



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”

Modelo de trombosis en la cola de ratón inducido por
k-carragenano para el estudio del agente fibrinolítico FhT *in vivo*

Mabel Patricia Pereda Salguero

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Lima, Perú
2023

MIEMBROS DEL JURADO QUE APROBARON LA TESIS

Dra. MANUELA VERASTEGUI PIMENTEL: PRESIDENTE

Dr. LUIS DE STEFANO BELTRAN: VOCAL

Dra. ISKRA TUERO OCHOA: SECRETARIO

ASESOR: Ph.D. JOSÉ RONALD ESPINOZA BABILÓN

COASESORA: MSc. JENNIFFER ANGÉLICA ESPINOZA RAMÍREZ

DEDICATORIA

A mis padres, Elisa Salguero y José Pereda, por darme su apoyo en tiempos difíciles.

A mi hermana Malena por acompañarme y aconsejarme.

A Gustavo, Jung Suh y Lucerito.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, Dr. José R. Espinoza y MSc. Jenniffer Espinoza, por la enseñanza brindada y recomendaciones para sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Patricia Herrera, por sus enseñanzas.

A mis compañeros de la Unidad de Biotecnología molecular por enseñarme y tener paciencia a pesar que al inicio cometía errores.

El proyecto “Nuevo agente biológico recombinante con actividad fibrinolítica para su uso en la disolución de trombos”, Contrato N° 142-2017-FONDECYT, financió mis prácticas preprofesionales y los recursos para el desarrollo del presente trabajo.

REPORTE DE SIMILITUD-TURNITIN

Modelo de trombosis en la cola de ratón inducido por k-carragenano para el estudio del agente fibrinolítico FhT in vivo

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

2

patents.google.com

Fuente de Internet

1%

3

eprints.uanl.mx

Fuente de Internet

1%

4

D. M. Kambarage. "Treatment and control of sarcoptic mange: Evaluation of treatment of both the pigs and environment", Tropical Animal Health and Production, 1991

Publicación

<1%

5

agris.fao.org

Fuente de Internet

<1%

6

bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1%

7

www.researchgate.net

Fuente de Internet

<1%

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	6
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
IV. OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
V. MATERIALES Y MÉTODOS	8
MATERIALES	8
ANIMALES DE LABORATORIO	8
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	9
VARIABLES INDEPENDIENTES.....	9
VARIABLE DEPENDIENTE.....	10
CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	10
PURIFICACIÓN DE FhT	11
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE rPro-FhT.....	11
CUANTIFICACIÓN DE FhT y rPro-FhT	12
ACTIVACIÓN DE rPro-FhT	13
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	13
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE TROMBOSIS	14
CONFIRMACIÓN DE LA TROMBOSIS EN LA COLA MEDIANTE HISTOLOGÍA	15
ACTIVIDAD TROMBOLÍTICA DE FhT y rFhT	16
PRUEBAS ESTADÍSTICAS	17
CONSIDERACIONES ÉTICAS	17
VI. RESULTADOS.....	18
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA FhT	18
PRODUCCIÓN Y ACTIVACIÓN DE rFhT	19
CUANTIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS.....	20
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SOBRE AZOCASEÍNA.....	21
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA INDUCIR TROMBOSIS.....	22
CONFIRMACIÓN DE LA TROMBOSIS POR HISTOLOGÍA DE LA COLA.....	30
PRUEBA DE TROMBÓLISIS CON LAS ENZIMAS FhT y rFhT.....	31
VII. DISCUSIÓN	35
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. SUGERENCIAS	37
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
XI. ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fases del desarrollo de la tesis	9
Tabla 2. Variables independientes del estudio.....	9
Tabla 3. Variable dependiente en este estudio.....	10
Tabla 4. Construcción de la curva estándar con BSA [20].....	12
Tabla 5. Concentración de FhT y rPro-FhT.....	21
Tabla 6. Actividad enzimática de las enzimas FhT y rFhT.	21
Tabla 7. Efecto de la temperatura de disolución del stock de k-carragenano ..	23
Tabla 8. Efecto de la dosis de kappa-carragenano administrado..	25
Tabla 9. Efecto de la aclimatación de los ratones a diferentes temperaturas.....	27
Tabla 10. Efecto de la temperatura de administración del kappa-carragenano.....	29
Tabla 11. Porcentaje de trombosis después del tratamiento con las enzimas fibrinolíticas.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de formación de las redes de fibrina en la coagulación y la fibrinólisis.....	2
Figura 2. Activación de plasminógeno unido al coágulo y plasminógeno circulante.	3
Figura 3. Tipos de enzimas fibrinolíticas..	4
Figura 4. Cromatograma de la purificación de FhT a partir del producto E/S dializado.	18
Figura 5. Gel de electroforesis al 12 % de la proteína FhT purificada.....	19
Figura 6. Activación de la enzima rPro-FhT con glutatión 0.5 mM y 1 mM.	20
Figura 7. Curva estándar de BSA.	21
Figura 8. Fotografías a las 48 horas de las colas de los ratones inyectados con k-carragenano disuelto a diferentes temperaturas.....	22
Figura 9. Efecto de la temperatura de disolución de 4 mg/ml de k-carragenano en solución salina sobre el porcentaje de trombosis en la cola.	23
Figura 10. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones administrados con diferentes dosis de kappa-carragenano.....	24
Figura 11. Efecto de la dosis de kappa-carragenano en el porcentaje de trombosis.	25
Figura 12. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones aclimatados a diferentes temperaturas.	26
Figura 13. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el porcentaje de trombosis.....	27
Figura 14. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones tratados con k-carragenano administrado a diferentes temperaturas.....	28
Figura 15. Efecto de la temperatura de administración del k-carragenano 20 mg/kg en el porcentaje de trombosis de la cola.	29
Figura 16. Confirmación de la trombosis en las colas mediante histología de cortes de las colas teñidas con Eosina y Hematoxilina.....	30
Figura 17. Fotografías de las colas de ratones a las 48 horas de la inducción de la trombosis y de la administración de los tratamientos.	32
Figura 18. Efecto de los tratamientos en el porcentaje de trombosis.	34

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo y son causadas por coágulos en el sistema circulatorio. Los fármacos trombolíticos activan el plasminógeno hacia plasmina que degrada las redes de fibrina, un componente que estabiliza los coágulos. Estos fármacos también pueden activar el plasminógeno circulante produciendo plasmina que puede degradar otras proteínas ocasionando hemorragias. Por este motivo, existe un interés en la búsqueda de fármacos que degraden la fibrina directamente. Las enzimas FhT y su forma recombinante (rFhT) degradan la fibrina *in vitro*. En esta tesis, se establecieron las condiciones para inducir trombosis en la cola con *kappa*-carragenano y se utilizó este modelo para evaluar la actividad trombolítica de FhT y rFhT.

Las condiciones para inducir trombosis como la aclimatación de los ratones por 3 semanas a 24 °C, la disolución del *k*-carragenano a 85 °C y la administración de la solución de *k*-carragenano a 50 °C a una dosis de 20 mg/kg resultaron en un porcentaje de trombosis en la cola de 90 ± 4 %. Los ratones inducidos a trombosis con 20 mg/kg de *k*-carragenano y tratados con 20 mg/kg de rFhT tuvieron un porcentaje de trombosis en la cola significativamente menor (58.2 ± 13.1 %) en comparación con los ratones inducidos a trombosis y tratados con solución salina (92.8 ± 11.2 %). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de trombosis en los ratones inducidos a trombosis y tratados con 20 mg/kg de FhT comparado con los ratones inducidos a trombosis y tratados con solución salina.

PALABRAS CLAVE:

Trombosis, Trombólisis, Fibrina, Catepsina, *kappa*-Carragenano

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world and are caused by clots in the circulatory system. Thrombolytic drugs activate plasminogen toward plasmin that degrades fibrin networks, a component that stabilizes clots. These drugs can also activate circulating plasminogen, producing plasmin, which can degrade other proteins, causing bleeding. For this reason, there is interest in the search for drugs that directly degrade fibrin. FhT enzymes and their recombinant form (rFhT) degrade fibrin *in vitro*. In this thesis, conditions were established to induce tail thrombosis with *kappa*-carrageenan and this model was used to evaluate the thrombolytic activity of FhT and rFhT.

The conditions to induce thrombosis such as acclimatization of the mice for 3 weeks at 24 °C, dissolution of *k*-carrageenan at 85 °C and administration of the *k*-carrageenan solution at 50 °C at a dose of 20 mg/ kg resulted in a tail thrombosis percentage of 90 ± 4 %. Mice induced to thrombosis with *k*-carrageenan 20 mg/kg and treated with 20 mg/kg rFhT had a significantly lower percentage of tail thrombosis (58.2 ± 13.1 %) compared to mice induced to thrombosis and treated with saline solution (92.8 ± 11.2 %). No significant differences were found in the percentage of thrombosis in the mice induced to thrombosis and treated with FhT 20 mg/kg compared to mice induced to thrombosis and treated with saline solution.

KEYWORDS:

Thrombosis, Thrombolysis, Fibrin, Cathepsin, *kappa*-carrageenan

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades cardiovasculares y trombosis

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) representan la principal causa de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2019, 17.9 millones de personas murieron por ECVs, lo que representa el 32% de la mortalidad en el mundo [1]. Además, un informe de la Organización Panamericana de la Salud señala que en el año 2019, en el Perú fallecieron por ECVs 77.7 personas por cada 100,000 habitantes [2].

La presencia de coágulos en el torrente sanguíneo puede producir ECVs ya que impiden el flujo normal de la sangre hacia los tejidos [3]. El tromboembolismo venoso es causado por trombos en las venas profundas, estos pueden viajar por el torrente sanguíneo y ocasionar trombosis pulmonar [4]. El infarto de miocardio se produce por la obstrucción de la irrigación sanguínea hacia el corazón y el accidente cerebrovascular es ocasionado por la presencia de trombos en la circulación cerebral [5].

1.2 Coagulación y fibrinólisis

Los coágulos se forman cuando hay una lesión en un vaso sanguíneo [6]. Las plaquetas se adhieren al sitio de la lesión y se activan, liberando sustancias químicas que atraen a más plaquetas al sitio de la lesión, dando lugar a la formación del tapón plaquetario que detiene el sangrado [7]. La lesión de la pared vascular también desencadena la liberación de factores de coagulación que actúan en una cascada de reacciones enzimáticas que convierten la protrombina en trombina, esta enzima corta los fibrinopéptidos del fibrinógeno y lo convierte en fibrina, esta proteína fibrilar se polimeriza y entrecruza formando redes tridimensionales que se adhieren al tapón plaquetario y le confieren mayor rigidez (figura 1) [8].

Cuando el tejido vascular dañado se ha regenerado, los coágulos de fibrina deben degradarse, a este proceso se le denomina fibrinólisis [8]. En este proceso, los activadores de plasminógeno tPA (activador de plasminógeno tisular) y uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) convierten el plasminógeno que está unido al coágulo en plasmina, la plasmina es una serina proteasa que corta las redes de fibrina del coágulo hacia productos de degradación de plasmina, desestabilizando el coágulo (figura 1) [9].

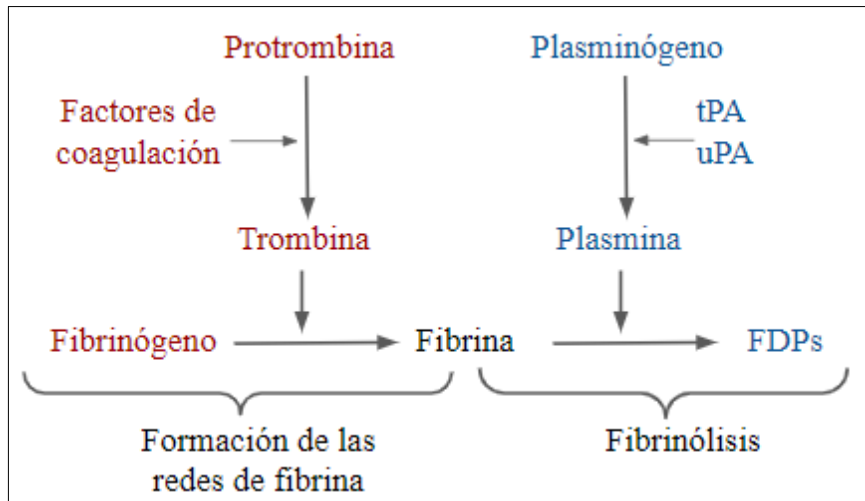


Figura 1. Proceso de formación de las redes de fibrina en la coagulación y la fibrinólisis. La formación de las redes de fibrina inicia con la liberación de los factores de coagulación por las células endoteliales del sitio de la lesión de un vaso sanguíneo, estos actúan en una cascada de reacciones enzimáticas que convierte el zimógeno protrombina en trombina, esta es una serina proteasa que corta los fibrinopéptidos de la estructura del fibrinógeno y lo convierte en fibrina, la fibrina se polimeriza y forma redes que brindan rigidez al tapón plaquetario. En la fibrinólisis, la fibrina se degrada por acción de la plasmina, que se forma a partir del plasminógeno por la acción de los activadores de plasminógeno (tPA y uPA). Adaptado de Singh & Risman [8,9].

