



Proteínas plasmáticas como marcadores de peso molecular

Cristancho Pabón R. E¹, Ramón Camargo J¹, Arbeláez Ramírez L. F^{1,*}

¹Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Biomoléculas.

Universidad de Pamplona.

E_mail. Luifer@unipamplona.edu.co

ABSTRACT

The proteins of the human proteome are calculated by five hundred; they have been used for diagnostic diseases as well as in clinical studies and as medicine for the treatment of different pathologies.

The more abundant and best-known proteins of the human proteome were used in this project as molecular weight markers. The human albumin was used as a control because its easily recognized in position on the electrophoretic analysis due to this protein's high concentration in human plasma.

This molecular weight marker shows a precision of 97% in determining the molecular weight of known and unknown proteins' molecular weight as compared with other more sophisticated methods.

KEY WORDS

Molecular Weight Markers, Electrophoresis, Proteomic Plasma, Albumin.

RESUMEN

Las proteínas del proteoma humano se han calculado en 500, las cuales han sido utilizadas para diagnosticar diferentes patologías, para estudios clínicos y como medicamentos en diversas patologías.

Las proteínas más abundantes y de reconocido papel biológico se utilizaron en este proyecto como marcadores de peso molecular, a su vez se utiliza la albúmina humana como control, dada su bien reconocida posición en la electroforesis de plasma humano, como la proteína más abundante.

El marcador elaborado con proteínas plasmáticas demuestra una precisión superior al 97% tal como se demostró con la determinación del peso molecular de la albúmina humana.

PALABRAS CLAVES

Marcadores de peso molecular, Electroforesis, Proteoma del plasma, Albúmina.



INTRODUCCION

Las proteínas plasmáticas han sido estudiadas por décadas y desde muchos puntos de vista, han sido además, utilizadas como biomarcadores de diferentes patologías. Se entendió por largo tiempo como “proteínas plasmáticas” aquellas que se encontraban en el plasma y con funciones en la circulación sanguínea, excluyendo aquellas proteínas que servían como mensajeras entre los tejidos como las hormonas o aquellas que son liberadas en la circulación después de traumas, como la mioglobina cardiaca después de un infarto al miocardio, o como las interleuquinas. (Putnam FW, 1987).

Hoy en día con el avance de la ciencia, se ha descubierto que las “proteínas plasmáticas” aparecen en el plasma por diversas razones demostrando que el concepto de “proteínas plasmáticas” restringía las funciones biológicas de muchas proteínas; motivo por el cual, hoy en día el concepto proteoma del plasma es aceptado cuando se habla del contenido total de proteínas de la circulación.

El número total de proteínas en el proteoma plasmático, aun no ha sido determinado con certeza y tomará mucho tiempo antes que se pueda determinar, pero una cifra que ha sido nombrada y la cual es muy modesta son 500 proteínas (Anderson NL, Anderson NG, 2002), esto sin contar con las diferentes glicosilaciones que sufren las proteínas, los diferentes pesos moleculares en forma de precursores protéicos en su forma madura y los diferentes productos de degradación que estas proteínas pueden sufrir a nivel biológico. Tampoco se tiene en cuenta en esta cantidad, los polimorfismos que pueden sufrir éstas proteínas y lo que es más importante, no considerando los 10.000.000 de anticuerpos producidos por el organismo humano, los cuales tienen todos una secuencia diferente, la que reconoce un antígeno específico por cada secuencia.

El rango de 500 proteínas pudo basarse en que son las proteínas identificadas por diferentes causas como la identificación en patologías

específicas, por ser las más abundantes, por haberseles identificado funciones de transporte, degradación o por ser utilizadas en diagnóstico clínico, como medicamento o profilaxis. (Anderson NL, Anderson NG, 2002; Chen JH, Chang YW, et al., 2004).

Las técnicas modernas para identificación de proteínas en los fluidos corporales y en particular en el plasma, como la espectrometría de masas combinada con la electroforesis bidimensional facilitan la identificación de mezclas complejas de proteínas que por medios tradicionales tardaría mucho tiempo.

