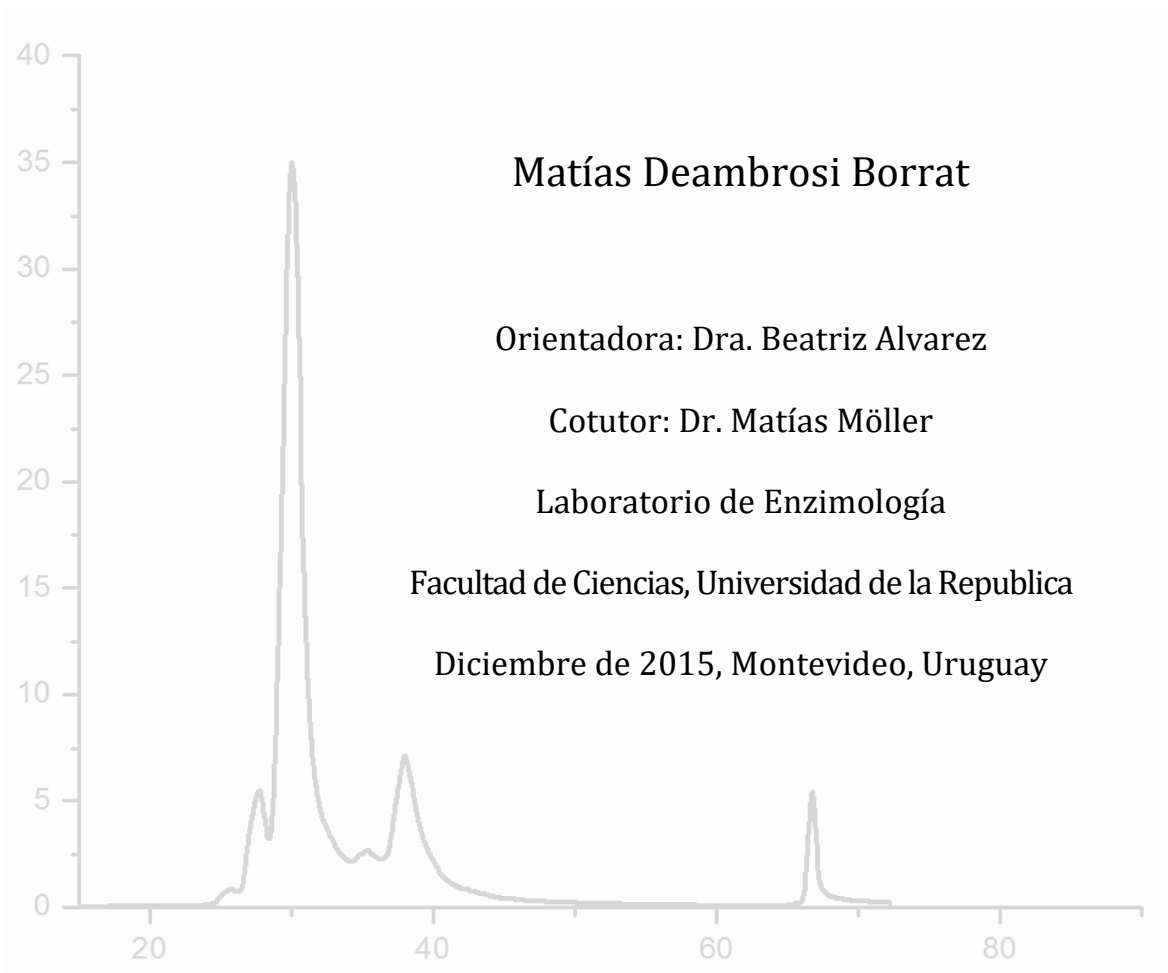


Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

## Puesta a punto de una técnica de cromatoenfoque para el análisis por HPLC de albúmina oxidada



# Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar un profundo agradecimiento a mi tutora Beatriz Alvarez, quien me brindó su apoyo constante a lo largo de mis últimos años como estudiante. Su pasión por la ciencia motiva, contagia y se convierte en el motor que impulsa a todos los que trabajan a su lado. Gracias por tus consejos, enseñanzas y dedicación brindada en esta etapa de mi vida.

A Lucía Turell por su constante orientación, valiosos comentarios y sugerencias, tu ayuda fue un pilar importante en mi formación y en el desarrollo de esta tesina.

A Matías Möller y Horacio Botti por compartir sus conocimientos y vasta experiencia. Siempre me brindaron una reveladora perspectiva en el análisis de los resultados.

