin-Ciocalteu) (ml)	1.0	1.0
Mezclar después de la adición de cada reactivo, reposar a temperatura ambiente 10 minutos. Centrifugar 5 minutos a 2000 rpm. Transferir a cada tubo de 13 x 100 los siguientes volúmenes:		
Sobrenadante de cada tubo	1.0	1.0
Agua destilada	2.0	2.0
Leer la extinción del problema contra blanco de reactivos a 650 _{nm} . Interpolar en la curva de tirosina.		

7. - RESULTADO

Extinción 650 _{nm}	Concentración de fibrinógeno mg/dL
0.131	299.06
0.128	292.21
Promedio \bar{X}	295.63

CURVA ESTANDAR FIBRINOGENO



• GRAFICA # 1

METODO DE RATNOFF

IV.3 CONSERVACION DE LA TROMBINA

El proceso mediante el cual un sólido puede pasar en forma directa al estado de vapor, sin pasar por el líquido, se conoce como sublimación.

Para que una sustancia sublime debe estar en estado sólido. El cambio de fase de sólido a vapor requiere energía que se adquiere por absorción de calor del medio ambiente. La cantidad de calor requerida para convertir un mol de sólido directamente en vapor, es conocido como calor de sublimación ΔH , y está expresada en unidades de cal/mol (37).

En lo anterior se fundamenta la liofilización, que es el proceso más adecuado para conservar sustancias termolábiles por un tiempo relativamente largo (3), (26), (34).

Al congelar disminuye la velocidad de reacción de los procesos que deterioran el producto, por disminución de la energía cinética de las moléculas (3), (37).

Tomando en cuenta lo anterior, se optó por liofilizar la trombina, considerando éste el mejor método para su conservación.

METODO

La trombina obtenida en el capitulo IV, se fracciona en alícuotas de 1 ml en los frascos de 3 ml. Cada frasco se tapa con el tapón de hule.

Los bloques de hielo se fragmentan y se ponen en la hielera. Los frascos con solución de trombina se sumergen en el hielo seco, se adiciona acetona al hielo seco, para formar una mezcla frigorífica, la cual disminuirá la temperatura a -15°C aproximadamente, se cierra herméticamente la hielera y se deja durante toda la noche.

Al día siguiente se calibra la liofilizadora de tal manera que la temperatura no exceda los -50°C y la presión los 0.0001 Torr. Inmediatamente se procede a destapar los frascos y a colocarlos en la cámara de desecación de tres en tres, esto se hace rápidamente para evitar que los frascos se descongelen. Se revisa la temperatura y la presión cada vez que se coloquen los frascos en las cámaras.

La liofilización se considera terminada, cuando en los frascos se observa un polvo blanco adherido a las paredes, es decir cuando el agua se sublima completamente; el proceso dura aproximadamente 5 a 7 horas.

Durante el primer intento de liofilizar la trombina se descongeló a las dos horas de haber iniciado el proceso, por lo cual fue necesario adicionar un "soporte", para aumentar la cantidad de sólidos presentes, que permitiera una mejor liofilización. Como agentes estabilizadores se probaron: manitol

R. A. / albúmina humana al 25% (1), (2).

Se inició un nuevo intento de liofilización y a las 6 horas se observó un polvo blanco. Se apagó la bomba de vacío hasta estabilizar la presión, se sacaron los frascos de la cámara, se colocaron en el desecador, se taparon con el tapón de hule y de rosca y se etiquetaron con la fecha.

La cantidad de soporte necesaria para obtener el liofilizado con las características esperadas de actividad y aspecto se determinaron de la siguiente manera:

8. - ADICION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTABILIZADORES

frasco con 1 ml de trombina	Agente estabilizador manitol g/frasco	Aspecto del liofilizado
1 y 2	0.1	No se liofilizó
3 y 4	0.2	No se liofilizó
5 y 6	0.3	No se liofilizó
7 y 8	0.4	Pastilla
9 y 10	0.5	Pastilla
Albúmina Humana al 25% ml/frasco		
11 y 12	0.1	No se liofilizó
13 y 14	0.4	No se liofilizó
15 y 16	0.5	Pastilla
17 y 18	0.8	Pastilla
19 y 20	1.0	Pastilla

Para seleccionar el agente estabilizador más adecuado, se determinó el tiempo de coagulación (T.T) de los frascos liofilizados, con la técnica descrita en la sección IV.2. después

de hidratar cada frasco con 1 ml de solución salina.