En los próximos años veremos una enorme capacidad de determinar por medio de estas tecnologías el proteoma humano plasmático con mayor precisión, así como el estudio de diferentes patologías y las proteínas plasmáticas involucradas en ellas determinadas con mayor precisión, hecho este que facilitará el tratamiento de los pacientes que padecen estas patologías; ampliando así, no solo los conocimientos científicos de las patologías hasta ahora estudiadas (Chen JH, Chang YW, et al., 2004; Verrills NM, 2006, Ziedins KB, et al., 2005), sino también otras patologías de importancia para el ser humano y animal, contribuyendo además a expandir las fronteras de la diagnóstica (Hortin GL, et al, 2006) y el desarrollo de nuevos métodos clínicos que facilitaran la prevención.

Si bien estas “nuevas” tecnologías revolucionan la purificación y caracterización de proteínas y péptidos, las técnicas tradicionales se seguirán empleando por razones económicas, cantidad de proteína necesaria y sobre todo por el posible uso de las proteínas en el tratamiento de diferentes patologías, de igual forma, se seguirán utilizando los estándares protéicos como marcadores de peso molecular.

Entre las proteínas más abundantes y representativas del plasma están la α_2 -Macroglobulina (α_2 -M), el plasminógeno (Plg), el fibrinógeno (Fg) y la albúmina.



La α_2 -M es un miembro de la superfamilia de las glicoproteínas tioéster, junto con la proteína de la zona de gestación (PZP) y los componentes del complemento C3, C4 y C5 (Sottrup-Jensen L, 1987). Esta familia de glicoproteínas es tipificada por la α_2 -M humana, la cual se considera como una proteína inhibidora de los cuatro tipos de proteasas (serino, metalo, carboxil y tiol) (Sottrup-Jensen L, 1989). La α_2 -M se sintetiza como monómeros de 180 kDa (Lundwall A, Malmheden I, Stålenheim G, Sjöquist, 1981). Estructuralmente, el dímero de la α_2 -M se mantiene unido por dos puentes de disulfuro (Sottrup-Jensen L, 1989; Jensen PEH, Sottrup-Jensen, 1986), pero consta de una estructura cuaternaria en la forma tetramérica (Sottrup-Jensen L, Hansen HF, Pedersen HS, Kristensen L, 1990).

El fibrinógeno (Fg) es una molécula formada por tres cadenas polipeptídicas no idénticas interconectadas por tres puentes de disulfuro y sus subunidades están determinadas como $A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$; (Doolittle RF, 1981) se convierte a fibrina por acción de la trombina que hidroliza los fibrinopéptidos A y B en la secuencia Arg¹⁶-Gly¹⁷ de la cadena α y Arg¹⁴-Gly¹⁵ de la cadena β . La cadena α contiene 610 residuos de aminoácidos, (a.a.) y un peso molecular de 66 kDa, mientras que la β 461 a.a. y un peso molecular de 52 kDa y la cadena γ 411 a.a. y un peso molecular de 46 kDa, lo que le da a la molécula de Fg un total de 2964 residuos de a.a., esto en conjunto con la contribución de los carbohidratos da un peso molecular de 340 kDa (Doolittle RF, 1981). Tiene una concentración plasmática de 3 mg/ml y diferentes funciones biológicas especialmente involucradas en las últimas reacciones de la cascada de la coagulación y en el taponamiento definitivo de las lesiones vasculares que se forman constantemente en el endotelio, convirtiéndose a su vez en los cimientos sobre los cuales se desarrolla el Sistema Fibrinolítico.

El Fg ha sido una molécula extensamente estudiada no sólo por su fascinante estructura y por su papel dual en los Sistemas de Coagulación y Fibrinólisis; sino también, por el descubrimiento

de un gran número de disfibrinogenemias que causan perturbaciones en dichos sistemas en quienes son portadores de mutaciones en la molécula de Fg (Matsuda M, et al., 1999).

El plasminógeno (Plg), como la mayoría de las proteínas plasmáticas es sintetizado en el hígado y su concentración en el humano es de 2μ M (Wallen P, 1980), su peso molecular incluyendo los carbohidratos (Castellino FJ, et al., 1973) ha sido determinado en 92 kDa y 82 kDa para el Glu y Lis-Plg respectivamente (Wallen P, 1980), está constituido por una sola cadena glicoprotéica con a.a. glutámico en su N-terminal para el Plg humano (Wallen P, Wiman B, 1970), motivo por el cual se denomina Glu-Plg. El sistema Plg /plasmina (Pli) (Fibrinolítico) está compuesto por la proenzima Plg, la cual es activada a Pli, encargada de degradar la fibrina en productos de degradación de la fibrina (FDP).

