



# Cinética comparativa de la Plasmina canina con la humana, bovina y equina

Cañas Bermudez. O. <sup>1</sup> Quijano Parra. A. <sup>2</sup> Arbeláez Ramírez. L. F. <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Pamplona, Pamplona-Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biomoléculas.

<sup>2</sup> Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química.

\*luifer@unipamplona.edu.co

## ABSTRACT

The Plasminogen is the zimogen of the Plasmin enzyme which dissolves blood clots. In this study the canine Plasmin is compared with the human, bovine and equine Plasmin. The canine Plasmin demonstrated more accelerated activation than the other species. In addition the canine plasmin demonstrated a greater affinity to the chromogenic substrate with 0.61 mM, which is superior 1.5 times more than that of the affinity of the bovine Plasmin and 3 times that of the human and the equine Plasmin respectively.

This is a possibility for the use of the canine Plasmin in clinical determinations of the fibrinolytic parameters.

## KEY WORDS

Plasmin, Urokinase, Glu-plasminogen, Fibrinolysis, Kinetics.

## RESUMEN

El Plasminógeno es el zimógeno de la Plasmina, enzima encargada de disolver el coagulo sanguíneo. En este estudio se compara la Plasmina canina con la humana, bovina y equina. La Plasmina canina demostró una activación más acelerada que las demás especies, demostró además una mayor afinidad por el sustrato cromogénico con 0.61 mM, siendo superior 1.5 veces que la afinidad de la Plasmina bovina y 3 mas veces que la humana y equina.

Esto posibilita la utilización de esta Plasmina en determinaciones clínicas en parámetros del sistema fibrinolítico

## PALABRAS CLAVES

Plasmina, uroquinasa, Glu-plasminógeno, Fibrinólisis, Cinética.



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, estos procesos hemostáticos se clasifican como primarios principalmente cuando implican las plaquetas y secundaria en la formación de fibrina.

La activación del sistema fibrinolítico resulta de la conversión de la proenzima Plasminógeno (Plg) a Plasmina (Pli), esta última regula la formación del coagulo sanguíneo mediante la lisis en productos de degradación solubles (Arnout, et al., 2006). La conversión del Plg a Pli por acción del activador tipo urokinasa (u-PA), involucra el rompimiento del enlace peptídico Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup>, resultando en la generación de Pli (Ogston, 1980), la cual esta compuesta por dos cadenas, la pesada (A) compuesta por 561 a.a. unido por un puente disulfuro y la ligera (B) que contiene 230 a.a.

La inhibición del sistema fibrinolítico puede ocurrir a nivel de los inhibidores del activador del Plg específico tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) (Nemerson and Giensen; 1988) o a nivel de la Pli por la a<sub>2</sub>-antiplasmina (Lijnen and Collen; 1995, Drinane, et al., 2006) los procesos fisiológicos de la fibrinólisis actúan para mantener los vasos sanguíneos con un funcionamiento normal y en estado no trombótico (Arnout, et al., 2006).

El complejo formado entre enzima-sustrato y la concepción del estudio cinético fue propuesto por Michaelis y Menten (Michaelis and Menten, 1913) y ha sido estudiada en otros Plgs de otras especies por Cañas et al (Cañas, et al., 2006, Cañas, et al., 2007).

En este estudio se compara la cinética de la Pli canina con la cinética de la Pli humana, bovina y equina, lo que ampliara los conocimientos sobre el sistema fibrinolítico de especies mamíferas que contribuirá a un mejor entendimiento y manejo de los problemas cardiovasculares que agobian sobre todo al ser humano.