1.3 Los activadores de plasminógeno y el riesgo de hemorragias

Los activadores de plasminógeno tPA y uPA se utilizan para tratar enfermedades cardiovasculares, pero su principal efecto secundario es la generación de hemorragias [10]. Los activadores de plasminógeno además de activar el plasminógeno unido al coágulo de fibrina también activan el plasminógeno circulante, produciendo plasmina en la sangre, la cual puede cortar otras proteínas como el fibrinógeno o proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y la laminina (figura 2) [11]. La falta de especificidad del tPA y uPA al plasminógeno unido al coágulo puede producir hemorragias, es por ello que se requiere un nuevo enfoque de tratamiento con enzimas [12].

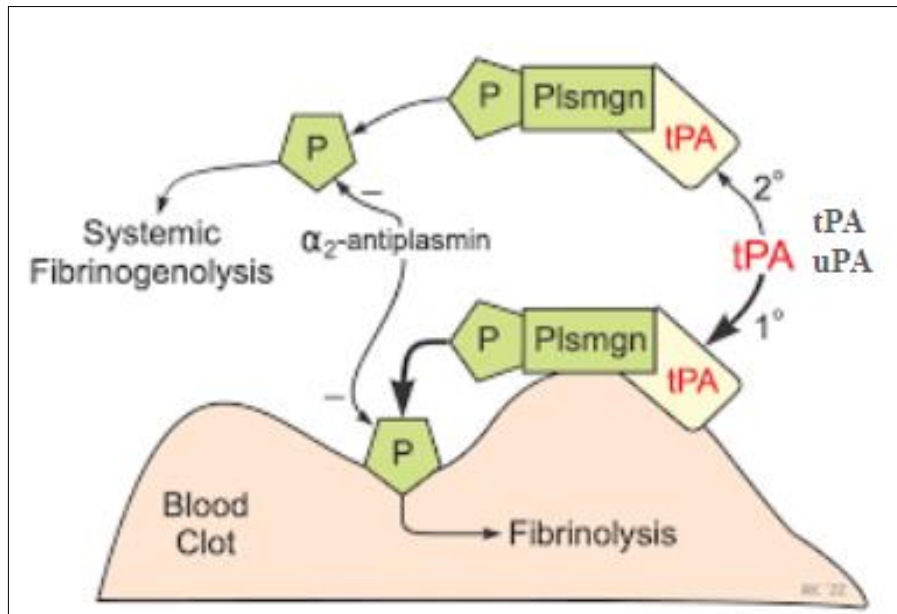


Figura 2. Activación de plasminógeno unido al coágulo y plasminógeno circulante. Los activadores de plasminógeno como tPA y uPA activan el plasminógeno que está unido al coágulo de fibrina y también activan el plasminógeno circulante produciendo plasmina la cual puede degradar proteínas como el fibrinógeno [12].

1.4 Enzimas fibrinolíticas

Los activadores de plasminógeno son un tipo de enzimas fibrinolíticas con acción indirecta en la degradación de la fibrina, ya que su acción está dirigida a la activación del plasminógeno [11]. Las enzimas fibrinolíticas directas actúan degradando las redes de fibrina sin la necesidad de intermediario, cumpliendo una función similar a la plasmina, se estudia el potencial de este tipo de enzimas porque su administración tendría menor riesgo de producir hemorragias ya que su acción es directa hacia la fibrina de los coágulos (figura 3) [13]. En las últimas décadas, se han identificado enzimas fibrinolíticas de fuentes naturales como del veneno de serpiente, lombrices, murciélagos y microorganismo [14, 15, 16, 17].

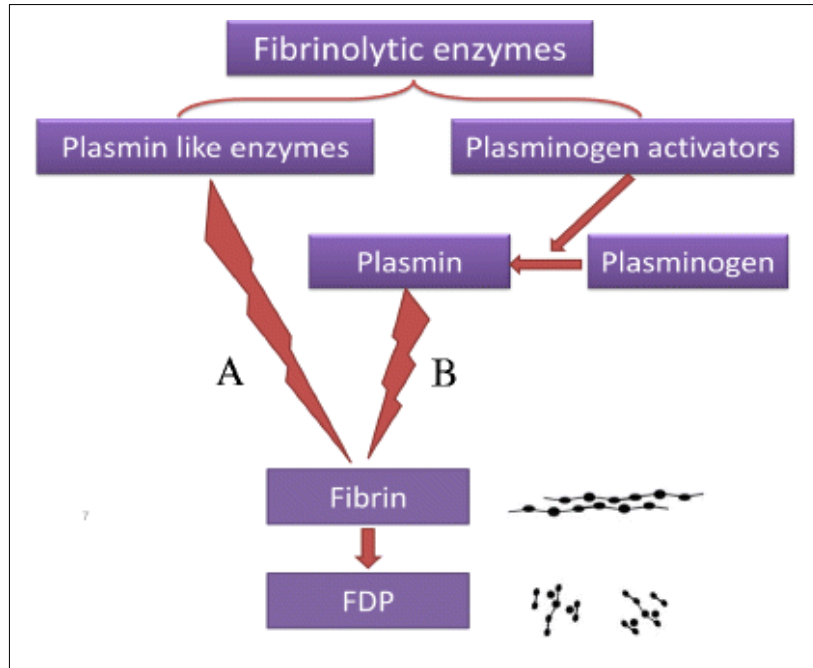


Figura 3. Tipos de enzimas fibrinolíticas. Las enzimas fibrinolíticas pueden tener un mecanismo de acción directo en la degradación de la fibrina, estas enzimas son similares a la plasmina; también pueden tener un mecanismo de acción indirecto, activando el plasminógeno para la producción de plasmina que actúa degradando la fibrina [13].

1.5 FhT y rFhT

La Unidad de Biotecnología Molecular (UBM) de la UPCH caracterizó bioquímicamente la proteína FhT, una cisteína proteasa tipo catépsina L de ~25 kDa purificada del producto excretado/ secretado (E/S) de un agente biológico [18]. Las cisteínas proteasas presentan dos estados, un estado zimógeno que tiene un prodominio que se ubica alrededor del sitio activo de la proteína e inhibe su actividad enzimática y un estado activo, el cual no presenta el prodominio. El prodominio es cortado por la autocatálisis de la enzima y a un pH ácido [19]. En la UBM se clonó la forma zimógena de la proteína FhT (rPro-FhT) en *Pichia pastoris*, la activación *in vitro* se realiza con DTT 10 mM a pH 5 [20]. La enzima FhT recombinante (rFhT) presenta parámetros cinéticos similares a la enzima nativa [20].

La enzima nativa FhT y su forma recombinante (FhT) degrada la fibrina en ensayos *in vitro*; además, mediante microscopía electrónica se evidenció la degradación de las redes de fibrina de los coágulos de sangre total por la enzima FhT [20, 21].

1.6 Modelo de inducción de trombosis con *kappa*-carragenano

El *kappa*-carragenano (*k*-carragenano) es un polisacárido sulfatado natural, se extrae de la pared celular de las macro algas marinas rojas y es utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica [22]. Su administración en ratones y ratas produce una coloración morada en la cola, orejas y patas, lo cual indica la generación de trombos en estas zonas [23]. El *k*-carragenano induce la formación de trombos en los vasos mediante la inflamación intravascular, daña las células endoteliales provocando la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 1 [24]. Por este motivo, este compuesto es utilizado para el estudio *in vivo* de agentes anticoagulantes y trombolíticos, y la actividad de los potenciales agentes de interés se suele medir en la cola en función de la longitud oscura de la cola después de la administración del *k*-carragenano y del compuesto de interés [25, 26].

El modelo de trombosis en la cola inducido con *k*-carragenano es menos invasivo en comparación a otros modelos utilizados para el estudio de agentes trombolíticos, otros modelos requieren métodos quirúrgicos para exponer los vasos y para inducir trombosis en los vasos, así como personal entrenado [27]. Una limitación del modelo con *k*-carragenano es la falta de información sobre las condiciones óptimas para la generación de trombos en la cola de los ratones; además, este modelo presenta una baja frecuencia de formación de trombos y la longitud de la trombosis en la cola no es similar entre los ratones, por este motivo, se utiliza diferentes condiciones para inducir trombos con *k*-carragenano, como la ligación de la cola o el mantenimiento de la cola en agua fría [28].

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las enfermedades cardiovasculares tienen una alta tasa de mortalidad en el Perú y el mundo [1, 2]. La presencia de coágulos en el sistema circulatorio puede causar enfermedades cardiovasculares [3]. Para tratar los coágulos se utilizan agentes trombolíticos como los activadores de plasminógeno que activan el plasminógeno unido al coágulo y el plasminógeno circulante produciendo plasmina que puede degradar otras proteínas como el fibrinógeno, laminina y fibronectina ocasionando hemorragias [11]. Por este motivo, se requiere una nueva estrategia de tratamiento con enzimas fibrinolíticas de acción directa. Las enzimas FhT y rFhT tienen una acción proteolítica sobre la fibrina en ensayos *in vitro* [20, 21]. Todavía no se ha evaluado si las enzimas FhT y rFhT tienen un efecto trombolítico *in vivo*.

En esta tesis se utilizó el modelo de trombosis en la cola de ratones para evaluar la actividad trombolítica de FhT y rFhT.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las enzimas FhT y rFhT tienen un efecto trombolítico en los coágulos de la cola de los ratones?

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad trombolítica de las enzimas FhT y rFhT sobre los coágulos inducidos en las colas de ratones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir las proteínas FhT y rFhT.
- Establecer las condiciones óptimas para la inducción de trombosis en la cola de ratones mediante la inoculación de *kappa*-carragenano.
- Evaluar la acción trombolítica de las proteínas FhT y rFhT en el modelo de trombosis en la cola.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Etanol absoluto (MERCK), membrana de diálisis MWCO12400 (SIGMA), matriz Shepadex CM-50 (SIGMA), cloruro de sodio (MERCK), citrato de sodio (SIGMA), azocaseína (SIGMA), ditioneitol (SIGMA), ácido tricloro acético (MERCK), extracto de levadura (HIMEDIA), peptona (HIMEDIA), dextrosa (SIGMA), fosfato de potasio (THERMO SCIENTIFIC), base de nitrógeno de levadura (HIMEDIA), biotina (SIGMA), glicerol (SIGMA), metanol (SIGMA), Zeocina (INVITROGEN), filtros 0.22 (MEMBRANA SOLUTIONS), resina Ni-NTA (INVITROGEN), Amicon ultra-15 3 kDa (SIGMA), glutatión (SIGMA), *kappa*-carragenano (SIGMA), NaCl 0.9% (BRAUN), NaCl 9% (BRAUN), Uroquinasa (SIGMA), ZnSO₄ (SIGMA) y Protein Assay Dye Reagent concentrate (BIO-RAD)

ANIMALES DE LABORATORIO

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 12 semanas mantenidos con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados con comida balanceada y agua a voluntad. La temperatura del ambiente en que se mantuvieron los ratones se controló en los experimentos y se menciona en la sección de las condiciones óptimas para inducir trombosis.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de esta tesis se realizó en tres fases (Tabla 1).

Tabla 1. Fases del desarrollo de la tesis

Fase 1	Producción de FhT y rFhT	<ol style="list-style-type: none"> 1. Purificación de FhT 2. Expresión, purificación y activación de rFhT 3. Cuantificación de FhT y rPro-FhT
Fase 2	Optimización de las condiciones para la inducción de trombosis en la cola de ratones con <i>kappa</i> -carragenano	<ol style="list-style-type: none"> 1. Temperatura de disolución del <i>kappa</i>-carragenano 2. Dosis del <i>kappa</i>-carragenano 3. Temperatura de aclimatación de los ratones 4. Temperatura de administración del <i>kappa</i>-carragenano
Fase 3	Evaluación de la actividad trombolítica de las enzimas FhT y rFhT en el modelo de trombosis en cola de ratones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prueba de trombólisis con las enzimas FhT y rFhT

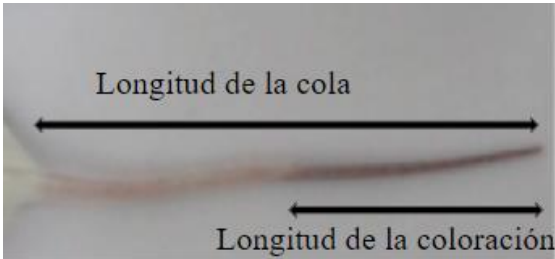
VARIABLES INDEPENDIENTES

Tabla 2. Variables independientes del estudio

Variables Independientes	Definición	Tipo de variable	Escala de medición	Opciones
Temperatura de disolución del <i>kappa</i> -carragenano	Es la temperatura a la que se disolvió la solución stock de carragenano 4 mg/ml en solución salina	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • 37 °C • 85 °C
Dosis del <i>kappa</i> -carragenano	Es la dosis de <i>kappa</i> -carragenano que se inyectó a los ratones.	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mg/kg • 50 mg/kg
Temperatura de aclimatación	Es la temperatura en la que se mantuvieron a los ratones por tres semanas antes de la administración del <i>kappa</i> -carragenano	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura ambiente • 24 °C
Temperatura de administración del <i>kappa</i> -carragenano	Es la temperatura en la que se administró el <i>kappa</i> -carragenano a los ratones vía intraperitoneal.	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • 37 °C • 50 °C
Tratamientos	Es el tratamiento que se administró vía intravenosa 30 minutos después de la administración intraperitoneal del <i>kappa</i> -carragenano.	Cualitativa	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl 0.9% • Uroquinasa 40 mg/kg • FhT 20 mg/kg • rFhT 20 mg/kg

VARIABLE DEPENDIENTE

Tabla 3. Variable dependiente en este estudio.