La activación del Sistema Fibrinolítico depende de la conversión del Plg a Pli por el activador tisular del Plg (t-PA) y el activador del Plg tipo urokinasa (u-PA) (Castellino FJ, Ploplis VA, 2005).

La tripsina es una serino proteasa pancreática con un peso molecular de 23 kDa, (Cunningham JR, Leon W 1954) y con muchas propiedades similares a la quimotripsina (Green NM, Neurath H, 1954; keil B, Sorm F, 1962). Se origina en las células acinares del tejido pancreático, tiene un precursor inactivo tripsinógeno con un peso molecular de 24 kDa y un punto isoelectrico cercano a 9.3 (Siekvitz P, Palade G, 1960), se activa por la hidrólisis del enlace peptídico Lys²³-Ile²⁴, cataliza la hidrólisis de péptidos, amidas y enlaces éster y se caracterizan por su alto grado de selectividad (Walsh KA, Neurath H, 1964).

La tripsina cuando es tratada a pH 2 provee una mezcla de las dos formas de tripsina, conteniendo 15-20% de α -tripsina (Jameson GW, Elmore DT, 1974). La tripsina bovina existe en dos formas α -tripsina y β -tripsina, las cuales han sido separadas por diferentes técnicas entre ellas cromatografía en Sulfoethyl-sefadex (Schroeder and Shaw, 1968; Berezin et al.,



1969). La β -tripsina tiene una sola cadena polipeptídica, mientras que la α -tripsina tiene dos cadenas resultantes del clivaje autocatalítico del enlace Lys¹³¹ – Ser¹³².

La albúmina (que en este caso se usa como un patrón de comparación), es la proteína más abundante del plasma. Está constituida por 585 a.a. con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula y tiene un peso molecular de 67 kDa (Sugio S, Kashima A, et al., 1999). Tiene múltiples funciones, como transportar y almacenar ácidos grasos, oligoelementos, hormonas sexuales, bilirrubina y medicamentos, además ejerce entre el 75% y 85% de la presión oncótica. (Carter DC and Ho JX, 1994; Stewart AJ, et al., 2003; Liu R, Yang J et al., 2005) La albúmina se utiliza en pacientes con quemaduras, cirrosis hepática, síndrome nefrótico, desnutrición, problemas cardiovasculares e hipovolemia. (Redl H, Kros I P, Schlag G, Hammerschmidt D E, 1989; Bellomo R, Boyce N et al., 2004).

Este estudio está basado en la purificación de las proteínas más abundantes del proteoma plasmático humano, para su uso como marcadores de peso molecular en electroforesis SDS-PAGE en la determinación de pesos moleculares de proteínas desconocidas y conocidas, así como de péptidos de importancia fisiológica. Se elaboró y estandarizó un marcador de peso molecular basado en proteínas del proteoma plasmático humano y una enzima proteolítica adquirida comercialmente como es la tripsina bovina. Se analizó la precisión de dicho marcador usando como control la albúmina humana.

MATERIALES Y METODOS

TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El plasma humano fue suministrado por el Hospital Erasmo Meoz de la ciudad de Cúcuta (Norte de Santander) analizado y certificado, libre de antígenos como hepatitis, VIH, chagas, y otras enfermedades infecciosas.

PURIFICACION DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas fueron purificadas de acuerdo a los siguientes métodos:

α_2 -Macroglobulina: Para la purificación de la α_2 -M, se tomaron 250 ml de plasma normal humano al cual previamente se le retiró el Plg por cromatografía de afinidad en sefariosa-lisina de acuerdo al método de Deutch, Mertz (Deutsch DG, Mertz ET, 1970), posteriormente se realizó cromatografía de afinidad en Sefariosa-Zn (Imber MJ y Pizzo SV, 1981), en un cromatógrafo BioLogic LP (BioRad Laboratories, Hercules), a través de una columna de 2.5 x 13 cm, empacada con 45 mL de matriz. La proteína fue eluida con 0.01M de acetato de sodio, 0.15M de NaCl, pH 5.0, se colectaron fracciones de 8 mL. La concentración de la α_2 -M fue determinada por absorción a $\lambda = 280_{nm}$ usando como coeficiente de extinción 8.9 (Hall PK, Roberts RC, 1978); la proteína fue concentrada en una célula de ultrafiltración AMICON (Millipore, Bedford), utilizando membranas de celulosa regenerada.

