

Activación y comparación cinética del Plasminógeno Equino con el Plasminógeno humano

Cañas Bermúdez. O. ¹ Quijano Parra. A. ² Arbeláez Ramírez. L. F. ¹

¹ Facultad de Salud, Grupo de investigación en Biomoléculas. Universidad de Pamplona,

² Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química. Universidad de Pamplona,
luifer@unipamplona.edu.co

Recibido 19 Febrero de 2007

Aceptado 10 Abril 2007

ABSTRACT

The plasminogen molecule is the zymogen of the plasmin proteinases which is involved in Fibrinolysis. Both human and equine plasminogens are activated by urokinase and these activators cannot exceed 15 minutes of incubation time. This was determined by electrophoresis in which the formation of the A and B chains corresponding to the heavy and light chains of the plasmin with 64 and 28 Kda respectively were visualized.

The parameters of the Lineweaver-Burk curve made with constant enzymatic concentrations and an increased concentration of substrate demonstrated a K_m of 2.06 mM and 2.2 mM for the equine and human plasminogen respectively. The human Pg evidenced a higher V_{max} determined as 44.18×10^{-3} and 37.53×10^{-3} for the equine Pg.

KEY WORDS

Hemostasia, Plasmin, Urokinase, Glu-plasminogen, Fibrinolysis

RESUMEN

El plasminógeno (Plg) es el zimogeno de la Plasmina (Pli), enzima involucrada en la fibrinólisis. Los dos Plgs fueron activados por la urokinasa (UK) y se determino que dicha activación no puede superar los 15 minutos de incubación. Lo cuál fue identificado y determinado por electroforesis en la formación de las cadenas A y B correspondientes a las cadenas pesada y liviana con 64 y 28 KDa respectivamente. Los parámetros de la curva de Lineweaver-Burk bajo concentraciones constantes de enzima y ascendentes de sustrato demostraron una K_m de 2.06 mM y 2.2 mM para la equina y humana respectivamente, mostrando la equina una mayor afinidad, mientras la humana tiene una mayor V_{max} determinada en 44.18×10^{-3} y 37.53×10^{-3} para el equino.

PALABRAS CLAVES

Hemostasia, Plasmina, Urokinasa, Glu-plasminógeno, Fibrinólisis

INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo fisiológico que mantiene la sangre en un estado fluido dentro de la circulación (MANN et al; 1999), la coagulación sanguínea es mediada por componentes celulares y proteínas solubles del plasma, en respuesta a un daño vascular. La adhesión de plaquetas circulantes y agregados plaquetarios proveen una superficie celular para el ensamblaje de complejos enzimáticos del coagulo sanguíneo. La vía extrínseca de la coagulación sanguínea es iniciada cuando la sangre es expuesta al factor tisular el cuál en el espacio subendotelial o presentado en otras células sanguíneas (NEMERSON et al, 1988), en complejo con el factor VII activado (FVIIa), activa los factores IX de la vía intrínseca y X de la vía común de la coagulación. El factor IX activado (FIXa) por la vía del factor tisular, activa adicionalmente al factor X, en una reacción que es acelerada por el factor VIII (MANN et al; 1999), una vez activado, el factor X convierte la protombina a trombina (Factor IIa) en una reacción que es catalizada por el factor V activado (FVa). En el paso final de la vía común de la coagulación, la trombina hidroliza los fibrinopéptidos AA y BB de las cadenas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ del fibrinógeno para generar monómeros de fibrina, los cuáles polimerizan formando la malla de fibrina que estabiliza el coagulo, los cuales a su vez son estabilizados por enlaces covalentes gracias al factor XIIIa (LORAND, 2000).

La activación del sistema fibrinolítico es dependiente de la conversión del zimogeno plasmático Plasminógeno (Plg), a la serina proteasa plasmina (Pli) por los activadores fisiológicos como el activador del Plasminógeno tipo urokinasa (u-PA) o activador tisular del plasminógeno (t-PA), la función primaria de la Pli es la degradación de la fibrina pero también está involucrada en la activación de las matriz metalo proteinasas en la migración celular, embriogenesis, cicatrización, angiogenesis, diseminación, crecimiento tumoral, entre otros (CASTELLINO et al, 2005).