## MATERIALES Y MÉTODOS REACTIVOS

Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), ε- amino ácido capríico (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-sefarosa-4B de (Amersham Biosciences), ácido acético concentrado de (Baker), sustrato cromogénico para Pli Spectrozyme y u-PA (110.000 UI/ml) de (Amdia), el volumen utilizado de sustrato fue el mismo para todas las pruebas (60 μl) a una concentración de 0.3 mM, el estándar de peso molecular usado fue: 180 KDa (a<sub>2</sub>-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 el agua tipo 3, ambos del (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 y bovino 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 cuatro especies mamíferas fueron purificados por cromatografía de afinidad en Lisina-sefarosa 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 cuatro especies, posteriormente la columna se lavo con 75 ml de PBS, hasta que la absorbancia  $A_{280}$  fue  $\leq 0.01$ , se eluyó con 100 ml de PBS que contenían 0.05M  $\epsilon$ -ACA y colectado en fracciones de 3 ml en cada tubo, la concentración fue determinada utilizando el coeficiente de absorción  $(\epsilon^{1\%})_{1\text{cm}} = 1.6$  (Appel, et al., 1994), los Plgs fueron concentrados por ultracentrifugación 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 sepharosa y equilibrada con buffer A. La muestra fué adicionada y lavada con buffer A hasta obtener una absorbancia  $\leq 0.01$ . 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

La electroforesis SDS-PAGE al 10% se realizó de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras de Plgs de 5 mg 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 utilizo se describe en materiales y métodos.

## ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

Se utilizo 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 adiciono 6.72 ml de UK para una concentración final de 739.2 U/ml "Solución activada". Se monitoreo espectrofotometricamente  $A_{405}$  así: se tomaron 8 tubos con 60  $\mu$ 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  $\mu$ l de la "solución activada", se dejo reaccionar por 12 segundos, la reacción se detuvo con la adición de 10  $\mu$ 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  $\mu$ l de glicerol al 100%, de tal manera que la concentración de glicerol final fue de 25%. La muestra activada, se homogenizó y se marco 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  $A_{405}$  Versus el tiempo de incubación.

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLASMINA

De acuerdo al proveedor del sustrato cromogénico, la hidrolización con 10 mA (405nm) a 37°C corresponde a 1nM de Plis (Vinazzer, 1988).

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

## CINÉTICA DE LA PLASMINA

Se estudia la cinética de las cuatro especies de Pli partiendo de una concentración común para todos las Plis de 2.7  $\mu$ M, 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 adiciono 3  $\mu$ l de cada Pli, la reacción se detuvo con 10  $\mu$ l de BA.

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

## RESULTADOS

### ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

La preparación del Plg canino muestra una alta pureza, Figura 1, carriles 2, se observa que el Plg en estudio migró a la altura del marcador de peso molecular Figura 1 carril 1, segunda banda.

### ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

La conversión del Plg canino a Pli por activación con UK fue monitoreado por la hidrolización del sustrato que se detecto espectrofotométricamente a  $A_{405}$  como se demuestra en la Figura 2. Después del minuto 3 muestra una tendencia a estabilizarse hasta el minuto 10, visto también en otras especies en los minutos 6 y 15.

La activación del Plg canino a Pli se demuestra por electroforesis SDS, en la Figura 3C, al comparar con el Plg Canino (zimogeno), Figura 3B y se observa en la figura 3A el marcador de peso molecular. La activación corresponde al minuto 15, donde se determina la aparición de las típicas bandas de la Pli, cadenas A y B.

### CINÉTICA DE LA PLASMINA

Los parámetros cinéticos para la Pli Canina fueron determinados de acuerdo al esquema de Michaelis-Menten, en las coordenadas de Lineweaver-Burk, Figura 4. Donde se observa el comportamiento de estas.

La velocidad de hidrolización del sustrato por la Pli fue estudiada a una concentración de enzima constante y concentraciones ascendentes de sustrato, los resultados de los parámetros de la cinética del Plg canino se realizaron por duplicado y se resumen en la columna 2 Tabla 1, donde se

indican los parámetros de las otras especies también realizados por duplicado en las columnas 3, 4 y 5 de la Tabla 1 para su comparación (Cañas, et al 2006; Cañas et al 2007).

Los parámetros de importancia cinética de las cuatro especies de Plis se resumen y comparan en la Tabla 2 (Cañas, et al 2006; Cañas et al 2007).