Plasminógeno: El Plg humano fue purificado por cromatografía de afinidad en Lisina-sefariosa según el método de Deutsch y Mertz (Deutsch y Mertz, 1970), en una columna de 2.5 x 8 cm (Biorad), equilibrada con tres volúmenes del buffer 0.1M fosfato 0.15M de NaCl pH 7.3 (PBS) a una rata de flujo de 2ml/min. Se eluyó con 100ml de PBS que contenía 0.05M (ϵ .ACA) y se determinó la concentración utilizando $(\epsilon^{1\%})_{1cm} = 1.6$ (Appel et al., 1994) finalmente se concentro en una célula de ultrafiltración como se mencionó anteriormente. Posteriormente se realizo cromatografía de cambio iónico, para separar los plgs Glu y Lys de acuerdo al método de Cañas y Arbeláez. (Cañas y Arbeláez, 2007).

Fibrinógeno: El Plasma se desplasminogeno de acuerdo al método de Deusth, Mertz (Deutsch y Mertz, 1970). Inicialmente se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio, posteriormente se centrifugó para eliminar gran cantidad de proteínas plasmáticas; se repitió este procedimiento hasta tener la proteína de interés en un 99% de pureza de acuerdo al método de



Blombäck B, and Blombäck M. (Blombäck B, and Blombäck M, 1957) con algunas modificaciones (no publicadas). Se resuspendió en PBS y se determinó su concentración por espectrofotometría UV, utilizando como blanco 0.3 M de NaCl con adición de 6.66 M de urea alcalina y como coeficiente de extinción molar 0.150 (Blombäck B, and Blombäck M, 1957).

Tripsina: Fue adquirida comercialmente a Sigma Aldrich, de páncreas de bovino, N° T 8003 (Ficha técnica Sigma- Aldrich)

Albúmina: El plasma se precipitó con etanol al 95%, se centrifugo y ajusto el pH del sobrenadante a 5.2 con buffer acetato pH 4.0, que contenía 0.8M de acetato de sodio y 4M de ácido acético. Se precipitó de nuevo con etanol al 95% y se dejó en reposo a 3-8°C durante toda la noche, se centrifugó nuevamente de acuerdo al método de Tanaka et al. (Tanaka K, Shigueoka EM, Sawatani E, y Dias GA, 1998) con algunas modificaciones (no publicadas). El sobrenadante se congeló a -20°C por 4 días y se descongeló a 37°C, se centrifugó tal como se mencionó con anterioridad y se elimino el precipitado. La concentración fue determinada por absorbancia (A_{280}) utilizando el coeficiente de extinción ($\epsilon^{1\%}_{280} = 0.66 \text{ mg} \times \text{cm}^{-1}$) (Chaudhury C, Mehnaz S et al., 2003) finalmente se concentró en una célula de ultrafiltración como se mencionó anteriormente.

ANÁLISIS ELECTROFORETICO

Las proteínas purificadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 7.5, 10 y 12.5% de acuerdo al método de Laemmli, (Laemmli, 1970). Las muestras fueron mezcladas con buffer de carga que contenía β -mercaptoetanol, SDS y tratadas térmicamente a 95°C por 5 minutos, se aplicaron 5 μg de cada muestra, visualizadas por tinción con azul de comassie. Adicionalmente, se realizo análisis densitométrico de las bandas de las proteínas en un Escaner (ImageQuant TL) y se verificó el grado de pureza de las mismas, usando el software Image Analysis Software v 2003; así mismo se calcularon los pesos

moleculares de acuerdo a su migración en el gel de electroforesis.

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Los geles fueron analizados por tinción con nitrato de plata de acuerdo al método de Rabilloud, (Rabilloud, 1994) se aplicaron 152 ng del marcador, 25 ng de Albúmina y 186 ng de Fb. y se analizaron por densitometría como se indicó antes.

MARCADOR DE PESO MOLECULAR

Las proteínas fueron tratadas de la forma mencionada anteriormente, luego se preparó el marcador usando 4.64 μg de α_2 -M, 4.25 μg de Plg, 5.43 μg de Fibrinógeno, y 4 μg de tripsina. Para la muestra control (Albúmina) se aplicó 2 μg .

DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

La proteína no incluida en el estándar (Albúmina) se utilizó como control, para determinar la precisión del producto elaborado, se le determinó el peso molecular con ayuda del marcador de peso molecular y el software Image Analysis Software v 2003.