Mientras que el Plg humano es sintetizado como una cadena polipeptídica de 810 amino ácidos (a.a.) la forma madura de esta proteína está constituida por 791 a.a. debido al rompimiento de los primeros 19 a.a. durante su secreción (FORSGREN M, et al, 1987). El hígado es el órgano primario que sintetiza el Plg (BOHMFALK and FULLER; 1980, RAUM, et al, 1980, SAITO, et al, 1980) y su concentración plasmática en el ser humano es de 2 μ M (WALLÉN, 1980), su peso molecular incluyendo los carbohidratos (CASTELLINO, et al, 1973), ha sido determinado en 92.000 y 82.000 Da para Glu y Lys-Plg respectivamente (WALLÉN; 1980). La conversión del Plg humano a Pli por acción de la urokinasa (UK), involucra el rompimiento de Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² resultando en la generación de Glu-Pli (OGSTON, 1980), compuesta por dos cadenas, la cadena pesada (A) compuesta por 561 a.a. unido por un puente disulfuro a la cadena ligera (B) que contiene 230 a.a.

La triada catalítica está localizada en la cadena liviana y consiste de His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹. Otra reacción proteolítica de relevancia fisiológica es la degradación de 77 a.a. de Glu¹-Pli a Lys⁷⁸-Pli. (VIOLAND and CASTELLINO, 1976). Así mismo se le han determinado “sitios de unión a la lisina” o análogos de la lisina los cuales llevan un grupo amino y un grupo carboxilo, como la arginina y el ácido epsilon amino caproico (ϵ -ACA). Un sitio fuerte y cinco débiles de unión a la lisina fueron determinados (MARKUS et al, 1978), asumiendo que uno de los sitios de baja afinidad representa el sitio activo, los otros cinco corresponden bien con los cinco dominios Kringles en la cadena-A del Plg (SOTTRUP-JENSEN et al, 1978). Las uniones del Plg a la fibrina, α_2 -AP, y trombospondina son mediadas por estos kringles (HOYLAERTS, et al, 1981, LIJNEN, et al, 1980, SILVERSTEIN, et al, 1984, WIMAN and COLLEN, 1979, WIMAN and WALLEN; 1977).

La activación del Plg a Pli es de importancia fisiológica para la disolución del coagulo y el estudio cinético de otros Plgs diferentes al humano de importancia clínica e investigativa.

El complejo formado entre enzima-sustrato y la concepción de este esquema fue propuesto por Michaelis y Menten (MICHAELIS and MENTEN, 1913). Las ecuaciones implicadas en la cinética enzimática han sido estudiadas anteriormente en otras especies (CAÑAS, et al, 2006).

En este estudio se compara la cinética del humano con la cinética del equino, estudio que nos indicara cuál de las Plis es más adecuada para uso diagnóstico en los laboratorios clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), ϵ -ACA y ácido clorhídrico de (Fabroquim), cloruro de sodio (NaCl), dimetil-sulfoxido (DMSO) y acetato de sodio anhidro de (Riedel-de-Haën), N,N'-Metilen-bisacrilamida, persulfato de amonio, β -mercaptoetanol, sodio dodecyl sulfato (SDS), urea de (Biorad), di-hidrógeno fosfato de sodio dihidratado de (Merck), lisina-sefariosa-4B de (Amersham Biosciences), ácido acético concentrado de (Baker), sustrato cromogénico para plasmina Spectrozyme y UK (110.000 UI/ml) de (Amdia), el volumen utilizado de sustrato fue el mismo para todas las pruebas (60 μ l) a una concentración de 0.3 mM, estándar de peso molecular: 180 KDa (α_2 -macroglobulina), 92KDa (Glu-Plg), 66 KDa (cadena- α , fibrinógeno humano), 52 KDa (cadena- β , fibrinógeno humano), 46 KDa (cadena- γ , fibrinógeno humano), 23.8 KDa (Tripsina), y agua tipo 3 de (Laboratorio de investigación en Biomoléculas-Universidad de Pamplona).

TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El plasma Humano fue suministrado por el Hospital Erasmo Meoz de la ciudad de Cúcuta-Colombia, analizado y certificado libre de antígenos como hepatitis, VIH, Chagas y otras enfermedades infecciosas.

La muestra del plasma equino se tomó en la Granja Experimental Villa Marina, propiedad de la Universidad de Pamplona, por un médico

veterinario, utilizando bolsas para extracción sanguínea con solución anticoagulante de citrato, fosfato, dextrosa y adenina (CPDA-1) de (BAXTER), a la sangre obtenida de esta manera, se le añadió PMSF disuelto en DMSO, a una concentración final de 1mM, con el fin de inhibir la actividad de las serino proteasas. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y el plasma separado por centrifugación a 7.000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C.

PURIFICACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

Los Plgs de las dos especies mamíferas fueron purificados por cromatografía de afinidad en Lisina-sefariosa según el método de Deutsch y Mertz (DEUTSCH and MERTZ, 1970), en una columna de 8x2.5 cm (Biorad), equilibrada con tres volúmenes del buffer 0.1 M fosfato 0.15 M de NaCl pH 7.3 (PBS), a una rata de flujo de 2 ml/min. se aplicaron 200 ml de plasma para cada una de las dos especies, posteriormente la columna se lavo con 75 ml de PBS, hasta que la absorbancia A_{280} fue 0.01, se eluyó con 100 ml de PBS que contenían 0.05M ϵ -ACA y colectado en fracciones de 3 ml en cada tubo, la concentración fue determinada utilizando el coeficiente absorción de $(\epsilon^{1\%})_{1\text{cm}} = 1.6$ (APPEL, et al, 1994), los Plgs fueron concentrados en una celda Amicon utilizando membranas de celulosa regenerada de 10 kDa, a aproximadamente 1 mg/ml, luego se dializaron toda la noche a 4°C con buffer 0.06M Tris, 0.06M NaCl, 0.02M HCl pH 8.5. Buffer (A) en una manguera de diálisis de 25 mm.

Posteriormente los Plgs obtenidos, fueron separados por cromatografía de cambio iónico según el método de Cañas (CAÑAS, et al, 2006), en una columna de 5x2.5 cm (Biorad), empacada con 4 ml de DEAE sepharose y equilibrada con Buffer A. La muestra fué adicionada y lavada con buffer A hasta obtener una absorbancia 0.01. Se eluyó con un gradiente lineal usando Buffer A y 0.07M Tris, 0.22M NaCl, 0.06M HCl pH 7.5 buffer (B), fue colectada en fracciones de 3 ml a una rata de flujo de 1.5 ml/min. la concentración del Plg

fue determinada y las muestras fueron concentradas como se realizó en la cromatografía de afinidad y almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE al 10% (LAEMMLI, 1970). Las muestras de Plg de $5\ \mu\text{g}$ fueron mezcladas con el buffer de muestra en un volumen 1:1 (vol/vol), fueron tratadas térmicamente por 5 minutos a 100°C y fueron visualizadas por tinción de Azul brillante de Comassie. El marcador de peso molecular que se utilizó se describe en materiales y métodos.

ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

Se utilizó 1 ml con una concentración de 1 mg/ml para cada uno de los Plgs a una temperatura constante de 37°C , a los cuáles se les adicionó $6.72\ \mu\text{l}$ de UK para una concentración final de 739.2 UI/ml "Solución activada".

Se monitoreó espectrofotométricamente A_{405} así: se tomaron 8 tubos con $60\ \mu\text{l}$ de sustrato equivalentes a los diferentes tiempos de incubación, (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 15 minutos) a los cuales se les adicionaron $3\ \mu\text{l}$ de la "solución activada", se dejó reaccionar por 12 segundos, la reacción se detuvo con la adición de $10\ \mu\text{l}$ de buffer acetato (BA) 4 M pH 3.8.