Variable-Definición	Tipo de variable-Escala de medición
<p>Porcentaje de trombosis: Se considera como trombosis, la coloración morada de la cola [23]. De acuerdo a ello, el porcentaje de trombosis es la proporción de la longitud en centímetros de la coloración morada en la cola 48 horas después de la administración del <i>kappa</i>-carragenano entre la longitud en centímetros de la cola por cien. La medición se realizó a las 48 horas, de acuerdo a otras publicaciones [26].</p>  $\% \text{ de trombosis} = \frac{\text{Longitud de la coloración morada de la cola (cm)}}{\text{Longitud de la cola (cm)}} * 100$	<p>Cuantitativa-de intervalo</p>

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se determinó el tamaño de la muestra en STATA V17. Se calculó el tamaño de la muestra a partir de resultados reportados en la literatura, el porcentaje de trombosis en el grupo de ratones inducidos a trombosis con *k*-carragenano y tratados con solución salina (control negativo) fue $98 \pm 1\%$, en el grupo de ratones inducidos a trombosis y tratados con el control positivo, uroquinasa 40 mg/kg, fue $46 \pm 7\%$ [29], para el grupo con uroquinasa el “n” es igual a 6. No hay referencias de catepsinas L usadas en el modelo de trombosis con *k*-carragenano pero se consideró un porcentaje de trombosis de FhT y rFhT de 70 % con una desviación estándar del 10 %, para estos grupos el “n” es igual a 8.

PURIFICACIÓN DE FhT

Se purificó la proteína FhT siguiendo el protocolo establecido por Córdova, *et al* [30]. Se colectó 320 ml del producto E/S de un agente biológico y se realizó 8 purificaciones a partir de 40 ml de E/S. Se precipitó las proteínas de 40 ml de E/S con etanol al 98% y se dializó en una membrana de 12,400 Dalton contra buffer citrato 10 mM a pH 5 con ZnSO₄ 0.1mM. FhT fue purificada a partir de la muestra dializada mediante cromatografía de intercambio iónico con matriz Sephadex CM-50. Se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm y se evaluó actividad enzimática de aquellas que presentaban una absorbancia mayor a 0.1. La actividad enzimática se realizó en un volumen final de 700 µl, se mezcló 50 µl de cada fracción de la purificación con azocaseína 2.5 mg/ml, ditioneitol (DTT) 10 mM y buffer citrato 60 mM a pH 5. La reacción se incubó a 37 °C por cuatro horas y se detuvo con 300 µl de ácido tricloroacético al 80 % incubándose a 4 °C por diez minutos, después se centrifugó a 6,500 rpm por cinco minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 440 nm. Las fracciones con actividad fueron guardadas y dializadas contra agua en una membrana de 12,400 Dalton. La solución dializada se liofilizó y se guardó a -20°C hasta su uso. Finalmente, se corrió un SDS-PAGE de la proteína FhT para verificar la pureza.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE rPro-FhT

La expresión y purificación de la forma zimógena de FhT (rPro-FhT) se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Buiza [20]. Brevemente, se sembró la cepa recombinante en agar YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) con zeocina 100 µg/ml y se incubó a 30 °C por 3 días, se picó una colonia y se incubó en 50 ml de medio BGMY (fosfato de potasio 100 mM a pH 6, base de nitrógeno de levadura 1.34 %, extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, biotina 0.00004 %, glicerol 1 %) a 250 rpm por 24 horas a 30 °C. Se centrifugó el cultivo a 6,000 rpm y las levaduras se diluyeron en medio BMMY (fosfato de potasio 100 mM a pH 6, base de nitrógeno de levadura 1.34 %, extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, biotina 0.00004 %, metanol 0.5 %) hasta llegar a una densidad óptica de 1 (600 nm), el cultivo se incubó por 72 horas y se añadió metanol a una concentración final de 0.5 %. La expresión se realizó con metanol porque el gen de rPro-FhT está regulado por el promotor AOX1, un promotor inducible por metanol. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 7,950 rpm y se filtró el sobrenadante

con filtros de 0.22 μm estériles. Se equilibró el sobrenadante a pH 7.4 y rPro-FhT fue purificado a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni-NTA. La purificación se realizó a partir del sobrenadante porque la proteína tiene un péptido señal “alfa factor” que medía la secreción de la proteína al medio extracelular y la purificación se realizó con una resina de níquel agarosa porque la proteína tienen una secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal. Se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm, aquellas con una absorbancia mayor a 0.1 se dializaron contra agua en una membrana de diálisis de 12,400 Dalton. Finalmente, las muestras se concentraron utilizando los concentradores Amicon Ultra15 de 3 kDa. La proteína rPro-FhT se expresó en 10 cultivos de aproximadamente 100 ml.

CUANTIFICACIÓN DE FhT y rFhT

Se resuspendió 15 mg de la proteína FhT liofilizada en 800 μl de cloruro de sodio al 0.9 %. Se obtuvo 1 ml de la proteína rPro-FhT concentrada. Se cuantificó las enzimas construyendo una curva estándar con BSA (albúmina de suero bovino) en agua miliQ (0-25 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 4). En una placa de 96 pozos, se mezclaron 150 μl de las diferentes concentraciones de BSA, 150 μl de rPro-FhT y FhT con 150 μl Protein Assay Dye Reagent 1X; la placa se incubó por 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se leyó a 595 nm en un lector de placas [20].

Tabla 4. Construcción de la curva estándar con BSA [20].

# de tubos	BSA	diluyente (agua miliQ) μl	Concentración de BSA ($\mu\text{g/ml}$)
1	5 μl de BSA 1mg/ml	395	25
2	8 μl de BSA 1mg/ml	792	20
3	3 μl de BSA 1mg/ml	397	15
4	350 μl del Tubo 2	350	10
5	350 μl del Tubo 4	350	5
6	350 μl del Tubo 5	350	2.5
7	350 μl del Tubo 6	350	1.25
Blanco	0	350	0

ACTIVACIÓN DE rPro-FhT

Para la activación *in vitro* de catepsinas se utilizan agentes reductores como ditioneitol (DTT) y mercaptoetanol; los agentes reductores ayudan a romper los puentes disulfuro, asegurando que la cisteína del sitio activo se encuentre de forma reducida [31]. En esta tesis se utilizó glutatión como agente reductor ya que este es un compuesto fisiológico.

Se determinó la concentración de glutatión necesaria para activar 800 µg de rPro-FhT a rFhT, se activó esta cantidad ya que es el total de enzima administrada a ratones de 40 gramos. Se mezcló por separado GSH 0.5 mM y GSH 1mM con 800 µg de rPro-FhT y buffer citrato 0.17 mM a pH 5 en un volumen total de 50 µl, las muestras se incubaron por 12 horas a 37 °C. Se realizó un SDS-PAGE corriendo 25 µg de la proteína a las 0 horas y 12 horas de activación con el fin de verificar la activación completa de la enzima. La proteína rPro-FhT zimógena tiene un peso molecular de ~38 kDa, luego de la activación la proteína rFhT tiene un peso de ~25 kDa [20].

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se comparó la actividad enzimática de las proteínas FhT y rFhT activada. La medición de la actividad enzimática se realizó como se describió anteriormente, pero no se utilizó ditioneitol en la reacción porque ambas enzimas están en su forma activa y para comparar la actividad de las enzimas se utilizó 25 µg de FhT y 25 µg de rFhT.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE TROMBOSIS

Debido a que en la literatura no hay un único protocolo completo para la inducción de trombosis en la cola, se evaluaron diferentes condiciones para inducir trombosis.

Efecto de la temperatura de disolución del kappa-carragenano

Se preparó dos soluciones stock de *k*-carragenano a 4 mg/ml en NaCl 0.9 % [32], una solución se disolvió por diez minutos a 37 °C y la otra a 85 °C. Se probaron estas temperaturas ya que a ~25 °C se observó que habían partículas suspendidas. No hay referencias sobre la temperatura en la que se disuelve este compuesto en los protocolos de inducción de trombosis, pero en artículos no relacionados al tema disuelven el *k*-carragenano a 80 °C [33, 34]. Después, se preparó las soluciones de inyección de *k*-carragenano correspondientes a la dosis de 20 mg/kg diluyendo las soluciones stock en solución salina, como los ratones BALB/c de 15 semanas pesaban en promedio 40 gramos y el volumen de inyección fue 800 µl, la concentración del *k*-carragenano para inyectar era de 1 mg/ml, la solución se mantuvo a 37 °C hasta su administración. Se inyectó esta solución vía intraperitoneal, ya que en otros estudios usaron esta vía de administración para inducir trombosis en la cola [35, 36]. Después los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas para la medición del porcentaje de trombosis en la cola, esta temperatura se utilizó en otros estudios, pero no mencionan cómo influye esta temperatura en la inducción de trombosis en la cola [29, 35]. La medición de la trombosis se realizó a las 48 horas, de acuerdo a otras publicaciones porque en este tiempo el coágulo se visualiza mediante histología y en un tiempo mayor la cola se necrosa [26].

Efecto de la dosis de kappa-carragenano

Se preparó una solución de *k*-carragenano a 4 mg/ml disuelto en solución salina a 85 °C por diez minutos, después se prepararon dos soluciones de *k*-carragenano ajustadas a las dosis de 20 mg/kg y 50 mg/kg. Se probaron estas dosis porque fueron utilizadas para inducir trombosis en la cola [29, 37]. Las soluciones se mantuvieron a 37 °C hasta la inyección. Se administraron las soluciones de *k*-carragenano vía intraperitoneal a dos grupos de ratones. Luego de la inyección, los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas para la medición del porcentaje de trombosis en la cola.

Efecto de la aclimatación de los ratones a 24 °C y a temperatura ambiente

Un grupo de ratones BALB/c hembras de 12 semanas fueron aclimatados durante tres semanas a ~24 °C y otro grupo a temperatura ambiente, la cual varía en la noche (de 18 °C a 21 °C) y el día (de 19 °C a 26 °C). La temperatura de aclimatación de 24 °C ya ha sido utilizada en otros estudios [29, 32]. Se preparó una solución de *k*-carragenano a 4 mg/ml en solución salina disuelta a 85 °C por diez minutos. Después, se preparó la solución de inyección de *k*-carragenano ajustada a la dosis de 20 mg/kg, la solución se mantuvo a 37 °C hasta su administración vía intraperitoneal, luego de la inyección los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas para la medición del porcentaje de trombosis en la cola.

Efecto de la temperatura de administración del kappa-carragenano

Ratones BALB/c hembras de 12 semanas fueron aclimatados durante tres semanas a ~24 °C. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano a 4 mg/ml disuelto en solución salina a 85 °C por diez minutos. Después, se prepararon dos soluciones de inyección de *k*-carragenano ajustadas a la dosis de 20 mg/kg, una solución se mantuvo a 37 °C y la otra a 50 °C hasta su administración vía intraperitoneal. La literatura no indica a qué temperatura se administra este compuesto para inducir trombosis en la cola de ratones, en esta tesis se probaron las temperaturas de 37 °C y 50 °C de forma arbitraria, ya que se pensó que a 50 °C habría una mejor absorción del *k*-carragenano. Luego de la inyección los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas para la medición del porcentaje de trombosis en la cola.

CONFIRMACIÓN DE LA TROMBOSIS EN LA COLA MEDIANTE HISTOLOGÍA

Dos ratones fueron aclimatados durante tres semanas a 24 °C, uno recibió NaCl al 0.9 % vía intraperitoneal y otro una solución de *k*-carragenano a una dosis de 20 mg/kg vía intraperitoneal, esta solución fue preparada a partir de una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en NaCl al 0.9 % a 85 °C por diez minutos, la solución se administró a 50 °C. Después de la administración, los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas. Los ratones fueron sacrificados con 100 mg/kg de pentobarbital sódico vía intraperitoneal [38]. Se amputaron las colas de los ratones y se fijaron en formalina al 10

% por 24 horas; después los tejidos fueron sumergidas en parafina y seccionados (5 μm) a la mitad de la cola. La parafina se eliminó con agua caliente y cada corte se colocó en un portaobjeto, las secciones de los tejidos fueron secadas al aire y colocadas en un horno e incubadas a 65 ° C por 16 horas. Después, los tejidos fueron teñidos con eosina-hematoxilina [39]. La trombosis se confirmó mediante la visualización de coágulos en las venas de las colas [36].