RESULTADOS

Todas las proteínas plasmáticas involucradas en el marcador de peso molecular fueron purificadas individualmente, mostrando una alta pureza, superior al 95%, como se demuestra en la figura 1, donde el carril 2 corresponde a la α_2 -M de 180.000 Da, el carril 3 al Plg humano de 92.000 Da el carril 4 a las tres cadenas que corresponden al Fg humano a saber cadena α de 66.000 Da, cadena β de 52.000 Da y cadena γ de 46.000 Da respectivamente, en el carril 5 está la banda de 23.000 Da correspondiente a la tripsina.

Estas proteínas mezcladas en presencia de agentes reductores y estabilizantes muestran las 6 bandas correspondientes a las 4 proteínas que conforman el marcador como se demuestra en la figura 1. Carriles 1 y 7, la albúmina humana en el carril 6 fue utilizada como control, por su bien conocido peso molecular y migración típica en la electroforesis, ya que es la proteína más



abundante en el proteoma plasmático humano. Este marcador de peso molecular basado en proteínas del proteoma plasmático humano, demuestra una alta precisión en diferentes porosidades de geles de acrilamida/bisacrilamida, como se demuestra en la figura 2, donde con ayuda de la proteína control (Albúmina) carril 2, en las diferentes porosidades de geles, se puede determinar el mismo peso molecular del control, como se demuestra en los geles de 7.5, 10 y 12.5% en la figura 2, respectivamente.

El análisis densitométrico del marcador de peso molecular confirma la presencia de las bandas claramente identificadas por sus pesos moleculares, como se demuestra en la figura 3.

De igual forma, la proteína control (Albúmina) muestra solo una banda a la cual se le determino su peso molecular por densitometría con ayuda del marcador de peso molecular siendo este de 68.708 Da, como se demuestra en la figura 4. El peso molecular del control fue determinado con ayuda del software Image Analysis v 2003 que nos muestra en la figura 5 la curva de calibración con tendencia lineal logarítmica con su correspondiente ecuación, utilizando los pesos moleculares y migración indicada en la tabla 1. Adicionalmente vemos el coeficiente de regresión de 0.94 que nos indica un alto grado de confiabilidad.

La figura 6 muestra la tinción con plata de un gel de 10% donde el marcador de peso molecular muestra la presencia de 6 bandas, carril 1. El carril 2 muestra que el Fg también teñido con plata tiene tres bandas, de la misma manera el control (Albúmina) consta de una sola banda, carril 3.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los métodos de purificación utilizados para cada una de las proteínas empleadas en el marcador de peso molecular elaborado en esta investigación, han sido métodos previamente reportados y utilizados en múltiples investigaciones; por tal motivo, la pureza de éstas proteínas se pudo confirmar no solo por

electroforesis SDS-PAGE, teñida con azul de comassie, sino también por métodos de tinción mucho más sensibles, como lo es la tinción con plata, la cual tiene una sensibilidad de 1-10 nanogramos por banda (Lane D, 1988).

En dichos geles se demostró que la pureza de las proteínas empleadas fue superior al 95%, de acuerdo al análisis densitométrico, en el cual se comprobó la presencia exclusiva de 6 bandas pertenecientes a las proteínas α_2 -M, Plg, Tripsina y a las cadenas con distintos pesos moleculares del Fb (α , β , γ).

Lo anterior demuestra que si bien, dentro de la elaboración del estándar se utilizó una serino-proteasa de alto poder lítico (tripsina) (Leon W, Cunningham JR, 1954), su actividad proteolítica fue completamente inhibida por los estabilizadores que contiene la solución del marcador de peso molecular. Se pudo observar también que no hubo activación del Plg a Pli, ya que no se observaron bandas (de 64kDa y 23 kDa) adicionales a las de las proteínas utilizadas en el marcador.

El marcador elaborado demostró además, una alta precisión en la determinación del peso molecular de la proteína utilizada como control, a saber, la albúmina humana cuyo peso molecular de 67 kDa, ha sido ampliamente reportado en la literatura (Sugio, et al., 1999); ya que por medio del software utilizado en el estudio, el peso molecular se determinó en 68.708 Da presentando un porcentaje de error del 2.5%, el cual es totalmente aceptable en la determinación del peso molecular de una proteína por el método electroforético, que además de rápido y sencillo es económico.

Esta forma de determinar el peso molecular de una proteína ya sea conocida o desconocida, demuestra además una alta precisión en geles de diferentes porosidades, desde 7.5 hasta 12.5 %, que son los más utilizados a nivel de análisis de proteínas, pero pueden además usarse en geles de menor y mayor porosidad, dependiendo de la proteína o péptido a la cual se le vaya a determinar su pesos molecular.