Por último quiero agradecer a todos mis compañeros de los laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica por siempre estar dispuestos a brindarme su apoyo en cada etapa de este proceso.

---

*It is not important for the scientist whether his own theory proves the right one in the end. Our experiments are not carried out to decide whether we are right, but to gain new knowledge. It is for knowledge sake that we plow and sow. It is not inglorious at all to have erred in theories and hypotheses. Our hypotheses are intended for the present rather than for the future. They are indispensable for us in the explanation of the secured facts, to enliven and to mobilize them and above all, to blaze a trail into unknown regions towards new discoveries.*

R. Willstätter  
Willard J. Gibbs Medal Address  
Chicago, IL, September 14, 1933 (24)

---

# Tabla de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción .....	2
1.1. Proteínas y su purificación .....	2
1.2. Cromatografía de intercambio iónico y cromatoenfoco .....	4
1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) .....	6
1.3.1. Conceptos teóricos.....	6
1.4. Albúmina sérica humana (HSA).....	10
1.5. Tiol de la HSA y su oxidación .....	12
1.6. Albúmina y cromatografía.....	13
2. Objetivos .....	16
2.1. Objetivos generales.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Materiales y métodos .....	17
3.1. Soluciones de HSA.....	17
3.2. Cuantificación de albúmina.....	17
3.2.1. Medidas espectrofotométricas .....	17
3.2.2. Método del púrpura de bromocresol.....	17
3.3. Cuantificación de tioles .....	18
3.4. Reducción del tiol libre de la albúmina .....	18
3.5. Bloqueo de tioles con $Hg^{2+}$ .....	19
3.6. Oxidación con peróxido de hidrógeno .....	19
3.7. Preparación de soluciones de catalasa .....	20
3.8. Procedimiento cromatográfico .....	21
3.8.1. Equipamiento .....	21
3.8.2. Soluciones y amortiguadores .....	21
3.8.3. Muestras.....	21
3.8.4. Método.....	22
3.8.5. Limpieza de la columna .....	23
3.8.6. Purificaciones semipreparativas de HSA-SH .....	23
3.9. Aproximación a la determinación del $pK_a$ del ácido sulfénico .....	23
3.9.1. Aproximación de punto final.....	23
3.9.2. Aproximación de velocidades iniciales.....	23

---

4.	Resultados y Discusión .....	25
4.1.	Puesta a punto y optimización del método .....	25
4.1.1.	Regeneración de la columna y primeras pruebas .....	25
4.1.2.	Rol de la concentración de muestra en la resolución cromatográfica.....	29
4.1.3.	Rol de la temperatura en la resolución cromatográfica .....	30
4.2.	Bloqueo de tioles con Hg <sup>2+</sup> .....	31
4.3.	Análisis de HSA en una muestra de plasma .....	32
4.4.	Cuantificación de HSA en plasma.....	33
4.5.	Purificación semipreparativa de HSA-SH .....	34
4.6.	Integración de picos complejos.....	35
4.6.1.	Tangent Skim (Exponential curve fitting) .....	36
4.6.2.	Tangent skim OFF .....	37
4.6.3.	Valley to Valley .....	39
4.7.	Aproximación a la determinación del pK <sub>a</sub> del ácido sulfénico .....	41
4.7.1.	Aproximación de punto final .....	42
4.7.2.	Aproximación de velocidades iniciales.....	46
5.	Conclusiones.....	52
6.	Bibliografía .....	53

---

## Resumen

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante del plasma. Presenta un peso molecular de 66 kDa y consta de 585 aminoácidos, de los cuales 35 son cisteínas. De éstas sólo la cisteína 34 se encuentra libre, mientras que las restantes forman 17 puentes disulfuros.

La cisteína y sus derivados de alto y bajo peso molecular son reductores y nucleófilos relativamente fuertes que pueden reaccionar con oxidantes de uno o dos electrones con constantes de reacción en general elevadas. En el plasma el tiol predominante es el de la HSA por lo que resulta ser un blanco importante de especies oxidantes. Estas reacciones generan una heterogeneidad en cuanto al estado de oxidación de la cisteína 34. Aproximadamente un 70% de la HSA circula con su tiol en forma reducida (HSA-SH) mientras que alrededor de 30% circula con su tiol formando disulfuros mixtos (HSA-SSR) con tioles de bajo peso molecular. A su vez, se puede encontrar una fracción minoritaria de HSA oxidada al estado de ácido sulfínico (HSA-SO<sub>2</sub>H) en la circulación.