Al minuto 15, la activación de los Plgs se detuvo adicionando a las soluciones del Plg activado, $323\ \mu\text{l}$ de glicerol al 100%, de tal manera que la concentración de glicerol final fue de 25%. La muestra activada, se homogenizó y se marcó con el número de lote correspondiente, se alicuotó y se almacenó a -20°C .

Se determinó la absorbancia A_{405} de las 8 incubaciones, y se gráfico la A_{405} Vs tiempo de incubación.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLASMINA

De acuerdo al proveedor del sustrato cromogénico, la hidrolización con $10\ (\text{mA}_{405})$

a 37°C corresponde a 1nM de Plis (VINAZZER, 1988).

A los tubos con sustrato, se les agregó $3\ \mu\text{l}$ de la solución final activada y se incubaron por 0, 1 y 2 minutos respectivamente, la reacción se detuvo adicionando $10\ \mu\text{l}$ de BA 4 M pH 3.8, la A_{405} se determinó para cada tubo y se convirtió en $\text{mA}_{405}/\text{min}$.

CINÉTICA DE LA PLI

Se estudia la cinética de las dos especies de Pli partiendo de una concentración de $2.7\ \mu\text{M}$, tanto para el humano como para el equino, a una temperatura de 37°C y un pH: 7.3, su actividad se determinó por la velocidad de transformación del sustrato espectrofotométricamente a 405 nm utilizando las siguientes concentraciones de sustrato: 0.05, 0.08, 0.10, 0.13, 0.18, 0.25, 0.30 mM, a los cuales se les adicionó $3\ \mu\text{l}$ de cada Pli, la reacción se detuvo con $10\ \mu\text{l}$ de BA.

La absorbancia se determinó y se gráfico según la ecuación de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER and BURK, 1934).

RESULTADOS

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Las dos preparaciones de los Plgs muestran una alta pureza, Figura 1, carriles 2 y 3, aunque el humano presenta bandas leves típicas de la activación, Figura 1 carril 2.

Ambos Plgs en estudio migraron a la altura del Glu-Plg comercial utilizado como control en el marcador de peso molecular Figura 1, carril 1 (92.000 Da), segunda banda.

ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

La conversión del Plg a Pli por activación con UK fue monitoreado por la hidrolización del sustrato que se detectó espectrofotométricamente a A_{405} como se demuestra en la Figura 2 para las dos especies estudiadas. Después del minuto 6 las dos especies muestran una tendencia a estabilizarse hasta el minuto 15.

La activación del Plg a Pli se demuestra por electroforesis SDS, en la Figura 3 los geles (A) Plg humano y (B) Plg equino, en los carriles 2 están los zimógenos del humano y el equino respectivamente, los carriles 3 y 4 corresponden a las activaciones de 6 y 15 minutos para cada especie, donde se demuestra la formación de las cadenas A y B en ambos Plgs.

CINÉTICA DE LA PLASMINA

Los parámetros cinéticos de la Pli Humana, fueron determinados de acuerdo al esquema de Michaelis-Menten, en las coordenadas de Lineweaver-Burk, Figura 4 A y B. Donde se observa la cinética de la Pli humana y equina respectivamente y el comportamiento de estas.

La velocidad de hidrolización del sustrato por las diferentes Plis fueron estudiadas a una concentración de enzima constante y concentraciones ascendentes de sustrato, los resultados de las velocidades en unidades de absorbancia y en segundos se resumen en la Tabla 1, para las Plis: humana y equina.

El análisis de las Figuras 4 A y B de la cinética de las dos especies de Plis, nos permite determinar y comparar los parámetros de importancia cinética de las dos especies de Plis, las cuales se muestran en la Tabla 2.

DISCUSIÓN

El método de purificación por cromatografía de afinidad y cambio iónico de los Plgs de las dos especies, demostró una alta pureza e inclusive ha sido utilizado en otras especies con la misma efectividad (CAÑAS, et al, 2006).