9.- EFECTO PROTECTOR DEL ESTABILIZADOR

Liofilizado con albúmina 25% (ml)	Aspecto de la trombina reconstituida	Tiempo de coagulación
0.5	claro	4.4, 4.7, 4.0, 4.4, 4.1
0.8	claro	4.9, 4.2, 4.9, 4.9, 4.8
1.0	claro	3.9, 3.8, 4.4, 4.6, 4.4
Manitol R. A. (g)		
0.4	precipitado	mayor de 3 minutos
0.5	precipitado	mayor de 3 minutos

Se consideró como mejor agente de estabilización la albúmina al 25%, en proporción de 0.5 ml/frasco, para la liofilización de la trombina obtenida en este trabajo.

IV.4 CALIBRACION DE LA TROMBINA

Para determinar la actividad de una enzima en especímenes o líquidos biológicos, se mide la velocidad de reacción catalizada por la enzima sobre un sustrato específico. En el caso particular de la trombina obtenida experimentalmente, por no disponer de una solución de fibrinógeno de alta pureza, para determinar directamente la actividad en unidades NIH se optó por calibrarla frente a una solución de trombina comercial de origen humano, de alta pureza (5000 unidades NIH/ml).

Esta calibración se hizo a partir de un lote de 25 frascos, construyendo una curva de actividad de unidades NIH VS $1/T$ (recíproco del tiempo).

La calibración se hizo cada 30 días, durante 4 meses

METODO

A partir de una solución de trombina comercial PARKE-DAVIS de 5000 unidades NIH/ml, se hacen las siguientes diluciones con solución salina.

1 ml + 9 ml de solución salina (500 U. NIH)

1 ml de la solución anterior + 9 ml de solución salina (50 U. NIH).

De la última dilución se hacen las siguientes diluciones y a cada una de ellas se les determina el tiempo de coagulación T. T.

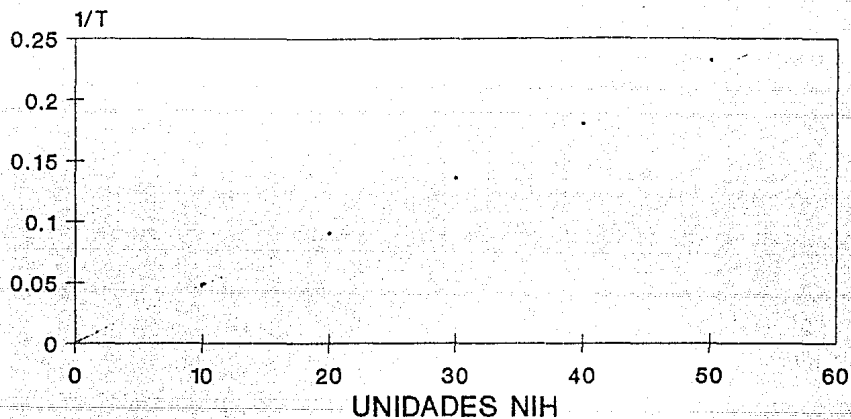
10. - CALIBRACION DE LA TROMBINA

Solución de trombina PARKE- DAVIS 50 U. NIH (ml)	solución salina (ml)	Unidades NIH/ml aprox.
0.20	0.80	10.0
0.40	0.60	20.0
0.60	0.40	30.0
0.80	0.20	40.0
1.00	0.00	50.0