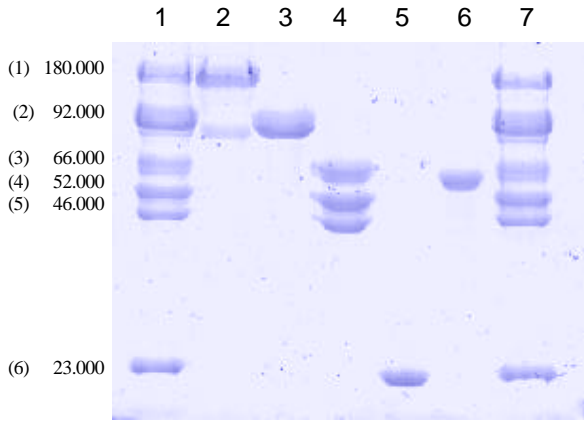


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE 10% Carriles 1 y 7: Marcador de peso molecular, Carril 2: α_2 -M, Carril 3: Plg, Carril 4: Fg (cadenas α , β , γ), Carril 5: Tripsina, Carril 6: Albúmina humana (control).

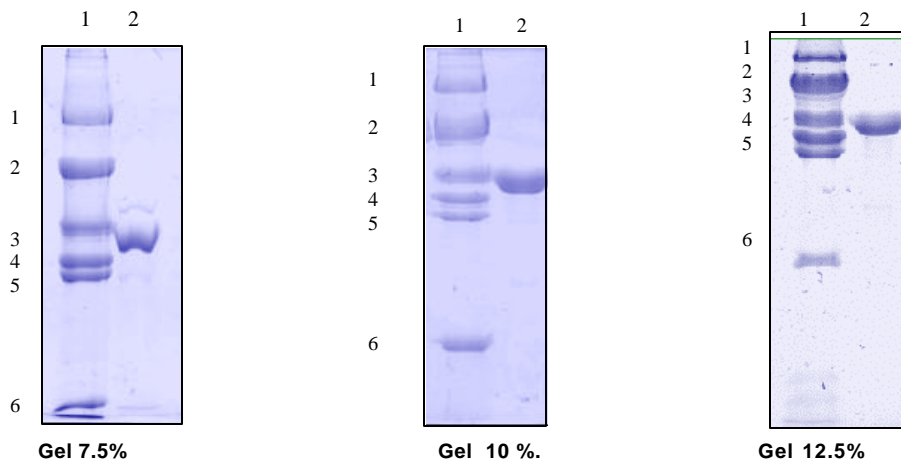


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE del Marcador de peso molecular en diferentes porocidades del gel 7.5, 10 y 12.5%. Carriles 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2: Albúmina humana (control).

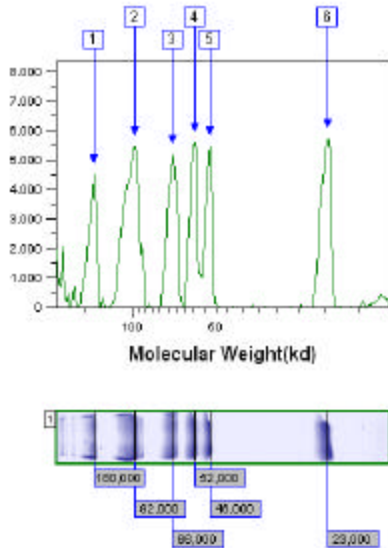


Figura 3. Análisis densitométrico del marcador de peso molecular, teñido con azul de comassie.