La activación de los Plgs a Plis demuestran claramente que esta ocurre entre el minuto 0 al 6 en ambas especies. El Plg humano muestra una clara tendencia a perder su capacidad enzimática después del minuto 10, estas observaciones fueron demostradas por Cañas et al, donde tanto el Plg humano como el Bovino se incubaron por 35 minutos bajo las mismas condiciones de este estudio, demostrando que una incubación superior a

los 15 minutos es altamente perjudicial para la integridad enzimática de la Pli.

La activación de estos Plgs a Plis en ambas especies formaron tanto la cadena pesada (A) como la liviana (B), demostrado por electroforesis SDS-PAGE, donde la banda de 92.000 Da del Plg, se convierte en dos de 64 y 28 KDa respectivamente, al mismo tiempo que la banda de 92.000 Da. desaparece con el transcurso del tiempo de incubación, estando casi totalmente activada la molécula del Plg (92.000) a los 15 minutos de incubación, esto evidencia la conclusión de que dicha activación no debe superar los 15 minutos.

La utilización de un sustrato hecho para la Pli humana demostró también una alta linealidad en la cinética de la Pli equina, facilitando la determinación y comparación de los parámetros cinéticos de ambas especies, en donde se demostró que la Pli equina posee una mayor afinidad por el sustrato 2.06 mM comparada con la Pli humana 2.16 mM. La Pli animal ha demostrado en otros estudios esta tendencia (CAÑAS et al; 2006) y los resultados de este estudio lo confirman con el humano e indica que los parámetros determinados para el equino son muy similares a los determinados para el bovino (CAÑAS, et al, 2006).

Es de vital importancia, el estudio de estas Plis (equino y bovino) *in Vitro* en el sistema fibrinolítico, donde estén involucrados la fibrina soluble, el t-PA humanos y los Plg de estas tres especies, ya que los sustratos y activadores naturales pueden llegar a confirmar una mayor afinidad de las Plis animales por dichos componentes.

La efectividad de las tres Plis en lo concerniente a degradar el trombo, es importante no solo en la capacidad de estas enzimas para disolver una posible obstrucción vascular, sino también en los laboratorios clínicos donde se diagnostican las patologías relacionadas con el sistema fibrinolítico, ya que puede llegar a detectar cantidades más reales

de sustratos naturales y de hecho una mayor precisión en las determinaciones de los parámetros involucrados en problemas cardiovasculares y en especial el t-PA, el cuál se encuentra en concentraciones muy bajas en pacientes que sufren de infarto al miocardio y otros problemas cardiovasculares, siendo estas determinaciones facilitadas por los Plis animales ya que pueden mostrar mayor afinidad por los sustratos naturales (fibrina, t-PA), pudiendo determinar cantidades menores de sustratos (t-PA) o detectables (fibrina) donde no alcanzaría la afinidad del Plg/Pli humana.

CONCLUSIONES

*La electroforesis SDS-PAGE muestra claramente la activación de los Plgs a Pli.

* Se determinó que el tiempo máximo de activación para las Plis de las especies conocidas fue de 15 minutos.

*La Plasmina equina muestra una mayor afinidad por el sustrato cromogénico.

*Se observa que la mayor $V_{m\acute{a}x}$ corresponde a la Pli del humano.