PRUEBA DE LA ACTIVIDAD TROMBOLÍTICA DE FhT y rFhT

Ratones BALB/c hembras de 12 semanas fueron aclimatados durante tres semanas a ~24 °C. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano a 4 mg/ml disuelto en solución salina a 85 °C por diez minutos, después se preparó una solución de inyección de *k*-carragenano ajustada a la dosis de 20 mg/kg, la solución se mantuvo a 50 °C hasta su administración vía intraperitoneal. Treinta minutos después de la inyección del *kappa*-carragenano, se administró en la vena lateral de la cola 60 μl de los tratamientos:

- NaCl 0.9% (n=4) este grupo de ratones es el grupo control negativo.
- Enzima uroquinasa (n=4), se administró uroquinasa (UK) a una dosis de 40 mg/kg, esta enzima es utilizada como control positivo porque es un activador de plasminógeno [29]. La concentración del stock de uroquinasa en NaCl 0.9 % era 28 mg/ml, como los ratones de 15 semanas pesaban en promedio 40 gramos, la solución de inyección tenía una concentración uroquinasa fue 26.6 mg/ml.
- Enzima FhT (n=4): se administró FhT a una dosis 20 mg/kg en la vena lateral de la cola. El stock de FhT tenía una concentración de 17.4 mg/ml en NaCl 0.9 %, como los ratones pesaban en promedio 40 gramos, la solución de FhT se diluyó con solución salina 0.9 % a una concentración de 13.3 mg/ml.
- Enzima rFhT(n=6): se administró una dosis de 20 mg/kg de rFhT en la vena lateral de la cola. Como se activó 800 μg de rFhT en 50 μl de buffer de activación a pH 5, se subió el pH de la solución hasta 7.4 con 4 μl de buffer carbonato 100 mM a pH 9.6 y 6 μl de NaCl 9%. La concentración de todos los componentes de la solución de inyección de rFhT fueron glutatión 0.83 mM, citrato de sodio 0.14 mM, NaCl 0.9 %, carbonato/bicarbonato 6.6 mM y rFhT 13.3 mg/ml. Se quería utilizar la misma dosis que el control positivo, pero no se probó

concentraciones mayores de rFhT ya que la proteína se precipitaba a concentraciones mayores de 20 mg/ml.

Luego de la inyección, los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas para la medición del porcentaje de trombosis en la cola.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Como en las pruebas de optimización de la trombosis se compararon el porcentaje trombosis en la cola entre dos grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para verificar si hay diferencias en el porcentaje de trombosis entre estos dos grupos.

En el ensayo de actividad trombolítica, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para verificar si existe una diferencia significativa entre estos grupos, como los resultados de prueba fueron estadísticamente significativos, se realizó la prueba de Dunn para determinar exactamente qué grupos eran diferentes. Para realizar las pruebas se empleó el programa estadístico STATA V.17 y se consideró como significativo el valor de $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente proyecto de tesis fue aprobado y renovado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales: CONSTANCIA 047 - 11 – 21 y CONSTANCIA-CIEA-R-034-08-23.

VI. RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA FhT

El punto isoeléctrico de la proteína FhT es 5.5 [18]. FhT se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico a pH 5 en una resina cargada negativamente (Sephadex CM-50). La proteína FhT eluye en las primeras fracciones porque a pH 5 la proteína está cargada ligeramente positiva. En la figura 4 se muestra el cromatograma de la purificación, FhT se encuentra entre la fracción 6 a 25, estas fracciones tenían actividad enzimática sobre azocaseína. Las fracciones con actividad enzimática se dializaron contra agua y se liofilizaron. Se resolvió mediante SDS-PAGE al 12 % 20 μ g de FhT, se obtuvo una única banda con un peso molecular aproximado de 25 kDa (figura 5).

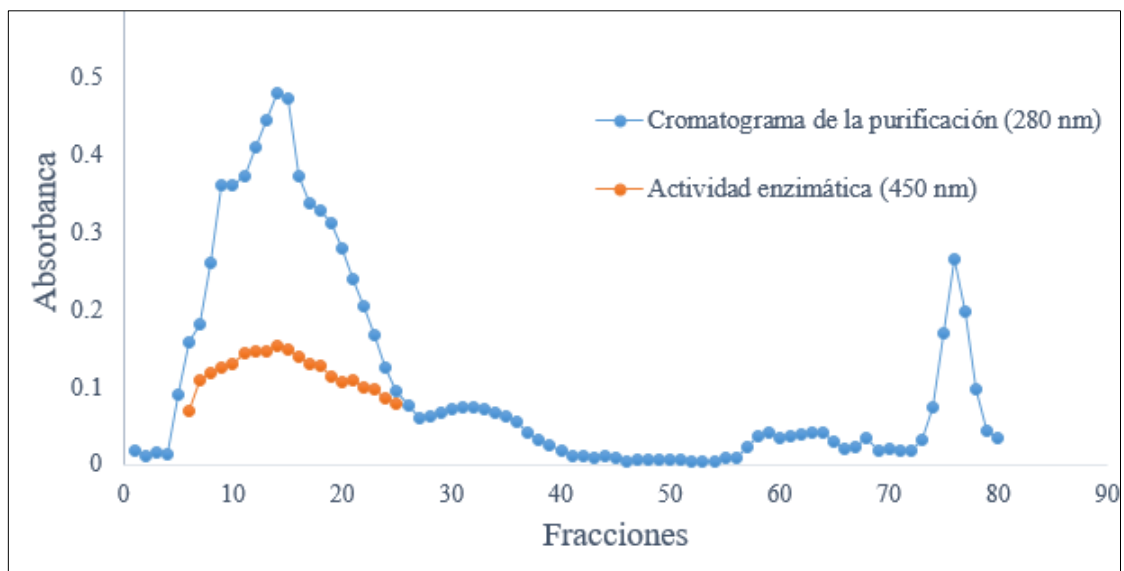


Figura 4. Cromatograma de la purificación de FhT a partir del producto E/S dializado. En el eje X se encuentran las fracciones obtenidas de la purificación y en el eje Y los valores de absorbancia a 280 nm y 450 nm. La medición a 280 nm (puntos azules) sirvió para verificar la presencia de proteína en las fracciones (los valores de absorbancia a 280 nm ya han sido restados con la absorbancia del blanco que tiene buffer citrato 10 mM pH a 5 y ZnSO_4 0.1mM) y la medición a 450 nm (puntos naranjas) sirvió para verificar la actividad enzimática de la enzima nativa (los valores de la absorbancia de la actividad ya han sido restados con la absorbancia del blanco que tiene DTT 10 mM, azocaseína 2.5 mg/ml y buffer citrato 60 mM a pH 5).

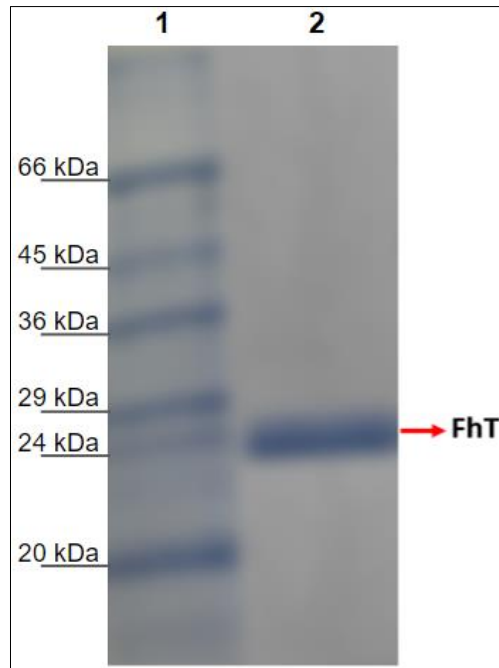


Figura 5. Gel de electroforesis al 12 % de la proteína FhT purificada. SDS-PAGE de FhT purificado. 1 (marcador de peso molecular) y 2 (20 μ g de FhT).

PRODUCCIÓN Y ACTIVACIÓN DE rFhT

La proteína rPro-FhT fue expresada, purificada y activada como se describió anteriormente. Se activó 800 μ g de rPro-FhT con diferentes concentraciones de glutatión (0.5 mM y 1 mM) en buffer citrato 0.17 mM a pH 5 y se corrió un SDS-PAGE de 25 μ g de la proteína antes y después de la activación. En la figura 6 se observa que la incubación con GSH 0.5 mM por 12 horas no activó completamente la proteína rPro-FhT a rFhT ya que todavía se observa la banda del zimógeno inactivo de 38 kDa. La activación con GSH 1 mM por 10 horas activó completamente la proteína rPro-FhT a rFhT, observándose la banda de 25 ~kDa (rFhT activado) y de ~12.5 kDa (péptido cordado del zimógeno).

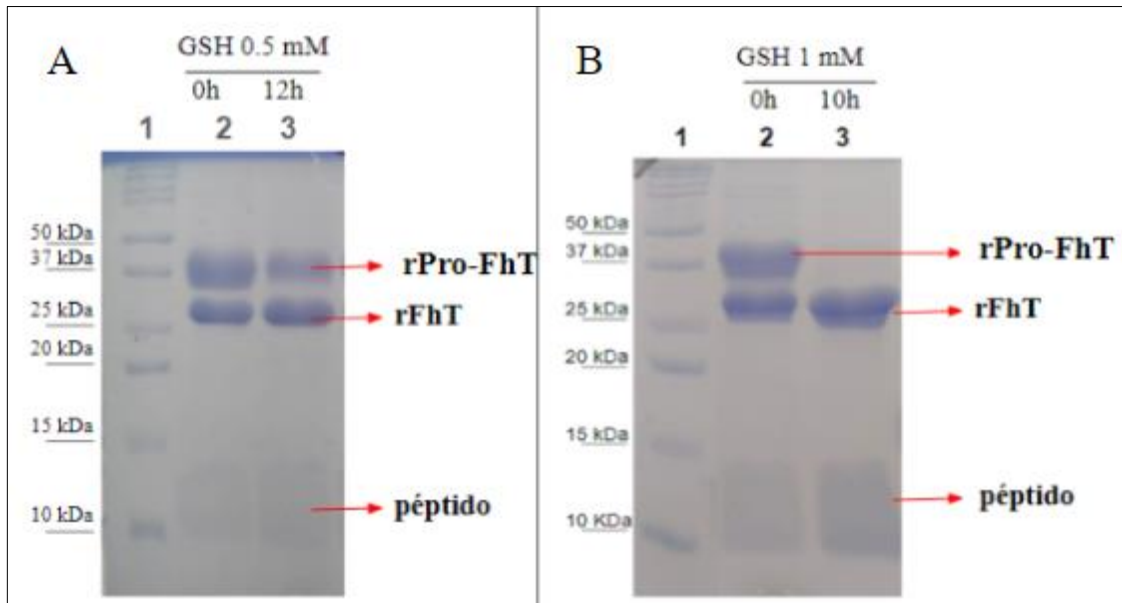


Figura 6. Activación de la enzima rPro-FhT con glutatión 0.5 mM y 1 mM. Se activó 800 µg de rPro-FhT con glutatión 0.5 mM (A) y 1 mM (B), se corrió un SDS-PAGE de 25 µg de la proteína antes y después de la activación con glutatión. La activación completa de rPro-FhT se puede ver en el gel B, donde ya no aparece la banda de 38 kDa. 1 (marcador de peso molecular), 2 (25 µg de la proteína a las cero horas de activación) y 3 (25 µg de la proteína después de la activación).

CUANTIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

Se cuantificó la cantidad total de FhT obtenido después de las 8 purificaciones y la cantidad de rPro-FhT obtenida a partir de un litro de cultivo. En la curva estándar con BSA, se obtuvo un R^2 (coeficiente de determinación) igual a 0.9918 (figura 7). A partir de la ecuación de la recta, se extrapolaron las concentraciones de FhT y rPro-FhT. La concentración de la proteína nativa que se obtuvo fue 17.4 mg/ml, teniendo una cantidad total de FhT de 13.9 mg en 0.8 ml. La concentración de la enzima recombinante fue 27.7 mg/ml, se obtuvo 22.2 mg en 1 ml (tabla 5). El rendimiento de FhT fue 1.7 mg por purificación y de rPro-FhT fue 2.22 mg en 100 ml de cultivo.