11. - CURVAS DE CALIBRACION DE TROMBINA FARKE-DAVIS

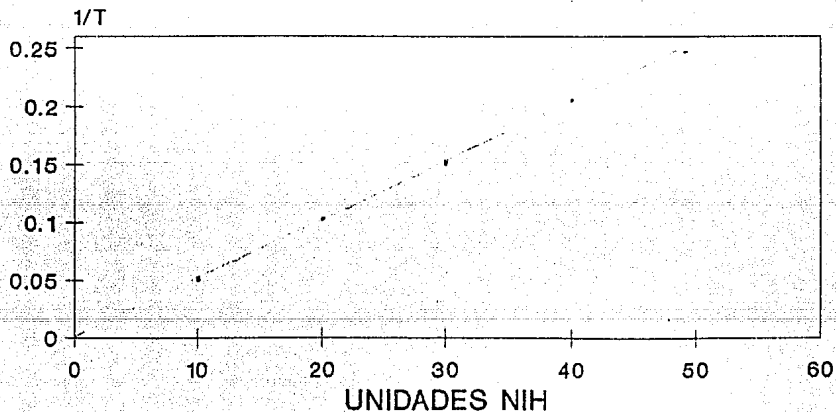
U N I H de trombina PARKE-DAVIS	Dias							
	30		60		90		120	
	T.T. (s)	1/T	T.T. (s)	1/T	T.T. (s)	1/T.	T.T. (s)	1/T
10	22.20	0.045	20.00	0.050	22.00	0.045	20.10	0.49
20	11.10	0.090	9.75	0.102	10.30	0.097	10.30	0.097
30	7.40	0.135	6.66	0.150	7.10	0.140	6.91	0.144
40	5.55	0.180	4.87	0.205	5.00	0.20	4.71	0.212
50	4.31	0.232	4.16	0.240	4.30	0.23	4.21	0.237
Trombina experimental								
	4.8		5.3		5.0		4.9	
	4.9		5.1		3.9		4.9	
	4.9		5.7		4.4		5.2	
	5.0		5.4		4.4		5.0	
Promedio	4.9		5.3		4.4		5.0	
Unidades NIH	39.3		34.3		46.4		42.0	

CURVA ESTANDAR DE TROMBINA 30 DIAS



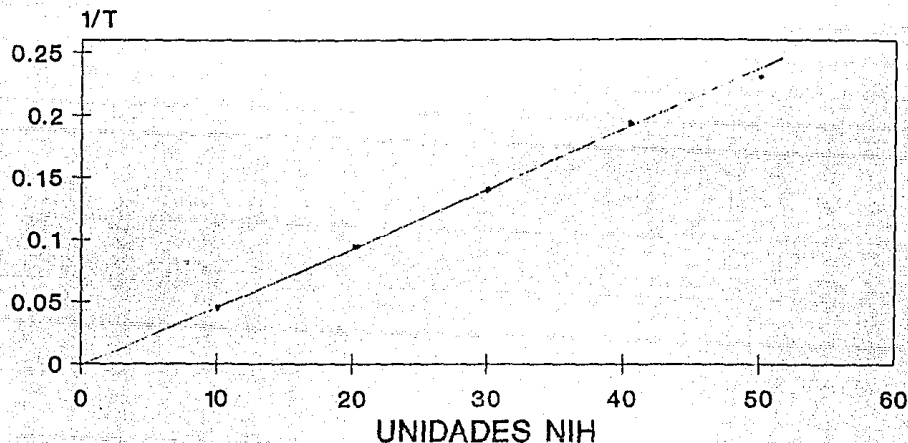
GRAFICA # 2

CURVA ESTANDAR DE TROMBINA 60 DIAS



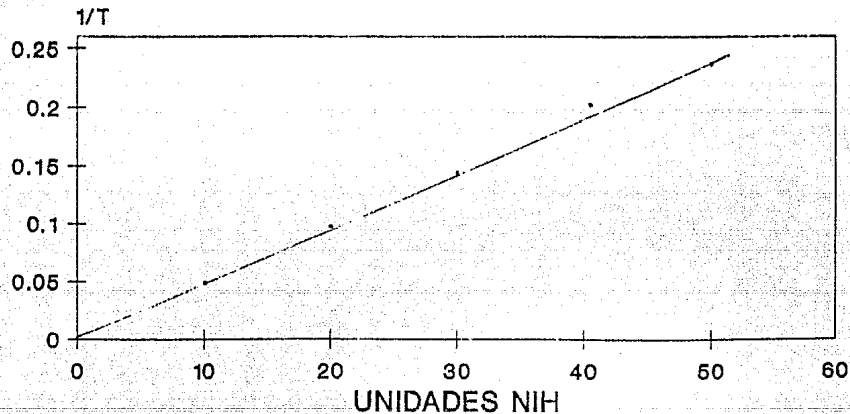
· GRAFICA # 3

CURVA ESTANDAR DE TROMBINA 90 DIAS



· GRAFICA # 4

CURVA ESTANDAR DE TROMBINA 120 DIAS



GRAFICA # 5

IV.5 HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD DE LA TROMBINA

Una vez calibrada la trombina obtenida experimentalmente, frente a una trombina comercial, se calculó la dilución necesaria, para ajustarla a que diera un tiempo de coagulación (T.T.) entre 18-22 segundos, que es el tiempo que se consideró como referencia (29), la dilución encontrada fue 1:8.