*La UK demostró ser una enzima que activa los Plgs de las dos especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Appel R D, Bairoch A, Hochstrasser D F (1994) A new generation of information retrieval tools for biologist. *Biochem. Sci.* **19**: 258-260.
- Bohmfolk J F, Fuller G M (1980) Plasminogen is synthesized by primary cultures of rat hepatocytes. *Science* **209**: 408-10.
- Cañas Bermúdez O, Quijano Parra A, Arbeláez Ramírez L F (2006) Activación y cinética comparativa de dos especies de plasminógenos: Humano y Bovino. *Bistua* **4**: 3-12.
- Castellino FJ, Siefiring GE, Sodetz JM, Bretthauer RK (1973) Amino terminal amino acid sequences and carbohydrate of the two major forms of rabbit plasminogen. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **53**: 845-851.
- Castellino FJ, Ploplis VA (2005) Structure and function of plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* **93**: 647-54.
- Deutsch DG, Mertz ET (1970) Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* **962**: 1095-6.
- Forsgren M, Råden B, Israelson M, Larsson K, He den LO (1987) Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *F E B S* **213**: 254-260.
- Hoylaerts M, Lijnen HR, Collen D (1981) Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **673**: 75-85
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D (1980) Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. *J. Biol. Chem.* **255**: 10214-10222.
- Lineweaver H, Burk D (1934) *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658.
- Lorand L (2000) Research on clot stabilization provides clues for improving thrombolytic therapies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2-9.
- Mann K, Edelberg JM, Rosenberg RD, Chien KR, Breslow JL, Leiden JM, Leiden JM, Seidman C, Braunwald (1999) Blood coagulation in cardiovascular disease. In: *Molecular Basis of heart Disease. A comparison to Braunwald's Heart Disease.* Eds. Philadelphia: WB Saunders 505-36.
- Markus G, DePasquale JL, Wissler FC (1978) Quantitative determination of the binding of ϵ -aminocaproic acid to native plasminogen. *J. Biol. Chem.* **253**: 727-732.

- Michaelis L, Menten M L (1913) *Biochem. Z.* **49**: 333-369.
- Nemerson Y, Giensen PL (1988) Some thoughts about localization and expression of tissue factor. *Blood. Coagul. Fibrinolysis* **1**: S45-7.
- Raum D, Marcus D, Alper C A, Levey R, Taylor P D, Starzl T E (1980) synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* **208**: 1036-37.
- Ogston D (1980) Biochemistry of the plasmin system. *J. Clin. Pathol.* **14**: 5-9.
- Saito H, Hamilton S M, Tavill A S, Louis L, Ratnoff O D (1980) Production and release of plasminogen by isolated perfused rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 6837-40.
- Silverstein RL, leung LLK, harpel PC, nachman RL (1984) complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen: modulation of activation by tissue activator. *J. clin. In.* **74** : 1625-1633.
- Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Petersen TE, Magnusson S (1978) The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"-plasminogen (Mw,38.000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. *Progress in chemical Fibrinol. Thrombol.* 191-209.
- Vinazzer H (1988) Basic and practice in evaluating plasminogen. *Haemostasis* **1**: 41-5.
- Violand B N, Castellino F J (1976) Mechanism of urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. *J. Biol. Chem.* **251**: 3906-12.
- Wallén P (1980) Biochemistry of plasminogen. *Fibrinolysis* 2-25.
- Wiman B, Collen D (1979) On the mechanism of the reaction between human α_2 -antiplasmin and plasmin. *J. Biol. Chem.* **254**: 9291-9297.
- Wiman B, Wallén P (1977) The specific interaction between plasminogen and fibrin, A physiological role of the lysine binding site in plasminogen. *Thromb. Res.* **10**: 213-222.

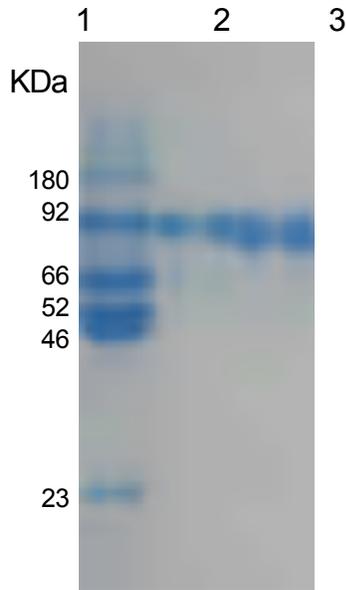


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, carril 1 marcador de peso molecular (ver materiales y métodos) carril 2 Plg humano, carril 3 Plg equino.