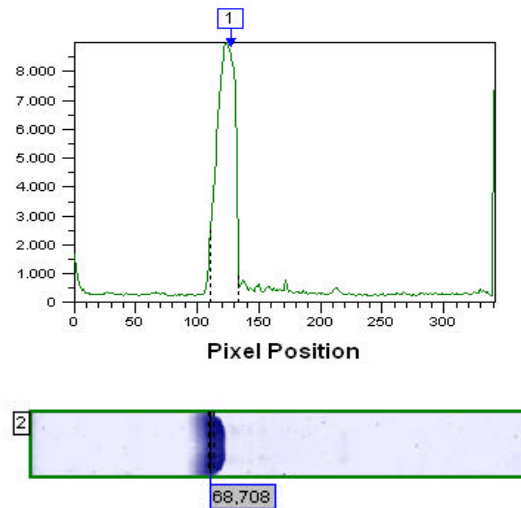
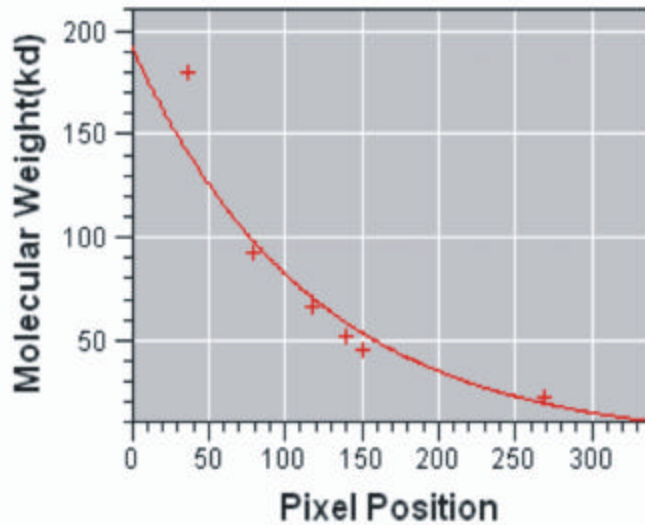


Figura 4. Análisis densitométrico de la Albúmina humana (control), teñida con azul de comassie.



Linear log curve
 $\ln y = -0,008501x + 5,260$
 R^2 Value: 0,9465

Figura 5. Curva de calibración del marcador de peso molecular, y ecuación de la curva.

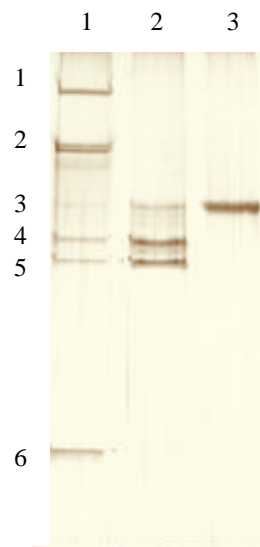


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE 10%, Tinción con plata. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Fg, Carril 3: albúmina humana (control).

Tabla 1: Valores de migración de las proteínas con relación a su peso molecular.

Banda	Peso molecular KDa.	Movilidad electroforética Rf
1	180	0,11
2	92	0,23
3	66	0,35
4	52	0,41
5	46	0,46
6	23	0,81
7*	67	0,38

*(Control, Albúmina)



Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Molecular and cellular proteomics. **1**:845-867.

Appel RD, Bairoch A, Ochstraser DFA (1994) A new generation of information retrieval tools for biologist. Biochem. Sci. **19**:258-260.

Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, and Norton R (2004) A Comparison of Albumin and Saline for Fluid Resuscitation in the Intensive Care Unit. New england journal of medicine. **350**:2247-56.

Berezin IV, Kazanskaya NF, Larionova NI (1969) Biokhimiya **35**:983-988.

Blombäck B, and Blombäck M (1957) Purification of human and bovine fibrinogen. Ark. Kemi. **10**:415.

Cañas O, Quijano A, Arbeláez LF (2007) Activación y comparación cinética del plasminógeno equino con el plasminógeno humano. Bistua **5**:43-52.

Carter DC, and Ho JX (1994) Structure of serum albumin. Adv. Protein. Chem. **45**:153-203.

Castellino FJ, et al. (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 the plasminogen/plasmin system. Thromb. Haemost. **93**:647-654.

Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, et al (2003) The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. Journal of Experimental Medicine **197**(3):315-322.

Chen JH, Chang YW, et al. (2004) Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome

analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. PNAS. **101**:17039-17044.

Cunningham JR, Leon W (1954) Molecular-Kinetic of crystalline diisopropyl phosphoryl trypsin. J. Biol. Chem. **1**:13-19.

Deutsch DG, Mertz ET (1970) Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. Science **109**:1095-1096.

Doolittle RF (1981) Fibrinogen and fibrin. Sci. Am. **92**:101.

Ficha técnica tripsina Bovina Nº T 8003 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/T8003> septiembre de 2007.

Green NM, Neurath H (1954) In The Proteins, ed. H.Neurath and K. Bailey (New York): Academic press. Vol. **2B**:1058.

Hall PK, Roberts RC (1978) Physical and Chemical Properties of Human Plasma α_2 -Macroglobulin. Biochem. J. **173**:27-38.