## DISCUSIÓN

El método de purificación utilizado con el Plg canino demuestra una vez más, que el método de purificación desarrollado por Cañas (Cañas, et al., 2006), se puede utilizar para la purificación de esta molécula en muchas especies.

También se confirma que la activación del Plg canino sigue las características de las demás especies demostradas por Cañas (Cañas, et al., 2006). Aunque la activación del canino alcanza una máxima Absorbancia a los 3 minutos y una posible degradación del mismo a los 10 minutos, lo cual se debe estudiar más detalladamente.

La Pli canina demuestra claramente una mayor afinidad por el sustrato con una  $K_m$  de 0.61 mM superando la del bovino 1.5 veces y la del equino y humano con más de 3 veces, de funcionar la Pli canina de la misma forma a nivel de sustratos fisiológicos podría afirmarse que los riesgos de problemas cardiovasculares por formación de trombos en el canino, serian muy inferiores a los de las demás especies estudiadas por Cañas (Cañas, et al., 2006).

El hecho que el Plg Canino hidrolice de forma efectiva un sustrato sintético hecho para la Pli humana, claramente indica que los sustratos fisiológicos para los que son producida la Pli en todas las especies, pueden hidrolizar estos sustratos provenientes del sistema de coagulación del ser humano, lo cuál facilitaría las determinaciones de parámetros sanguíneos involucrados con problemas cardiovasculares en el ser humano como el t-PA, PAI-1, PAI-2, a-AP entre otros.



Particularmente facilitaría la determinación de cantidades peligrosamente bajas de t-PA, enzima esta detectada en cantidades muy bajas en pacientes con infarto al miocardio y otras enfermedades cardiovasculares (Topol, 2000).

Si bien la  $V_{m\acute{a}x}$  y la conversión del sustrato a producto son superiores en las otras especies, el posecionamiento en el trombo por parte de la Pli canina ocurre mucho antes y quizás en trombos muy pequeños que aun no son una amenaza para la salud de quien los posee, siendo esta Pli una especie de prevención en la formación del trombo, o bien facilitando la determinación temprana de la presencia o formación de trombos.

En este estudio se señalan las comparaciones entre los parámetros cinéticos encontrados en donde se demuestra que la Pli Canina posee una mayor afinidad por el sustrato, por encima de las Plis de las otras tres especies con 0.61 mM, seguida por la afinidad de la Pli equina 2.06 mM, los datos para el humano y el Bovino muestran una similitud pero esta lejos de la afinidad de la Pli canina.

La importancia de estos datos radica en que la alta afinidad que presentan las Plis animales por este sustrato sintético se puede traducir en la misma acción sobre sustratos naturales lo que traería como consecuencia la correcta degradación del trombo y esencial en cuanto al diagnóstico clínico en los laboratorios donde se detectara con

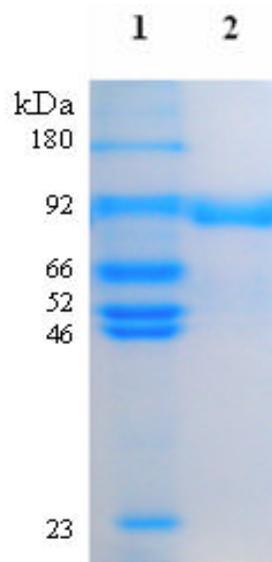
mayor sensibilidad los sustratos naturales (Fibrina y t-PA) donde no alcanzaría la afinidad del Plg/Pli humana.