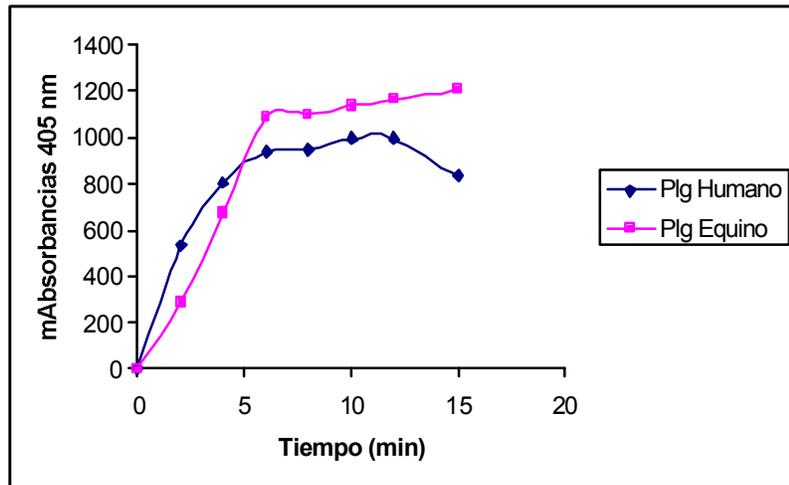


Figura 2. Monitoreo espectrofotometrico A_{405} de la activación del Plg a Pli de dos especies humana y equina.

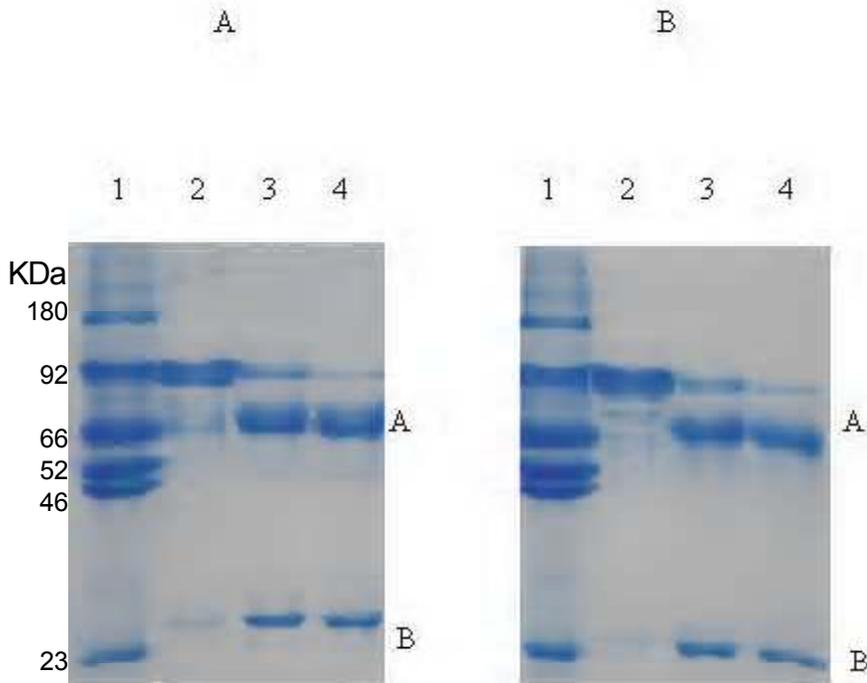
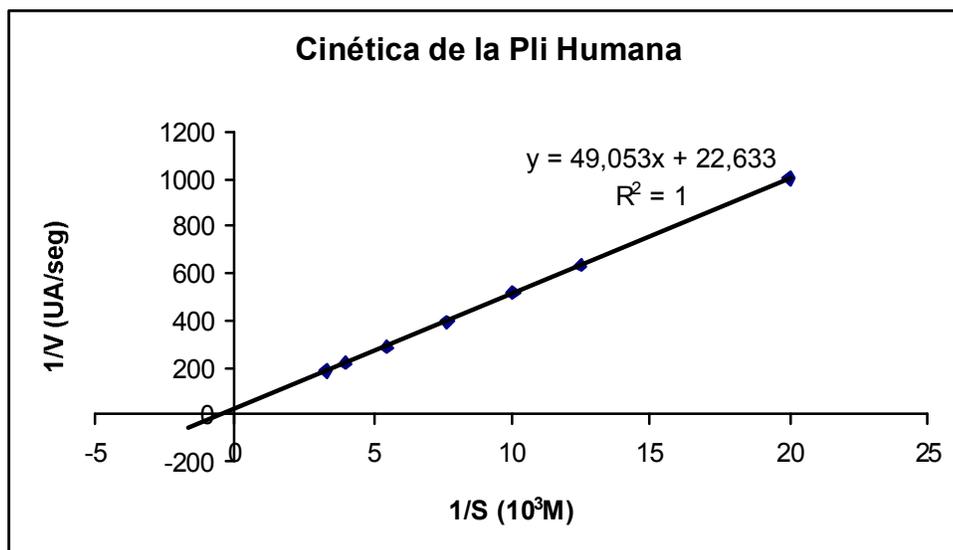