Recientemente, se desarrolló una técnica que permite el análisis de variantes de HSA oxidada a nivel del tiol libre en muestras biológicas (Turell, Botti et al, 2014, J.Chromat.B 944, 144-151). Esta técnica involucra la utilización de una columna intercambiadora aniónica débil de alta resolución a un pH próximo al del punto isoeléctrico de la HSA y un método de elución basado en un gradiente de pH.

En este trabajo se realizó la puesta a punto de esta técnica en el equipamiento presente en nuestro laboratorio. Se obtuvieron condiciones para la separación de los picos correspondientes a HSA-SH y HSA-SO<sub>2</sub>H. El primero coelúa con productos de oxidación de similar carga como HSA-SOH/HSA-SX y se resolvió utilizando HgCl<sub>2</sub> para modificar al tiol.

La técnica permitió purificar el producto del decaimiento espontáneo del ácido sulfénico de la HSA al que denominamos HSA-SX para realizar estudios por espectrometría de masa que permitan elucidar su naturaleza química. Además se utilizó la técnica para intentar determinar el pK<sub>a</sub> del ácido sulfénico de la HSA.

# 1. Introducción

## 1.1. Proteínas y su purificación

*“Le nom protéine que je vous propose pour l’oxyde organique de la fibrine et de l’albumine, je voulais le dériver de πρώτειος parce qu’il paraît être la substance primitive ou principale de la nutrition animale”.*

*Carta de J. Berzelius para G. Mulder, 10 de Julio, 1838*

El término “proteína” deriva del griego πρώτειος que significa “en primer lugar” y fue acuñado por J. Berzelius en una carta a su colaborador G. Mulder el 10 de Julio de 1838. Previamente a este momento fue el químico francés Antoine Fourcroy (1755-1809) el primero en reconocer a las proteínas como una clase distinta de moléculas biológicas. Junto a otros, en 1789 reconoció tres diferentes variedades de proteínas de fuentes animales que fueron llamadas albúmina, fibrina y gelatina. Al menos dos más eran conocidas de fuentes vegetales y todas eran comúnmente llamadas albúminas. En 1837-1838 Mulder enfocó sus estudios en el estudio elemental de sustancias que contenían nitrógeno, conocidas como “albúminas”. Gracias a la indispensable ayuda de Berzelius quien sugirió los métodos de análisis para el sulfuro y el azufre, dos elementos presentes en estas sustancias en estudio, Mulder descubrió algo que fue la piedra fundamental del concepto de proteínas. A pesar de las diferencias en las cantidades de azufre y fósforo, estas sustancias tenían una increíble similitud en su composición química y definió que compartían una misma fórmula empírica  $C_{400}H_{620}N_{100}O_{120}P_1S_1$ . A pesar de que esta estimación puede parecer vaga en el sentido moderno y que llevó a Mulder a realizar conclusiones erróneas, fue el primer estudio que demostró una relación en la composición de estas sustancias particulares. Más de cuatro décadas más tarde Herman Emil Fischer logró la síntesis de un dipéptido, demostrando de qué forma los aminoácidos pueden unirse, y en ese mismo año (1901) el profesor Franz Hofmeister propuso que las proteínas están compuestas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amidas. Posteriores avances en el desarrollo de nuevos conceptos y métodos de análisis permitieron al químico americano James B. Sumner en el año 1926 aislar y cristalizar la enzima ureasa demostrando indefectiblemente que las enzimas son proteínas, una pregunta controversial en la época. Las enzimas crecieron en popularidad al ser propuestas como responsables de los procesos de fermentación en bacterias y la asociación entre proteínas y enzimas resultó ser un fuerte impulsor del estudio de la bioquímica de proteínas.<sup>1,2</sup>

Existe un vínculo muy estrecho entre nuestra comprensión de los procesos bioquímicos y nuestra capacidad de purificar los materiales biológicos. Es en la mayoría de los casos imprescindible disponer de nuestro material de estudio, en este caso una proteína, libre de otros contaminantes que puedan interferir en los ensayos fisicoquímicos que buscan elucidar sus características y propiedades. Este paso involucra en muchas situaciones un esfuerzo considerable pues hay que tener en cuenta que una célula típica contiene miles de sustancias diferentes, varias de las cuales guardan semejanzas en sus propiedades físicas y químicas con la proteína de interés. A su vez la proteína en cuestión puede encontrarse en muy baja relación respecto al peso de tejido seco. Es común la purificación de materiales que representan una cantidad menor al 1% del peso seco del tejido para obtenerlo en una fracción de hasta ~ 98% de pureza. Las técnicas de purificación de proteínas fueron una herramienta clave en el proceso histórico de su caracterización. Estas existen hace más de 200 años siendo el mismo Antoine