Del lote total de trombina liofilizada (25 frascos, conservados en refrigeración entre 2-8 °C), se tomaron muestras al azar de 5 frascos cada vez, para ser analizados a los 30, 60, 90 y 120 días. A cada frasco se le hicieron 5 determinaciones.

12.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (T.T.) a los 30 días.

Frasco	Actividad enzimática (T.T.) (s)					promedio
1	19.5	20.0	19.4	19.1	18.3	19.38
2	19.8	19.5	19.0	19.2	19.1	19.32
3	19.7	19.3	19.1	19.4	19.9	19.48
4	20.0	18.0	19.4	19.7	18.1	19.04
5	20.1	20.3	19.1	20.3	19.8	19.90
promedio	19.8	19.42	19.20	19.54	19.16	19.42

Media = 19.404 Varianza = 0.5869 D.E. 0.6093 C.V. = 3.14 %

13.- ACTIVIDAD ENZIMATICA (T.T.) a los 60 días

Frasco	Actividad enzimática (T.T.) (s)					promedio
1	19.5	20.3	20.1	19.7	18.1	19.54
2	20.1	18.9	21.3	19.8	19.1	19.84
3	19.4	18.7	19.1	19.3	19.7	19.24
4	19.2	17.8	19.9	19.8	19.4	19.22
5	20.3	18.5	19.4	22.4	19.8	20.08
promedio	19.7	18.84	19.96	20.02	19.2	19.58

Media = 19.58 varianza = 0.8880 D.E. = 0.9423 C.V. = 4.87%

14.- ACTIVIDAD ENZIMATICA a los 90 días (T.T.)

Frasco	Actividad enzimática (T.T.) (s)					promedio
1	18.9	18.9	19.5	19.4	19.7	19.28
2	18.0	18.1	20.3	18.8	19.9	19.02
3	18.7	18.7	18.6	18.5	19.7	18.54
4	19.9	20.1	21.0	19.3	19.0	19.86
5	19.3	21.1	20.3	19.0	19.5	19.84
promedio	18.96	19.30	19.94	19.00	19.56	19.36

Media = 19.36 D.E. = 0.8434 varianza = 0.714 C.V. = 4.49 %

15.- ACTIVIDAD ENZIMATICA (T.T.) a los 120 días.

Frasco	Actividad enzimática (T.T.) (s)					promedio
1	19.1	21.0	19.0	19.7	19.3	19.62
2	20.1	20.0	19.4	19.5	19.8	19.76
3	21.3	23.1	19.7	19.7	19.7	20.70
4	21.0	20.0	19.5	19.4	19.1	19.80
5	22.3	19.7	23.3	19.7	20.0	21.00
promedio	20.76	20.70	20.18	19.60	19.58	20.17

Media = 20.17 D.E. = 1.18 Varianza = 1.401 C.V. = 4.18 %

CAPITULO V.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

El método utilizado en este trabajo para la obtención de la trombina, fue la precipitación de la trombina en su punto isoeléctrico, su conversión a trombina y su purificación parcial con acetona. Esta fue la base de los estudios realizados por Miller (1), Tsvetkov (3) y L. Kordich (28), quienes además emplearon la cromatografía de intercambio iónico y de afinidad para la purificación de la enzima

Partiendo de 100 ml de plasma fue posible obtener un extracto de 25 ml en solución salina, con una actividad enzimática medida como tiempo de trombina (T.T.) de 3.81 ± 0.045 segundos y un coeficiente de variación de 11.9%. Este valor bastante elevado podría deberse a las impurezas presentes, ya que el extracto crudo se obtuvo por un solo paso de purificación, o también a la alta concentración del extracto, ya que la actividad medida (T.T.) , se realizó directamente sin diluir para obtener un tiempo de trombina equivalente al valor de referencia (21).