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE de la activación del Plg a Pli, a los 0, 6 y 15 minutos. Gel A, Plg humano, gel B, Plg equino, en ambos se indica la migración de la cadena pesada (A) y liviana (B) de las Plis.

A



B

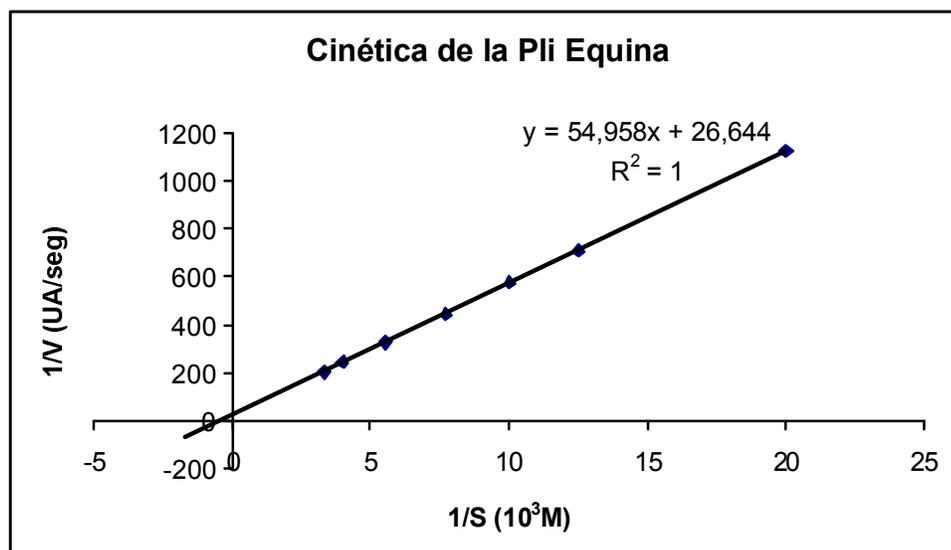


Figura 4. Dependencia de la velocidad de transformación del sustrato por las Plis en las coordenadas de la ecuación de Lineweaver-Burk. A. Pli humano, B. Pli equino.

Tabla 1. Velocidades de las Plis humana y equina en función de concentraciones ascendentes de sustrato.

1/[S] 10 ³ M	1/V UA/seg	
	Plasmina Humana	Plasmina Equina
20	1003.53	1125.8
12.5	636	713.6
10	513	576.2
7.7	400	449.28
5.5	293	331.7
4	219	246.5
3.33	185.23	209.6

Tabla 2. Parámetros determinados según la ecuación de Lineweaver-BurK para las dos especies de Plis.

Plasmina	V _{máx} UA/seg	K _M mM	K _{cat} UA seg ⁻¹ /μM
Humana	44.18X10 ⁻³	2.16	0.0195
Equina	37.53X10 ⁻³	2.06	0.0165