Fourcroy en 1789 el primero en purificar sustancias similares a la albúmina de huevo a partir de extractos vegetales por medio de técnicas de precipitación. Los primeros métodos de separación se basaron en el filtrado, precipitación y cristalización de la muestra. La demanda de nuevas estrategias que permitieran la purificación de muestras particulares dio lugar a la elaboración de diferentes técnicas que explotaban las diferentes propiedades fisicoquímicas de las proteínas. La tabla 1 presenta una perspectiva cronológica de estos descubrimientos describiendo algunos de los hitos en la de la purificación de proteínas<sup>2,3</sup>.

**Tabla 1. Hitos en la historia de las técnicas de purificación de proteínas. Adaptado de <sup>2</sup>.**

<i>Precipitación</i>	1789	<i>Fourcroy</i>
<i>Cristalización de hemoglobina</i>	1840	<i>Hoppe-Seyler</i>
<i>Cristalización de ovoalbúmina</i>	1889	<i>Hofmeister</i>
<i>Cromatografía</i>	1903	<i>Tswett</i>
<i>Ultracentrifugación</i>	1924	<i>Svedberg</i>
<i>Electroforesis (moving-boundary)</i>	1937	<i>Tiselius</i>
<i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	1940	<i>El proyecto Manhattan</i>
<i>Partición en dos fases</i>	1955	<i>Albertsson</i>
<i>Cromatografía de exclusión molecular (gel filtración)</i>	1955, 1959	<i>Lindqvist y Storgards, Porath y Flodin, Ingelman</i>
<i>Cromatografía con hidroxapatita</i>	1956	<i>Tiselius et al.</i>
<i>Sephadex™ (medio para gel filtración)</i>	1959	<i>Pharmacia</i>
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>	1959	<i>Raymond y Weintraub</i>
<i>Enfoque isoeléctrico</i>	1959	<i>Kolin</i>
<i>Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)</i>	1941; 1966	<i>Martin y Synge</i>
<i>Sefarosa™</i>	1967	<i>Pharmacia</i>
<i>SDS-PAGE</i>	1967	<i>Shapiro et al.</i>
<i>Cromatografía de afinidad por ligando</i>	1967	<i>Axé, et al.</i>
<i>Cromatografía de afinidad</i>	1968	<i>Cuatrecasas et al.</i>
<i>Cromatografía de fase reversa</i>	1970	<i>Kirkland; Molnar y Horvath</i>
<i>Cromatografía por interacción hidrofóbica</i>	1973	<i>Porath; Hjertén</i>
<i>Cromatografía en dos dimensiones</i>	1975	<i>O' Farrel</i>
<i>Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados</i>	1975	<i>Porath</i>
<i>Cromatoenfoque</i>	1977	<i>Sluyterman y Wijdenes</i>
<i>Electroforesis capilar</i>	1981	<i>Jorgenson y Lukacs</i>
<i>Cromatografía líquida de proteína rápida</i>	1982	<i>Pharmacia</i>
<i>Cromatografía de afinidad por histidina</i>	1988	<i>Smith et al., Hochuli et al.</i>
<i>Diseño del ÄKTA™</i>	1996	<i>Pharmacia</i>

A mediados del siglo XIX se obtuvieron los primeros cristales de proteínas, siendo éstos de hemoglobina, en un trabajo del químico y fisiólogo alemán Felix Hoppe-Seyler (1840). En la época, la obtención de cristales de una muestra se entendía como el resultado de alcanzar un elevado grado de pureza. En el escenario de la segunda guerra mundial y bajo una gran demanda de fracciones de plasma humano para el tratamiento de los heridos en batalla, el bioquímico americano Edwin Cohn desarrolló un método que permitía la purificación de albúmina a nivel



industrial cumpliendo con exigentes estándares de calidad. Las soluciones de HSA fueron utilizadas en el campo de batalla, salvando incontables vidas<sup>4</sup>.