La medición de la actividad en el extracto sirvió como único criterio para pasar a la fase de conservación (liofilizado).

El método de liofilización empleado para conservar la trombina no tuvo éxito cuando se trató de liofilizar la trombina disuelta en solución salina comprobándose así la necesidad de utilizar un

soporte (37). Se probaron dos estabilizadores albúmina humana al 25% y manitol R.A. , como se observa en el cuadro # 7. El manitol si funcionó para formar una pastilla, pero al rehidratarlo con solución salina isotónica, no se solubilizó ni mostró actividad enzimática asumiéndose inactivación de la trombina. El segundo soporte probado, la albúmina humana al 25%, demostró ser un buen soporte en las tres concentraciones probadas seleccionándose el de 0.5 ml\frasco.

Para valorar la actividad enzimática de la trombina obtenida se optó por calibrarla frente a una trombina comercial de alta pureza y de actividad conocida, (PARKE-DAVIS de 50000 U. NIH) ya que es accesible para todo laboratorio cuando no se dispone de un sustrato de alta pureza.

La calibración se realizó a los 30, 60, 90 y 120 días después de la liofilización, como se observa en el cuadro # 10 y en las gráfica 2, 3, 4, 5 , las cuales permiten calcular la actividad equivalente del extracto enzimático.

días	30	60	90	120
U. NIH	39.3	34.3	46.4	42.0

Como se observa la trombina liofilizada es bastante estable ya que de los 30 a los 120 días después de la liofilización se mantuvo la actividad inicial (a los 30 días). Existe sin embargo una variación en los diferentes frascos liofilizados utilizados a diferentes tiempos. Esto podría interpretarse como una

heterogeneidad al llenado de los frasco.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

En el presente trabajo fue posible obtener un extracto crudo de trombina, a partir de plasma humano, utilizando un método sencillo y rápido. Partiendo de 100 ml de plasma, en sólo 2 días, se obtuvieron 25 ml de extracto enzimático crudo, con una actividad (T.T.) de $3.81 \pm 0.045\%$.

El extracto crudo obtenido podría contener algunas proteínas de la coagulación, precipitadas junto con la trombina por el procedimiento empleado que podría ser la causa de la imprecisión obtenida en la valoración del T.T. utilizado como medida de la actividad enzimática.

La trombina solubilizada en solución salina fisiológica es inestable y requirió la adición de un soporte, para estabilizarla y poder liofilizarla, encontrándose que la albúmina al 25% es el mejor soporte y el mejor protector.

Con el proceso de liofilizado se logró conservar la actividad durante 30, 60, 90 y 120 días, tiempo máximo al cual se comprobó la estabilidad.

Los estudios de homogeneidad parecen suponer que las variaciones observadas durante la calibración y la estandarización son debidas al llenado de los frascos.

Se concluye que el objetivo planteado se cumplió satisfactoriamente, ya que se obtuvo una trombina liofilizada,

estable hasta por 120, días tiempo suficiente para poder ser utilizada en las prácticas del Laboratorio de Hematología de la Facultad de Química.

Adicionalmente con este trabajo se sientan las bases para la obtención de trombina a partir de plasma humano, o de otra fuente de menor costo, estandarizandose el proceso de purificación y cuidando otros aspectos básicos de la homogeneidad y estabilidad de la trombina.

CAPITULO VII.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Miller-Andersson M. et al. "Preparation and stability of a highly purified human thrombin" THROM RES 1:20(1) 109-22 (1985).
- 2.- Choh A. et. al. " Note on the preparation of bovine thrombin". THROM RES 15:20 (2);281-3 (1987).
- 3.- Tsvetkov T. et al. "A method for the preparation of dry thrombin for topical application" CRYOBIOLOGY. 21(6):661-3. (1987).
- 4.- Church F.C., et al. "Rapid sulfopropil disk chromatographic purification of bovine and human thrombin" ANAL BIOCHEM 15:157(1):77-83. (1986).
- 5.- Fischer A.M. "Thrombin purification by one-step preparative affinity chromatography on modified polystyrenes" J. CHROMATOGR. 8:363(1):95-100. (1986).
- 6.- Hofsteenge J. " Effect of thrombomodulin on the kinetics of the interaction of thrombin with substrates and inhibitors " BIOCHEM JOURNAL. 237(1):243-51. (1987).
- 7.- Lindhout T. et al. "Thrombin generation and inactivation in the presence of antithrombin III and heparin". BIOCHEMISTRY. 7.25(20):59-62. (1986).
- 8.- Henry Cannon. CLINICAL CHEMISTRY. Harper and Row .1974.