## CONCLUSIONES

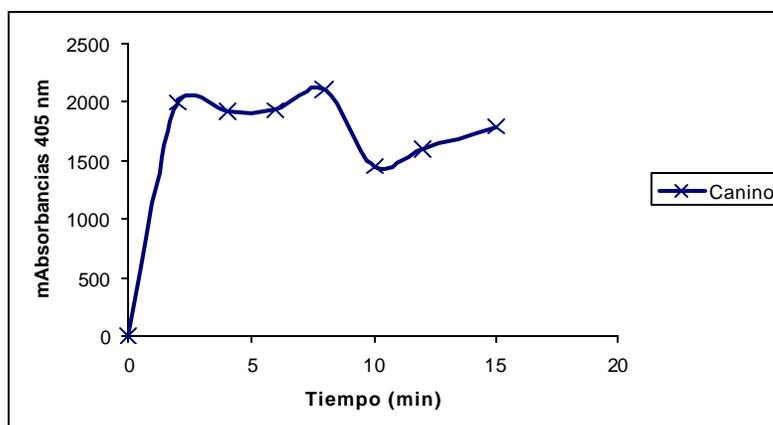
\*El Plasminógeno canino puede ser purificado por el mismo método utilizado para diferentes especies, unificando así el actual método.

\* El Plasminógeno canino se activo y estabilizo a los 3 minutos con urokinasa y su autodegradación se inicio a los 10 minutos.

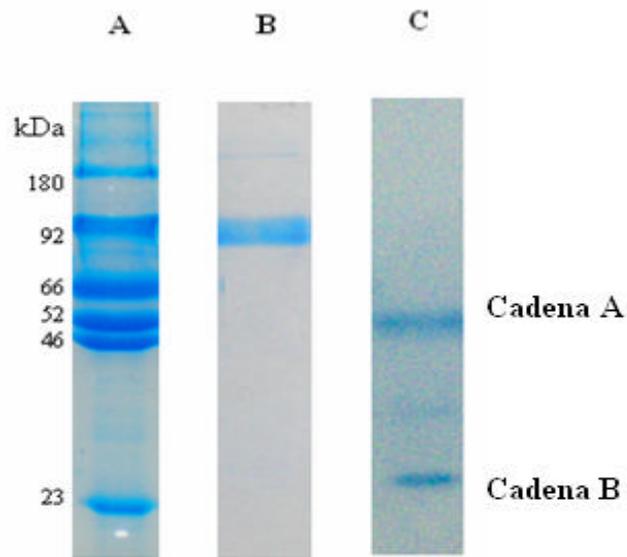
\*La Plasmina Canina mostró una mayor afinidad por el sustrato que las especies con las cuales se comparo.



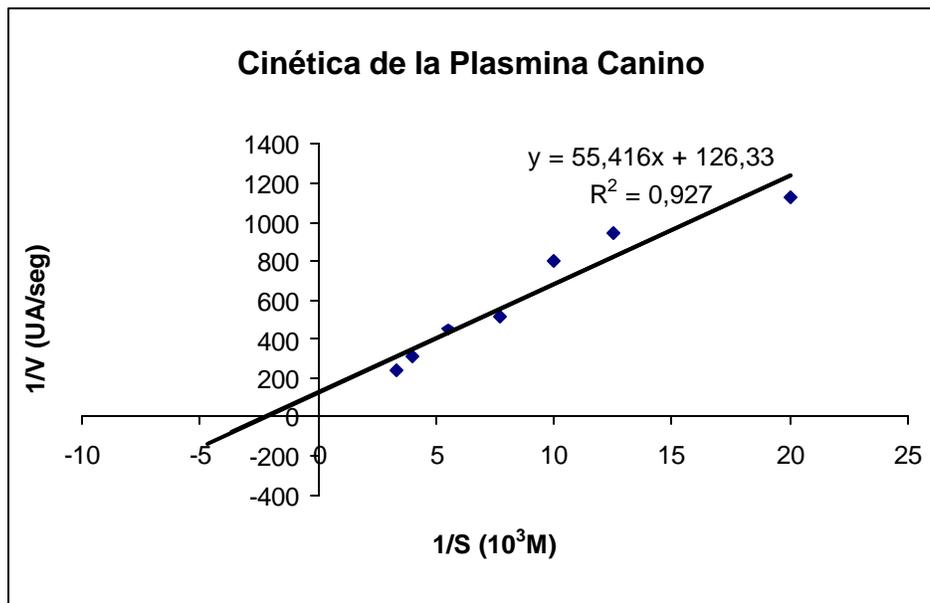
**Figura 1.** Electroforesis SDS-PAGE al 10%, carril 1 marcador de peso molecular (ver materiales y métodos) carril 2 Plg Canino.