Hortin GL, Jortani SA, Ritchie JC, Valdes R, Chan Dw. (2006) Proteomics: A new diagnostic frontier. Clinical chemistry **52**:1218-1222.

Imber MJ y Pizzo SV (1981) Clearance and Binding of Two Electrophoretic "fast" Forms of Human α_2 -Macroglobulin. J. Biol. Chem. **256**:8134-8139.

Jameson GW, Elmore DT (1974) Affinity chromatography of Bovine Trypsin. Biochem. J. **141**:555-565.

Jensen PEH, Sottrup-Jensen (1986) Primary Structure of Human α_2 -Macroglobulin. Complete Disulfide Bridge Assignment and Localization of Two Interchain Bridges in the Dimeric Proteinase Binding Unit. J. Biol. Chem. **261**:15863-15869.

Lane D (1988) Antibodies. A laboratory manual. Ed. Harlow. 651-653.

Leon W, Cunningham JR (1954) Molecular-kinetic properties of crystalline diisopropyl, phosphoryl trypsin. J. Biol. Chem. **13**:19



- Liu R, Yang J, Ha CE, Bhagavan NV And Eckenhoff RG (2005) Truncated human serum albumin retains general anaesthetic binding activity. *Biochem. J.* **388**:39–45.
- Lundwall A, Malmheden I, Stålenheim G, Sjöquist (1981) Isolation of Component C4 of Human Complement and its Polypeptide Chains. *Eur. J. Biochem.* **117**:141-146.
- Matsuda M, Sugo T, Yoshida N, Terukina S, Yamazumi K, Niwa K, Maekawa H. (1999) Structure and function of fibrinogen: insights from dysfibrinogens. *Thromb. Haemost.* **82**:283-290.
- Putnam FW (1987) In *The plasma proteins structure, function, and genetic control.* New York Vol. **2**: Ed. Academic press.
- Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence J.J (1994) Silver staining of proteins in polyacrilamide gels: a general overview. *Cel. Mol. Biol.* **40**:57-75.
- Redl H, Kros IP, Schlag G, Hammerschmidt DE (1989) Permeability studies in a hypovolemic traumatic shock model: comparison of Ringer's lactate and albumin as volume replacement fluids. *Resuscitation* **17(1)**:77-90.
- Schroeder DD, Shaw E (1968) *J. Biol. Chem.* **243**:2943-2949.
- Siekevitz P, Palade G (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**:619-631.
- Keil B, Meloun B, Vanecek J, Kostka V, Prusik Z, Sorm F (1962) Partial structure of chymotrypsinogen. *Biochim. Biophys. Acta.* **56**:595-9.
- Sottrup-Jensen L (1987) *The Plasma Proteins.* In: Putman, F. W. editors. Orlando: Academic Press. p. 191-291.
- Sottrup-Jensen L (1989) α -Macroglobulins: Structure, Shape, and Mechanism of Proteinase Complex Formation. *J. Biol. Chem.* **264**:11539-11542.
- Sottrup-Jensen L, Hansen HF, Pedersen HS, Kristensen L (1990) Localization of Epsilon-lysyl-gamma-glutamyl Cross-links in Five Alpha₂-Macroglobulin-Proteinase Complex. Nature of the High Molecular Weight Cross-linked Products. *J. Biol. Chem.* **265**:17727-17737.
- Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D and Sadler PJ (2003) *Bioinorganic Chemistry Special Feature: Interdomain zinc site on human albumin.* *PNAS.* **100**:3701-3706.
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M and Kobayashi K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering* **12**:439-446.
- Tanaka K, Shigueoka EM, Sawatani E, and Dias GA (1998) Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31(11)**:1383-1388.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Verrills NM (2006) Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin. biochem.* **27**:99-116.
41. Wallen P (1980) Biochemistry of plasminogen. *Fibrinolysis* 2-25.
- Wallen P, Wiman B (1970) Characterization of human plasminogen on the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **221**:20-30.
- Walsh KA, Neurath H (1964) Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins. *Biochemistry* **52**:884-889.
- Ziedins KB, Vossen CY, Rosendaal FR, Umezaki K, Mann KG (2005) The plasma hemostatic proteome: thrombin generation in healthy individuals. *J. Tromb. Haemost.* **7**:1472-1481.

Recibido 22 Mayo 2007
Aceptado 22 Octubre 2007