- 9.- Robert Berkow. EL MANUAL MERCK. Nueva Editorial Interamericana .México D.F. 1986.
- 10.- Jesty J. " The kinetics of inhibition of alpha thrombin in human plasma". J. BIOCHEM 5:261 (22):10313-8. (1986).
- 11.- Hauptman J. et al. "Anticoagulant action of synthetic tight binding inhibitors of thrombin in vitro and in vivo " TROMB RES 15:39 (6) 771. (1987).
- 12.-Yux J. et al "Affinity chromatography of thrombin on modified poliestyrene resin J. CHROMATOGR. 11:376, 429-35 (1986).
- 13.-Owen, W.G. et al. "The conversion of prothrombin to thrombin" J. BIOL. CHEM 249:594. (1987).
- 14.-Magnusson.S. "Structure and function of thrombin and prothrombin". DIATH HAFMORH. 38 (suppl):97. (1987).
- 15.-Esmon. C.T.Owen. "The conversion of prothrombin to thrombin II. J. BIOL CHEM .249:606 (1988).
- 16.-Seegers,W.H. "Isolation and some proprieties of thrombin-E" THROMB RES. 4:829. (1988).
- 17.-Fowler, W.E. "Electron microscopy of plasmic fragments of human fibrinogen as related to trimodular structure of the intact molecule ". J. CLIN INVEST 66:50 (1980).
- 18.- Bloom, A.L. " Hemostasis and Thrombosis" Churchill Livingstone, Edinburhg. (1981).
- 19.-Coleman, R.W. et al. "Hemostasis and Thrombosis: Principles and Clinical Practice. Lippincott, Philadelphia. (1982).

- 20.-Robert K. Murray." Bioquímica de Harper". El manual Moderno .México.(1985).
- 21.- William J. "Hematología" tomo II. Salvat. México 1983.
- 22 - Zucjer, M.B. "The functioning of blood platelets". SCI AM 242:86, (1980).
- 23.-Marguerie, G.A. "Interaction of fibrinogen with its receptor; kinetics and effect of pH and temperature BIOCHEM.20:1074. (1981).
- 24.-Lepetina, E.G."The initial action of thrombin on platelets J BIOL. CHEM.256:5037. (1981).
- 25.-Sajjan S "A new method for purification of the thrombin-like from the venom of the eastern diamond back rattlesnake" THROM RES.16:11-23. (1985).
- 26.-Miller.P.J. "Preparation and Stability of highly purified human thrombin standard "THROM RES" 20:109-122. (1980)
- 27.-Abha,G.A. "Note on the preparation of bovine thrombin" THROMB.RES. 20:281-283. (1986).
- 28.-Kordich,L. "Técnicas de Hemostasia y Trombosis".4:5. (1975).
- 29.-Thomson,A.R. "Hemostasia y Trombosis" El Manual Moderno. México.(1985).
- 30.-Rosell,F. " Fibrinógeno y fibrina" SCI. AM23:78-82 (1977).
- 31.-Kornberg,A." Methods in Enzymology".vol 182. Academic Press, Inc (1990).

- 32.-Scopes,R. "Protein Purification: Principles and Practice". Spriger-Verlag. New York. (1985).
- 33.- Berkow,R. "Diagnóstico y Terapéutica". Interamericana México.(1986).
- 34.- "Minimum Requirements of dried thrombin. Second Revision. Division of Biological Control. National Institute of Health. Bethesda.M. (1976).
- 35.-Sindey P.C. "Methods in enzymology. Vol XIX,XLV. Academic Press. New York. (1970).
- 36.-Jhon,W.F. "Human Thrombin " J. BIOL. CHEM. 253:11, 3587-3598. (1987).
- 37.-Rey,L.R. "Tratado de liofilización". P.Hauduroy. Paris, (1960).
- 38.- Murray R. Spiegel "Estadística" Mc Graw-Hill de México S.A. de C.V. 1975.