**Figura 2.** Monitoreo espectrofotométrico  $A_{405}$  de la activación del Plg canino a Pli versus tiempo de incubación.



**Figura 3.** Electroforesis SDS-PAGE al 10 % , activación del Plg a Pli. Figura 3A, marcador de peso molecular, (Cañas, et al 2006; Cañas et al 2007). Figura 3B, Plg Canino, Figura 3C, activación del Plg canino a los 15 minutos de incubación. Se indica la migración de la cadena pesada (A) y liviana (B).



**Figura 4.** Dependencia de la velocidad de transformación del sustrato por la Pli canina en las coordenadas de la ecuación de Lineweaver-Burk.

**Tabla 1** Velocidades de las Plis humana, equina, bovina y Canina en función de concentraciones ascendentes de sustrato.

1/[S] 10 <sup>3</sup> M	1/V UA/seg			
	Plasmina Canina	Plasmina Humana	Plasmina Equina	Plasmina Bovina
20	1128	1003	1121	989
12.5	942	636	689	705
10	801	513	589	517
7.7	515	400	535	481
5.5	446	293	440	364
4	305	219	327	246
3.33	240	185	221	194

**Tabla 2.** Parámetros determinados según la ecuación de Lineweaver-Burk para las Cuatro especies de Plis.

Plasmina	V <sub>máx</sub> UA/seg	K <sub>M</sub> mM	K <sub>cat</sub> UA seg <sup>-1</sup> /μM
Humana	44.18X10 <sup>-3</sup>	2.16	0.016
Equina	8.83X10 <sup>-3</sup>	0.438	3.27X10 <sup>-3</sup>
Bovina	0.012	0.607	4.44X10 <sup>-3</sup>
Canina	7.92X10 <sup>-3</sup>	0.438	2.93X10 <sup>-3</sup>



Arnout J, Hoylaerts M F, Lijnen H R (2006) Haemostasis. Handb. Exp. Pharmacol. **176**: 1-41.

Appel R D, Bairoch A, Hochstrasser D F (1994) A new generation of information retrieval tools for biologist. Biochem. Sci. **19**: 258-260.

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.

Cañas Bermúdez O, Quijano Parra A, Arbeláez Ramírez L F (2007) Activación y comparación cinética del Plasminógeno Equino con el Plasminógeno humano. Bistua **5**: 43-52.

Deutsch DG, Mertz ET (1970) Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. Science **962**: 1095-6.

Drinane M C, Sherman J A, Hall A E, Simons M, Mulligan-Kehoe M J (2006) Plasminogen and plasmin activity in patients with coronary artery disease. J. Thromb. Haemost. **6**: 1288-95.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-5.

Lijnen H R, Collen D (1995) Mechanisms of physiological fibrinolysis. Baillière's clinical Haematology **8**: 277-90.

Lineweaver H, Burk D (1934) J. Amer. Chem. Soc. **56**: 658.

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.

Michaelis L, Menten M L (1913) Biochem. Z. **49**: 333-369.

Nemerson Y, Giensen P L (1988) Some thoughts about localization and expression of tissue factor. Blood Coagul. Fibrinolysis **1**: S 45-7.

Ogston D (1980) Biochemistry of the plasmin system. J. Clin. Pathol. **14**: 5-9.

Topol J E (2000) Coronary disease, Acute myocardial infarction thrombolysis. Heart **83**: 122-126.

Vinazzer H (1988) Basic and practice in evaluating plasminogen. Haemostasis **1**: 41-5.

Recibido 20 Marzo 2007  
Aceptado 04 Septiembre 2007