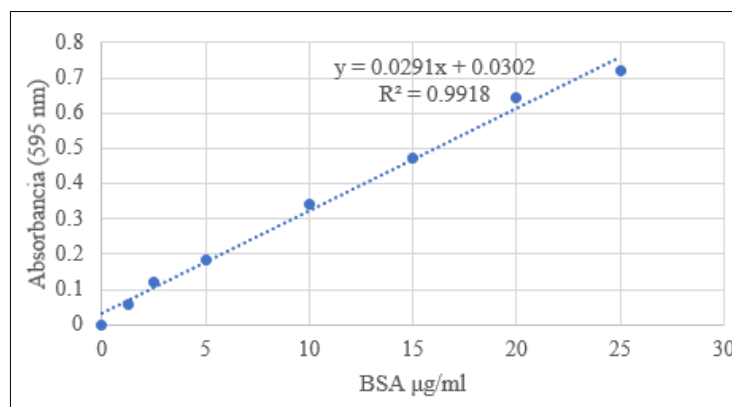


Figura 7. Curva estándar de BSA. En el eje X se encuentran las concentraciones de BSA y en el eje Y la absorbancia a 595 nm.

Tabla 5. Concentración de FhT y rPro-FhT. Las concentraciones de las proteínas se determinaron usando la ecuación de recta obtenida de la curva estándar con BSA. Se cuantificó por duplicado y los valores de absorbancia representan el promedio de las dos mediciones. Como las enzimas concentradas se diluyeron en agua, la curva estándar de BSA se construyó diluyendo BSA en agua. * Las absorbancias ya fueron restadas con la absorbancia del blanco.

	Absorbancia*	Concentración de la dilución µg/ml	Concentración del stock µg/ml	Concentración del stock mg/ml	Cantidad mg
FhT	0.504	16.3	17426.4	17.4	13.9
rPro-FhT	0.460	14.8	27693.3	27.7	22.2

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SOBRE AZOCASEÍNA

Se midió la actividad de 25 µg de FhT y 25 µg rFhT activado (Tabla 6). Ambas enzimas presentaron una actividad específica similar sobre la azocaseína.

Tabla 6. Actividad enzimática de las enzimas FhT y rFhT. *Los valores de actividad son el promedio de dos ensayos y el valor de absorbancia ya fue restado con el valor de blanco.

Enzima	Actividad específica* (Absorbancia/(min x mg))x100
25 µg FhT nativa	13.2
25 µg rFhT activado	12.6

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA INDUCIR TROMBOSIS

Efecto de la temperatura de disolución del *k*-carragenano 4 mg/ml en NaCl 0.9 %

Se midió el porcentaje de trombosis en las colas a las 48 horas cuando los ratones recibieron el *k*-carragenano preparado a partir de una solución stock de *k*-carragenano a 4 mg/ml disuelta en solución salina a 85 °C y a 37 °C (figura 8). Los ratones a los que les administró el *k*-carragenano disuelto a 37 °C tuvieron un porcentaje de trombosis en la cola de 26.5 ± 5.3 %, mientras que el grupo administrado con solución disuelta a 85 °C tuvo un porcentaje de trombosis en la cola de 42.9 ± 4.8 % a los 48 horas (tabla 7). Se encontró diferencias significativas en el porcentaje de trombosis en la cola entre estos dos grupos, $p=0.0495$ (figura 9).

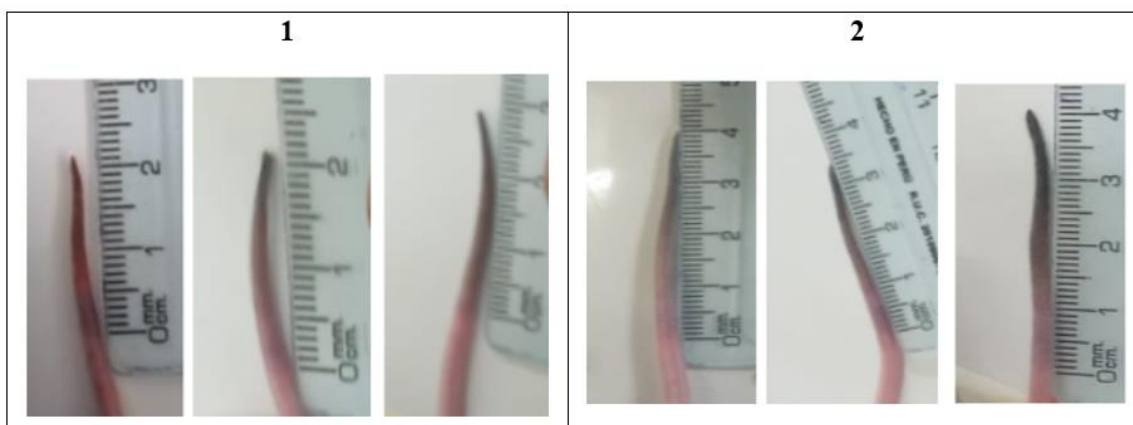


Figura 8. Fotografías a las 48 horas de las colas de los ratones inyectados con *k*-carragenano disuelto a diferentes temperaturas. Se preparó dos soluciones stock de *k*-carragenano 4 mg/ml disueltas en solución salina a 37 °C y 85 °C, las soluciones se administraron a 37 °C a una dosis de 20 mg/kg en dos grupos de ratones. Ratones con *k*-carragenano disuelto a 37 °C (1) y a 85 °C (2).

Tabla 7. Efecto de la temperatura de disolución del stock de *k*-carragenano a 4 mg/ml en solución salina. Porcentaje de trombosis en la cola de ratones inyectados con 20 mg/kg de *k*-carragenano preparado a partir de una solución stock de 4 mg/ml disuelta a 37 °C y 85 °C, las mediciones del porcentaje de trombosis se realizaron 48 horas después de administrar el *k*-carragenano.

	Longitud de la cola (cm)	Longitud de trombosis (cm)	% de Trombosis	Promedio del porcentaje de trombosis %	SD del porcentaje de trombosis %
Disolución de <i>k</i> -carragenano 4 mg/ml en solución salina a 37 °C (n=3)	9	2.2	24.4	26.5	5.3
	9.3	2.1	22.6		
	8.9	2.9	32.6		
Disolución de <i>k</i> -carragenano 4 mg/ml en solución salina a 85 °C (n=3)	9.2	4.2	45.7	42.9	4.8
	9.1	3.4	37.4		
	9	4.1	45.6		

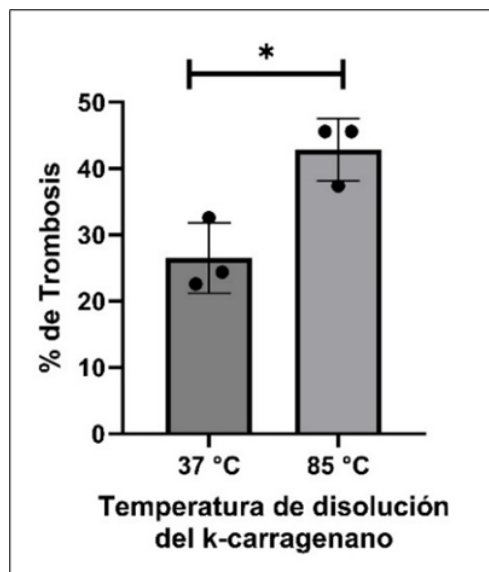


Figura 9. Efecto de la temperatura de disolución de 4 mg/ml de *k*-carragenano en solución salina sobre el porcentaje de trombosis en la cola. Se preparó dos soluciones stock de *k*-carragenano 4 mg/ml disueltas en solución salina a 37 °C y 85 °C, las soluciones se administraron a 37 °C a una dosis de 20 mg/kg en dos grupos de ratones. * p=0.0495

Efecto de la dosis de *kappa*-carragenano en el porcentaje de trombosis en las colas

Se midió el porcentaje de trombosis en las colas a las 48 horas de administrar *kappa*-carragenano 20 mg/kg a un grupo de ratones y 50 mg/kg a otro grupo (figura 10). El porcentaje de trombosis en las colas del grupo de ratones inyectados con la dosis de 20 mg/kg fue $59.8 \pm 14\%$, mientras que en el grupo de ratones inyectados con la dosis de 50 mg/kg fue $68.6 \pm 13\%$ (tabla 8). No se encontró diferencias significativas entre estos dos grupos, $p=0.5127$ (figura 11).

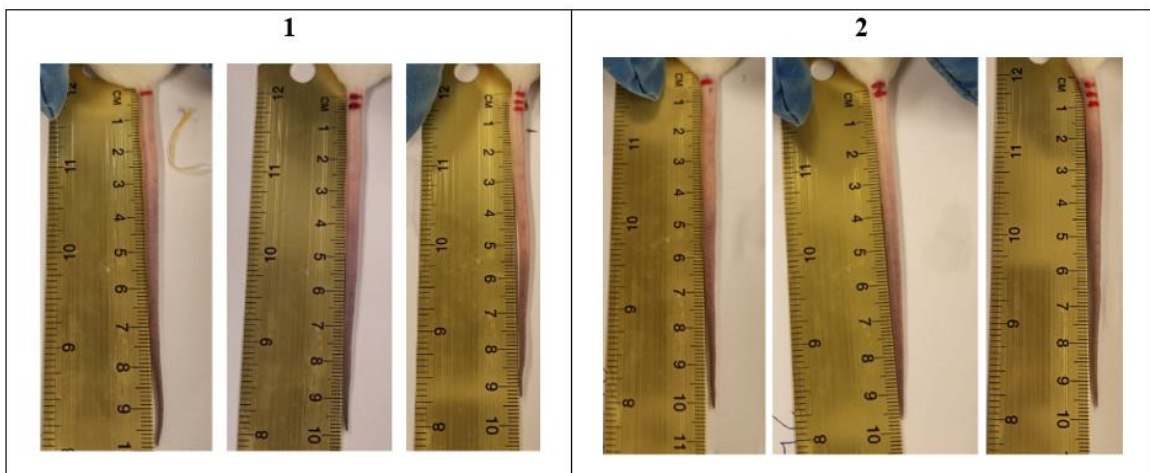


Figura 10. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones administrados con diferentes dosis de *k*-carragenano. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano 4 mg/ml disuelto en solución salina a 85 °C por diez minutos, a partir de esta solución se prepararon dos soluciones de inyección ajustadas a la dosis de 20 mg/kg y 50 mg/kg, las soluciones se mantuvieron a 37 °C hasta su administración. Se administró las soluciones a dos grupos de ratones, *k*-carragenano 20 mg/kg (1) y 50 mg/kg (2).

Tabla 8. Efecto de la dosis de *k*-carragenano administrado. Porcentaje de trombosis en la cola de ratones tratados con *k*-carragenano 20 mg/kg y 50 mg/kg, las mediciones del porcentaje de trombosis se realizaron 48 horas después de administrar el *k*-carragenano.

	Longitud de la cola (cm)	Longitud de trombosis (cm)	% de Trombosis	Promedio del porcentaje de trombosis %	SD del porcentaje de trombosis %
Dosis de 20 mg/kg de <i>kappa</i> -carragenano (n=3)	9.9	7.3	73.7	59.8	14.0
	10	6	60.0		
	9.2	4.2	45.7		
Dosis de 50 mg/kg de <i>kappa</i> -carragenano (n=3)	10	5.7	57.0	68.6	13.3
	9.6	6.3	65.6		
	9.5	7.9	83.2		

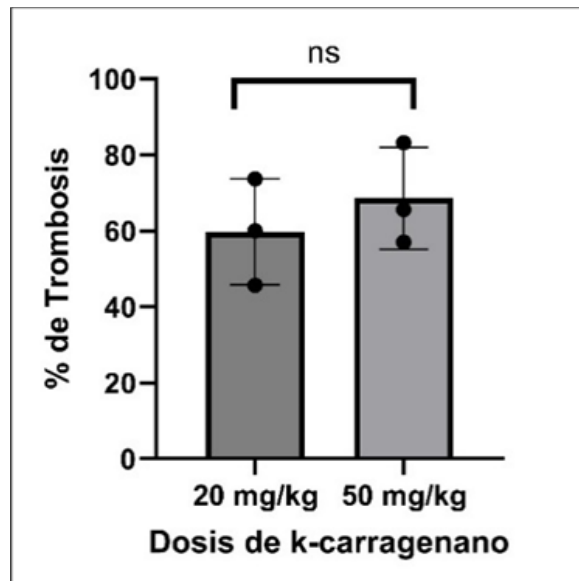


Figura 11. Efecto de la dosis de *k*-carragenano en el porcentaje de trombosis. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano 4 mg/ml disuelto en solución salina a 85 °C por diez minutos, a partir de esta solución se prepararon dos soluciones de inyección ajustadas a la dosis de 20 mg/kg y 50 mg/kg, las soluciones se mantuvieron a 37 °C hasta su administración. Se administró las soluciones a dos grupos de ratones, ns (no significativo, $p=0.5127$)

Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el porcentaje de trombosis

Se comparó el porcentaje de trombosis en la cola a las 48 horas, cuando los ratones fueron aclimatados por tres semanas a 24 °C y cuando estuvieron aclimatados a temperatura ambiente (figura 12). El porcentaje de trombosis en las colas de los ratones que fueron aclimatados a 24 °C fue $83.4 \pm 7.5 \%$, mientras que en las colas de los ratones aclimatados a temperatura ambiente fue $62.8 \pm 12.4\%$ (tabla 9). Se encontró diferencias significativas entre estos grupos de ratones, $p=0.0433$ (figura 13).

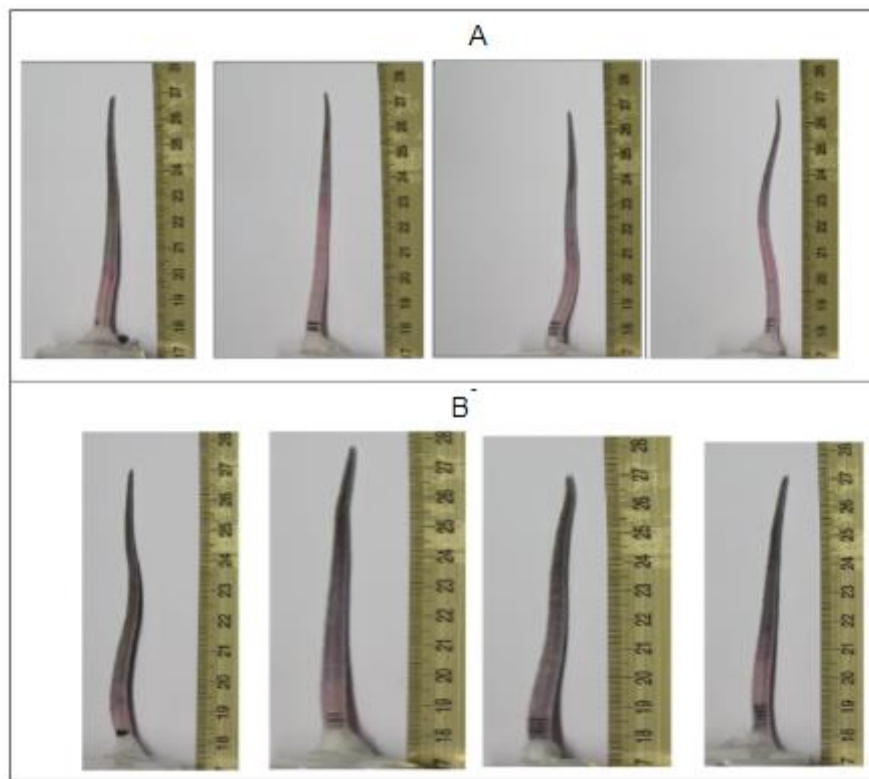


Figura 12. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones aclimatados a diferentes temperaturas. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano de 4 mg/ml disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 37 °C en dos grupos de ratones, un grupo había sido mantenido por 3 semanas a temperatura ambiente (A) y otro grupo a 24 °C (B).

Tabla 9. Efecto de la aclimatación de los ratones a diferentes temperaturas. Porcentaje de trombosis en la cola de ratones aclimatados por tres semanas a 24 °C y a temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron 48 horas después de administrar el *k*-carragenano 20 mg/kg.

	Longitud de la cola (cm)	Longitud de trombosis (cm)	% de Trombosis	Promedio del porcentaje de trombosis %	SD del porcentaje de trombosis %
Ratones aclimatados por tres semanas a temperatura ambiente (n=4)	9.1	7.1	78.0	62.8	12.4
	9.2	4.6	50.0		
	9.1	6.1	67.0		
	9.1	5.1	56.0		
Ratones aclimatados por tres semanas a 24 °C (n=4)	9.3	8.5	91.4	83.4	7.5
	9.7	8	82.5		
	9.4	8.1	86.2		
	9.1	6.7	73.6		

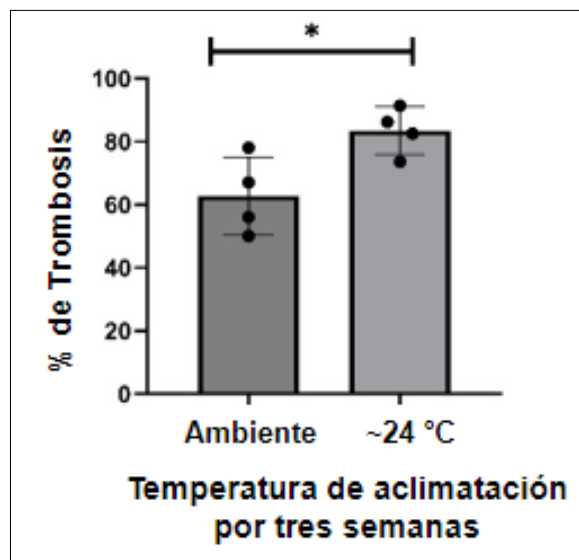


Figura 13. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el porcentaje de trombosis en la cola. Se preparó una solución stock de *k*-carragenano de 4 mg/ml disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 37 °C en dos grupos de ratones, un grupo había sido mantenido por 3 semanas a temperatura ambiente y otro grupo a 24 °C. * p=0.0433

Efecto de la temperatura de inyección del *k*-carragenano

Se comparó el porcentaje de trombosis a las 48 horas después de la administración del *k*-carragenano 20 mg/kg inyectado a una temperatura de 37 °C y 50 °C (figura 14). El porcentaje de trombosis en la cola de los ratones que recibieron el *k*-carragenano a 37 °C fue 74.4 ± 7.7 % y en el grupo que recibió la solución a 50 °C fue 90.9 ± 4 % (tabla 10). Se encontró diferencias significativas entre estos dos grupos de ratones, $p= 0.0090$ (figura 15).

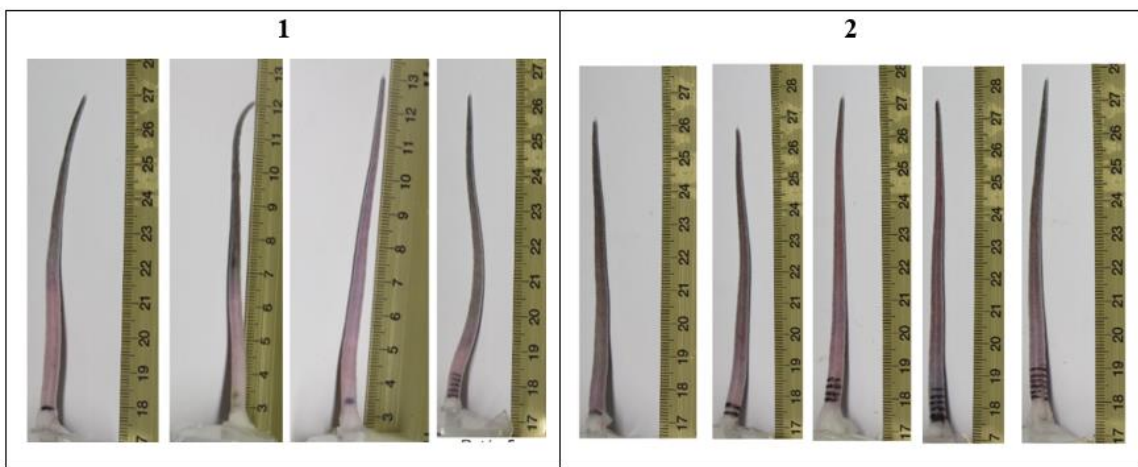


Figura 14. Fotografías a las 48 horas de las colas de ratones tratados con *k*-carragenano administrado a diferentes temperaturas. Se preparó una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 37 °C (1) y a 50 °C (2) en dos grupos de ratones que habían sido aclimatados por tres semanas a 24 °C.

Tabla 10. Efecto de la temperatura de administración del *k*-carragenano. Porcentaje de trombosis en la cola cuando la solución *k*-carragenano 20 mg/kg se administró a 37 °C y a 50 °C, las mediciones se realizaron 48 horas después de la administración del *k*-carragenano.

	Longitud de la cola (cm)	Longitud de trombosis (cm)	% de Trombosis	Promedio del porcentaje de trombosis %	SD del porcentaje de trombosis %
Temperatura de la solución de <i>kappa</i> carragenano administrada 37 °C (n=5)	9.2	5.9	64.1	74.4	7.7
	9.3	6.5	69.9		
	9.5	8	84.2		
	9.7	7.5	77.3		
	9.4	7.2	76.6		
Temperatura de la solución de <i>kappa</i> carragenano administrada 50 °C (n=5)	9.4	9.1	96.8	90.9	4.0
	9.8	9	91.8		
	10	9.1	91.0		
	10.5	9	85.7		
	10.2	9.1	89.2		

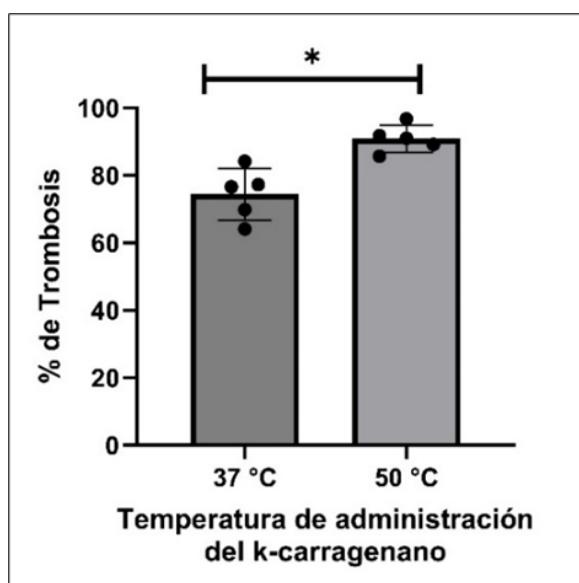


Figura 15. Efecto de la temperatura de administración del *k*-carragenano 20 mg/kg en el porcentaje de trombosis de la cola. Se preparó una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 37 °C y a 50 °C en dos grupos de ratones que habían sido aclimatados por tres semanas a 24 °C. *p=0.0090

CONFIRMACIÓN DE LA TROMBOSIS POR HISTOLOGÍA DE LA COLA

Se realizaron cortes de la cola de un ratón tratado con solución salina vía intraperitoneal y un ratón tratado con *k*-carragenano preparado a partir de una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en NaCl al 0.9 % a 85 °C por diez minutos; ambas soluciones se administraron a 50 °C. Después de la administración, los ratones se mantuvieron a 20 °C por 48 horas, se cortó la cola en este tiempo. Los cortes de las colas teñidas con eosina y hematoxilina muestran que la cola del ratón tratado con *k*-carragenano presenta trombos en los vasos, mientras que los cortes de la cola del ratón tratado con solución salina no presentan coágulos (figura 16).

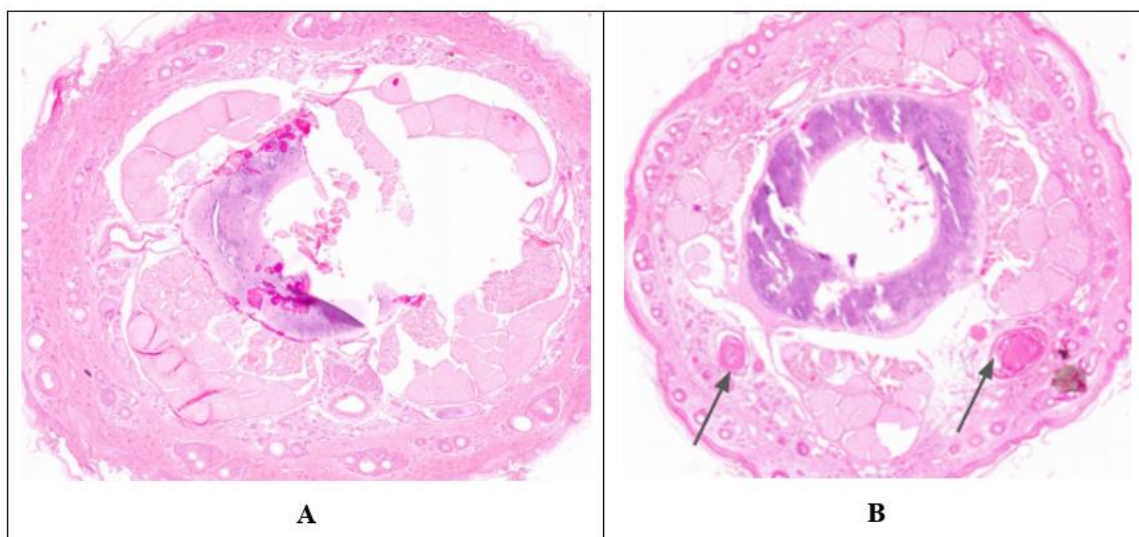


Figura 16. Confirmación de la trombosis en las colas mediante histología de cortes de las colas teñidas con Eosina y Hematoxilina. Cortes a la mitad de la cola de un ratón tratado con NaCl 0.9 % (A) y un ratón tratado con *k*-carragenano 20 mg/kg (B). Las flechas indican la localización de los trombos en los vasos sanguíneos.

PRUEBA DE TROMBÓLISIS CON LAS ENZIMAS FhT y rFhT

Se comparó el porcentaje de trombosis en la cola de ratones que fueron inyectados con *k*-carragenano 20 mg/kg y 30 minutos después tratados con solución salina 0.9 %, uroquinasa 40 mg/kg, rFhT 20 mg/kg, FhT 20 mg/kg. El porcentaje de trombosis en el grupo control negativo (solución salina) fue 92.8 ± 11.2 %, en el control positivo (uroquinasa) 51.6 ± 18.6 , en el grupo tratado con rFhT 58.2 ± 13.1 % y en el grupo con FhT 59.4 ± 28.2 (Tabla 11). En la figura 15 se muestra la gráfica del porcentaje de trombosis obtenido en cada grupo de tratamiento, la prueba de Dunn encontró diferencias significativas en el porcentaje de trombosis entre el grupo control negativo y el grupo control positivo ($p=0.0294$) y entre el grupo control negativo y el grupo tratado con rFhT ($p=0.0382$). No se encontró diferencias significativas entre el grupo control negativo y el grupo tratado con la enzima nativa ($p=0.1202$).

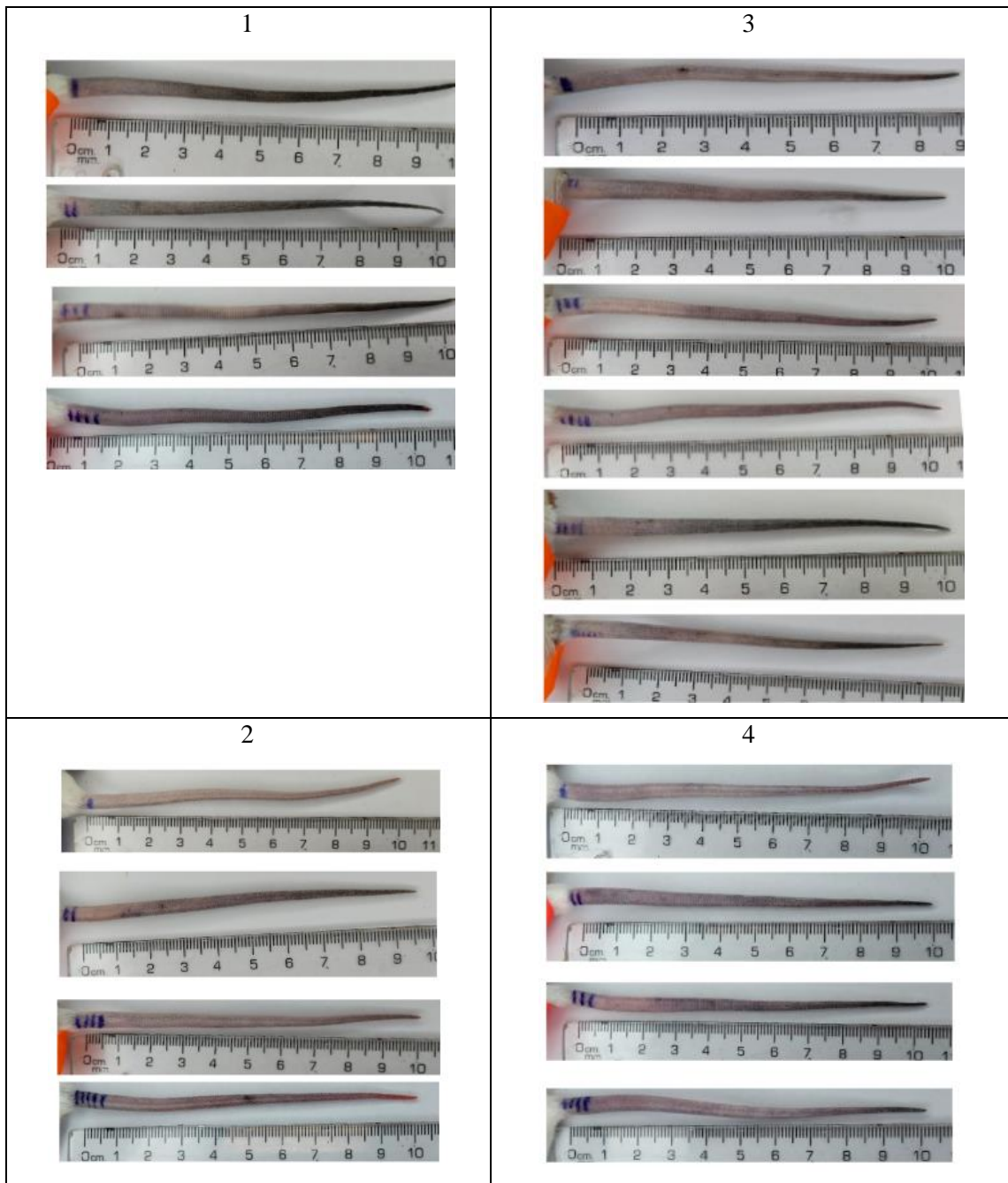


Figura 17. Fotografías de las colas de ratones a las 48 horas de la inducción de la trombosis y de la administración de los tratamientos. Se preparó una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 50 °C en ratones que fueron aclimatados por tres semanas a 24 °C. Treinta minutos después de la administración i.p de *k*-carragenano, se inyectaron los tratamientos en la vena de la cola, NaCl 0.9 % (1), Uroquinasa 40 mg/kg (2), rFhT 20 mg/kg (3) y FhT 20 mg/kg (4).

Tabla 11. Porcentaje de trombosis después del tratamiento con las enzimas fibrinolíticas. Treinta minutos después de la administración del *k*-carragenano, los ratones fueron tratados con solución salina 0.9 %, Uroquinasa 40 mg/kg, rFhT 20 mg/kg y FhT 20 mg/kg.

	Longitud de la cola (cm)	Longitud de trombosis (cm)	Porcentaje de trombosis (%)	Promedio del Porcentaje de trombosis (%)	SD del Porcentaje de trombosis (%)
Solución salina (n=4)	10.3	10	97.1	92.9	11.2
	10.4	10.2	98.1		
	10.5	8	76.2		
	10.3	10.3	100.0		
Uroquinasa 40 mg/kg (n=4)	10.4	3	28.8	51.6	18.6
	10.2	7.5	73.5		
	10.5	5	47.6		
	10.6	6	56.6		
rFhT 20 mg/kg (n=6)	9.5	3.5	36.8	58.2	13.1
	10.2	5.5	53.9		
	10.7	6.5	60.7		
	10.6	7.4	70.0		
	10.4	7.6	73.0		
	10.1	5.5	54.5		
FhT 20 mg/kg (n=4)	10.5	3.5	33.3	59.4	28.2
	10.4	9.5	91.3		
	10.7	8	74.8		
	10.5	4	38.1		

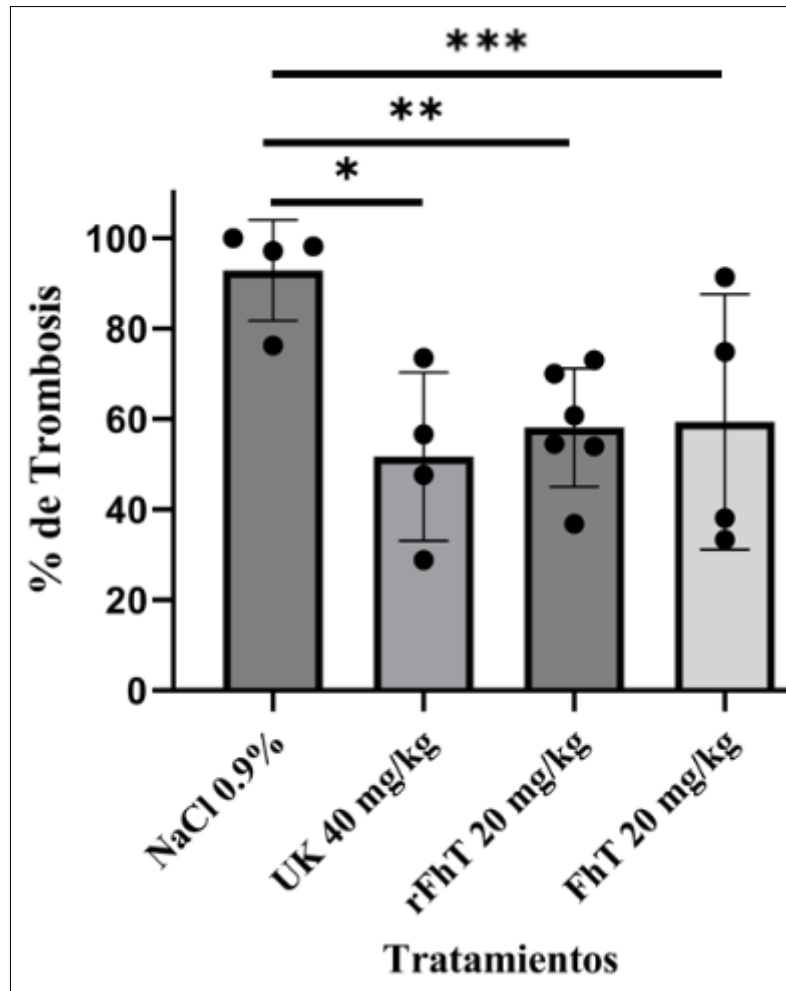


Figura 18. Efecto de los tratamientos en el porcentaje de trombosis. Se preparó una solución stock de 4 mg/ml de *k*-carragenano disuelta en solución salina a 85 °C, a partir de esta solución se preparó una solución de inyección ajustada a la dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano, la solución se administró a 50 °C en ratones que fueron aclimatados por tres semanas a 24 °C. Treinta minutos después de la administración i.p de *k*-carragenano, se inyectaron los tratamientos en la vena de la cola, NaCl 0.9 %, uroquinasa 40 mg/kg, rFhT 20 mg/kg y FhT 20 mg/kg. * $p= 0.0294$, ** $p= 0.0382$, *** $p= 0.1202$

VII. DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis fue evaluar la actividad trombolítica de FhT y rFhT en un modelo de trombosis inducido por *k*-carragenano en la cola de los ratones Balb/c. Se establecieron las condiciones experimentales óptimas del modelo. El primer punto considerado fue la temperatura de disolución del agente inductor de la trombosis. Los resultados mostraron una mayor longitud de la trombosis cuando el *k*-carragenano a 4 mg/ml se disolvió a 85 °C. Se comparó el efecto de dosis de *k*-carragenano (20 mg/kg y 50 mg/kg) en el porcentaje de trombosis en la cola, no se encontró diferencias significativas entre los ratones que recibieron estas dosis. Se evaluó el efecto de la aclimatación sobre el porcentaje de trombosis, los ratones que fueron aclimatados durante tres semanas a más de 24 °C mostraron un mayor porcentaje de trombosis en la cola con respecto a los que fueron aclimatados a temperatura ambiente. El *k*-carragenano se administró vía intraperitoneal a los ratones a diferentes temperaturas (37 °C y 50 °C), se obtuvo un mayor porcentaje de trombosis con menor desviación estándar cuando se administró a 50 °C, sugiriendo que esta temperatura favorece una mejor absorción del agente. En conjunto, se logró establecer las condiciones óptimas para la formación de trombosis en la cola de ratones. Se confirmó la generación de trombos en el modelo optimizado mediante histología de la cola, los ratones inyectados con *k*-carragenano 20 mg/kg vía intraperitoneal tenían coágulos en las venas de las colas, mientras que los ratones inyectados con solución salina tenían las venas sin coágulos.

Un estudio utilizó *k*-carragenano 15 mg/kg para inducir trombosis en la cola de ratones, obtuvieron una longitud de trombosis de 5.6 cm, la inyección del agente fue vía subcutánea y no mencionan qué otras condiciones utilizaron [40]. En otro artículo, se administró en las patas traseras de los ratones 40 µl de una solución de *k*-carragenano 1%, utilizaron 0.4 mg de *k*-carragenano por ratón, mientras que en esta tesis se utilizó 0.8 mg por ratón de 40 gramos, obtuvieron una longitud de trombosis de 4 cm [41]. En dos estudios administraron vía intraperitoneal *k*-carragenano 50 mg/kg y 100 mg/kg, obtuvieron porcentajes de trombosis del 70 % y 80 % respectivamente [42, 43]. En una investigación, se administró *k*-carragenano 20 mg/kg a ratones aclimatados por 3 semanas a 24 °C y mantenidos a 20 °C después de la administración del *k*-carragenano, el porcentaje de trombosis que obtuvieron a las 48 horas fue 92 % [29]. Este resultado es

concordante con los resultados obtenidos en esta tesis, sugiriendo que la temperatura aclimatación es un factor que afecta el grado de trombosis en la cola de los ratones inducido por *k*-carragenano y que el cambio de temperatura podría gatillar una mejor inducción de la trombosis. La temperatura ambiental fría puede llevar a una mayor coagulación mediante el aumento de la presión arterial, vasoconstricción periférica, un mayor recuento de plaquetas y el aumento de la viscosidad de la sangre [44].

Las enzimas FhT y rFhT presentan parámetros cinéticos similares [16]. Sin embargo, solo rFhT mostró diferencias significativas en el porcentaje de trombosis. La actividad específica de las enzimas inyectadas a los ratones fue similar, pero no sabemos cómo se comportan las enzimas *in vivo*, ya que una se purifica a partir del producto E/S de un agente biológico, y la otra se obtiene mediante fermentación en *P. pastoris*, la estabilidad de estas proteínas puede variar.

Un estudio utilizó el modelo de trombosis en cola de rata para evaluar la actividad trombolítica de una cisteína proteasa extraída del látex del higo, denominada ficina, el grupo inducido a trombosis e inyectado con 10 U/kg de ficina tuvo una longitud de trombosis de 9 cm, mientras que el control inducido a trombosis e inyectado con el vehículo tuvo 12 cm [45]. El estudio anterior es el único que evaluó la actividad trombolítica en el modelo de trombosis con *k*-carragenano de una enzima que pertenece a la familia de las cisteína proteasas, la mayoría de estudios se realizaron en serina proteasas. El grupo de Hassan encontró dos serinas proteasas HtrA que degradan coágulos de fibrina *in vitro* e *in vivo*, con una dosis de 40 mg/kg de HtrA1 obtuvieron un 17 % de porcentaje de trombosis, el control un 98.5 % de trombosis, y con uroquinasa 47 % [29].

Se implementó el modelo de *k*-carragenano de forma eficiente. Los ratones no murieron después de la administración de las enzimas FhT y rFhT a la dosis de 20 mg/kg cada una. Las limitaciones de este estudio son el bajo número de animales, la falta de información sobre el tiempo de vida media de las enzimas FhT y rFhT y que el modelo de trombosis generado requiere un método que permita corroborar de forma objetiva el efecto trombolítico de esta enzima como la medición del flujo sanguíneo en las colas después de aplicar los tratamientos, la medición de los productos de degradación de fibrina y la histología de la cola.

VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo 13.2 mg de FhT a partir de 320 ml del producto E/S de un agente biológico.
- Se obtuvo 22.2 mg de rPro-FhT a partir de un litro de cultivo.
- Los ratones tuvieron un porcentaje de trombosis en la cola de 90 ± 4 % con las condiciones de aclimatación a 24 °C por tres semanas, la disolución de 4 mg/ml de *k*-carragenano a 85 °C y administración vía intraperitoneal a 50 °C a una dosis de 20 mg/kg de *k*-carragenano.
- Los ratones inducidos a trombosis con *k*-carragenano y tratados con rFhT 20 mg/kg tuvieron un porcentaje de trombosis en la cola significativamente menor (58.2 ± 13.1 %) en comparación con los ratones inducidos a trombosis y tratados con solución salina (92.8 ± 11.2 %), $p=0.0382$.
- Los ratones inducidos a trombosis con *k*-carragenano y tratados con FhT 20 mg/kg no tuvieron diferencias significativas en el porcentaje de trombosis (59.4 ± 28.2 %) en comparación con los ratones inducidos a trombosis y tratados con solución salina (92.8 ± 11.2 %), $p=0.1202$.

IX. SUGERENCIAS

- Se sugiere repetir la prueba en un mayor número de animales para corroborar el efecto trombolítico de la proteína rFhT.
- Se sugiere realizar ensayos que permitan corroborar el efecto trombolítico de las proteínas fibrinolíticas después del tratamiento con las enzimas, como la medición del flujo sanguíneo en la cola, la medición de los productos de degradación de fibrina mediante ELISA o histología de las colas.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO: Cardiovascular diseases [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2023 Nov 30]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. PAHO: Cardiovascular disease burden in the Region of the Americas, 2000-2019 [Internet]. Washington: Pan American Health Organization; 2021 [cited 2023 Nov 30]. Available from <https://www.paho.org/en/enlace/cardiovascular-disease-burden>
3. Alkarithi G, Duval C, Shi Y, Macrae F. Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2021; 41(9): 2370–2383.
4. Wolberg S, Rosendaal F, Weitz J, Jaffer I, Agnelli G, Baglin T et al. Venous thrombosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 150.
5. Maegerlein C, Friedrich B, Berndt M, Lucia KE, Schirmer L, Poppert H, et al. Impact of histological thrombus composition on preinterventional thrombus migration in patients with acute occlusions of the middle cerebral artery. *Interv Neuroradiol*. 2018; 24:70–75.
6. Periyah M, Halim A, Mat Saad A. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2017; 11(4): 319–327.
7. Poole L, Kopec A, Groeneveld D, Pant A, Baker K, Cline H, et al. Factor XIII cross-links fibrin(ogen) independent of fibrin polymerization in experimental acute liver injury. *Blood*. 2021; 137(18): 2520–2531.
8. Singh R, Gautam P, Sharma C, Osmolovskiy A. Fibrin and Fibrinolytic Enzyme Cascade in Thrombosis: Unravelling the Role. *Life*. 2023; 13(11): 2196.
9. Risman R, Kirby N, Bannish B, Hudson N, Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2023; 7(2): 100081.
10. Daley M, Murthy M, Peterson E. Bleeding risk with systemic thrombolytic therapy for pulmonary embolism: scope of the problema. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. 2015; 6(2): 57-66.

11. Gurewich V. Therapeutic Fibrinolysis: How Efficacy and Safety Can Be Improved. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016; 68(19): 2099–2106.
12. Klabunde R. Thrombolytic (Fibrinolytic) Drugs [Internet]. Available from: <https://cvpharmacology.com/thrombolytic> [Accessed 15 December 2023]
13. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013; 97(15): 6647–6665.
14. Kazemali M, Majidzadeh A, Sardari S, Saadatirad A, Khalaj V, Zarei N, et al. Design of a novel chimeric tissue plasminogen activator with favorable Vampire bat plasminogen activator properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014; (67): 82–86.
15. Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M, et al. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *The Japanese Journal of Physiology*. 1991; 41(3): 461–472.
16. Sharma C, Osmolovskiy A, Singh R. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: Production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11): 1880–1911.
17. Silva M, Schattner M, Ramos C, Junqueira I, Guarnieri M, Lazzari M, et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: Characterization and molecular cloning. *The Biochemical Journal*. 2003; 369(1): 129–139.
18. Espinoza JA. Cisteína proteínasa FhT: Caracterización bioquímica, cinética y estructural [Tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2013.
19. Verma, S, Dixit R, Pandey K. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Frontiers in pharmacology*. 2016; 7: 107.
20. Buiza Y. Expresión, caracterización bioquímica y determinación de la actividad fibrinolítica de la proteína recombinante FhT (rFhT) [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2023.
21. Delgado S. Determinación de la actividad fibrinolítica de la cisteína protease FhT [Tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2001.

22. Raman M, Doble M. κ -Carrageenan from marine red algae, *Kappaphycus alvarezii* – A functional food to prevent colon carcinogenesis. *Journal of functional foods*. 2015; 15: 354-364
23. Bekemeier H, Hirschelmann R, Giessler A. Carrageenin-induced thrombosis in rats and mice: A model for testing antithrombotic substances? *Agents and Actions*. 1985; 16: 446–451.
24. Lee M, Kim D, Park S, Yun J, Lee J. Antarctic Krill Oil Ameliorates Monosodium Iodoacetate-Induced Irregularities in Articular Cartilage and Inflammatory Response in the Rat Models of Osteoarthritis. *Nutrients*. 2020; 12: 3550.
25. Majumdar S, Chattopadhyay P, Mukherjee A. *In Vivo* Anticoagulant and Thrombolytic Activities of a Fibrinolytic Serine Protease (Brevithrombolase) With the κ -Carrageenan-Induced Rat Tail Thrombosis Model. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2016; 22(6): 594-598.
26. Xu J, Du M, Yang X, Chen Q, Chen H, Lin D. Thrombolytic effects *in vivo* of nattokinase in a carrageenan-induced rat model of thrombosis. *Acta haematologica*. 2014; 132(2), 247–253.
27. Albadawi H, Witting A, Pershad Y, Wallace A, Fleck A, Hoang P, et al. Animal models of venous thrombosis. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2017; 3: 197-206.
28. Hagimori M, Kamiya S, Yamaguchi Y, Arakawa M. Improving frequency of thrombosis by altering blood flow in the carrageenan-induced rat tail thrombosis model. *Pharmacological research*. 2009; 60(4): 320–323.
29. Hassan M, Sharmin S, Kim H, Hong S. Identification and Characterization of Plasmin-Independent Thrombolytic Enzymes. *Circulation research*. 2021; 128(3): 386–400.
30. Córdova M, Herrera P, Nopo L, Bellatin J, Guerra H, Espinoza J. Fasciola hepatica cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 57(6): 660-666.
31. Kukor Z, Mayerle J, Kruger B, Toth M, Steed P, Halangk W, et al. Presence of Cathepsin B in the Human Pancreatic Secretory Pathway and Its Role in Trypsinogen Activation during Hereditary Pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (27): 21389-21396

32. Ning N, Xi-Wang L, Ya-Jun L, Isam M, Guang L, Ji Y. Preventive Effect of Aspirin Eugenol Ester on Thrombosis in κ -Carrageenan-Induced Rat Tail Thrombosis Model. *Plos one*. 2015; 10 (7): 133
33. Imeson A. Carrageenan and furcellaran. *Handbook of Hydrocolloids*. 2 ed: Food in science; 2009; pg 164-185.
34. Fritzen M, Schuhmann W, Lengeler J, Schmidt H. Immobilized Transport Mutants of Bacterial Cells in Biosensor Arrays. Improved Selectivity for the Simultaneous Determination of Glucose and Lactose. *Progress in Biotechnology*. 1996; 11:821-827.
35. Chung B, Lanyang J, Hang Q, Zhenyu W. A Novel Polysaccharide from *Auricularia Auricula* Alleviates Thrombosis Induced by Carrageenan in Mice. *Molecules*. 2022; 27 (15): 4831.
36. Wang P, Tan F, Mu J, Chen H, Zhao X, Xu Y. Inhibitory Effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KSFY07 on *Kappa*-Carrageenan-Induced Thrombosis in Mice and the Regulation of Oxidative Damage. *Cardiovascular therapeutics*. 2022; 4: 4415876.
37. Zhang B, Huang R, Yang D, Chen G, Chen Y, Han J, et al. Combination of Colchicine and Ticagrelor Inhibits Carrageenan-Induced Thrombi in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 17: 30871
38. choell A, Heyde B, Weir D, Chiang P, Hu Y, Tung D. Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. 2009; *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48(5): 506–511.
39. Zhou X, Shang G, Tan Q. Effect of *Lactobacillus fermentum* TKSNO41 on improving streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Function*. 2021; 12(7):7938–7953.
40. Yan F, Yan J, Sun W, Yao L, Wang J. Thrombolytic effect of Subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice. *J Thromb Thrombolysis*. 2009; 28 (4):444-448.
41. Eunjung S, Kim S, Yang W, Kim D, Cha J. Antiplatelet mechanism of an herbal mixture prepared from the extracts of *Phyllostachys pubescens* leaves and *Prunus mume* fruits. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17(1): 541.

42. Li Q, Chen Y, Zhao D, et al. LongShengZhi Capsule reduces carrageenan-induced thrombosis by reducing activation of platelets and endothelial cells. *Pharmacological Research*. 2019; 144: 167-180.
43. Xiaohan W, Zhang B, Wei F, et al. Gegen Qinlian pills alleviate carrageenan-induced thrombosis in mice model by regulating the HMGB1/NF- κ B/NLRP3 signaling. *Phytomedicine*. 2022; 100:154083.
44. Lavados P, Olavarria V, Hoffmeister L. Ambient Temperature and Stroke Risk. *Stroke*. 2018; 49: 255-261.
45. Yan H, Hwang D, Loganathan R, Kim H, Hong D, Kim S, et al. Exploring the Fibrin(ogen)olytic, Anticoagulant, and Antithrombotic Activities of Natural Cysteine Protease (Ficin) with the κ -Carrageenan-Induced Rat Tail Thrombosis Model. *Nutrients*. 2022; 14(17): 3552.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Constancia de renovación de la aprobación del comité de ética institucional UPCH



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEA-R-034-08-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité de ética aprobó la **RENOVACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del proyecto : **“Modelo de trombosis en la cola de ratón inducido por k-carragenano para el estudio del agente fibrinolítico FhT in vivo”**

Código de inscripción : **203799**

Investigador(a) principal(es) : **Pereda Salguero, Mabel Patricia**

Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada **6 meses** el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el **23 de agosto del 2023** hasta el **22 de agosto del 2024**.

Así mismo el Comité toma conocimiento del Informe Periódico de Avances del estudio de referencia. Documento recibido en fecha 15 de agosto del 2023.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, **23 de agosto del 2023**.



Dr. Manuel Gasco Tantachuco
Presidente

Comité Institucional de Ética para el uso de Animales