A principios del siglo XX surge una técnica que revolucionaría el futuro de la purificación de proteínas. No es posible hablar de cromatografía sin nombrar a los británicos Archer J. P. Martin y Richard L. M. Synge quienes en 1945 recibieron el premio Nobel de Química por la descripción, aplicaciones y variaciones de la cromatografía. Pero no fueron ellos quienes descubrieron la técnica ni quienes le dieron su nombre. Fue el botánico ruso Mijaíl Semiónovich Tswett (también Tsvett, Tswet, Zwet) quién en 1903 separó pigmentos de plantas utilizando una columna casera rellena de polvo de tiza (carbonato de calcio) (fase estacionaria) y una solución de disulfuro de carbono (fase móvil)<sup>5</sup>. Tres años más tarde Tswett bautiza este procedimiento con el nombre de cromatografía que proviene del griego χρώμα (chroma) que significa color en referencia a las bandas coloreadas que observaba en sus experimentos. Mijaíl Tswett fijó los pilares de las técnicas de separación cromatográficas que se utilizan hoy en día como técnicas de rutina por muchos científicos. Los años posteriores llegaron con grandes avances en las herramientas cromatográficas. Los aportes de Archer J.P Martin y Richard L. M. Synge revelaron que los principios de la técnica desarrollada por Tswett poseían múltiples aplicaciones y el desarrollo de nuevas matrices junto a otros avances tecnológicos derivaron en múltiples variedades de cromatografías que atendían a los más diversos problemas de purificación de materiales biológicos<sup>6</sup>.

## 1.2. Cromatografía de intercambio iónico y cromatoenfoco

Como es de particular interés en este trabajo la cromatografía de intercambio iónico se explican a continuación los principios generales de toda cromatografía y los involucrados específicamente en la cromatografía de intercambio iónico.

Una cromatografía líquida es una técnica de separación y se basa en la adsorción selectiva de los compuestos de una mezcla. En este tipo de cromatografía existen dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria y una móvil (fase móvil) que fluye de forma continua durante el análisis. Existen diferentes tipos de fases estacionarias (alúminas, sílice, resinas de intercambio iónico) y de fases móviles (en general un líquido o mezcla de líquidos) que presentan diferencias en su capacidad de interactuar con los compuestos de la mezcla que se desea separar. De esta manera el fundamento de la técnica se basa en utilizar una de las fases, por ejemplo la fase estacionaria, que interactúe específicamente con el compuesto de interés reteniéndolo por más tiempo mientras se hace fluir la fase móvil que interactúa con otros componentes de la muestra de manera que estos últimos eluyen antes que el compuesto de interés. Existen varios tipos de cromatografía líquida dependiendo del tipo de las interacciones que existen entre los compuestos de la muestra y las fases estacionaria y móvil elegidas<sup>3</sup>.

El bioquímico alemán Franz Hofmeister indicó hace más de 100 años que las proteínas están compuestas por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Hoy sabemos que estos aminoácidos difieren entre sí en su cadena lateral presentando diferentes propiedades. La naturaleza química de estos grupos provoca que varios de ellos sean ionizables y presenten una variedad de valores de  $pK_a$ . Es por esto que la variabilidad en la composición aminoacídica de las proteínas resulta en variabilidad en su carga neta. Existe un valor de pH en el cual las cargas positivas y las cargas negativas de una proteína se contrarrestan de manera que la carga neta total es igual a cero. A este valor de pH se le denomina punto isoeléctrico y es característico de cada proteína. Es posible realizar una curva de valoración que demuestre la dependencia de la carga neta de una proteína con el pH de la solución. Lo que se observa en estas curvas es que la proteína presenta carga positiva en aquellos valores de pH que se encuentran por debajo de su

punto isoeléctrico y de manera opuesta presenta carga negativa en valores de pH que sobrepasan su punto isoeléctrico<sup>3</sup>.

La cromatografía de intercambio iónico utiliza la carga de la proteína en condiciones que promueven las interacciones electrostáticas con la fase estacionaria. Para esto se desarrollaron diferentes matrices cargadas que son empaquetadas en columnas de camisa de vidrio o metal y cumplen el rol de fase estacionaria. Estas matrices están compuestas por diferentes materiales que varían según su porosidad, estabilidad física, estabilidad química e interacciones inespecíficas. En general estas matrices se componen de un soporte sustituido con grupos funcionales que determinan la carga. Dentro de los soportes más comunes se encuentran los de sefarsa compuestas por polímeros de agarosa y otros varios compuestos de poliestireno/divinilbenceno. Por otro lado dentro de los grupos funcionales más conocidos se encuentran el dietilaminoetil (DEAE), amonio cuaternario (Q), sulfopropil (SP) y metilsulfonato (S)<sup>7</sup>. Las matrices derivatizadas con grupos funcionales que poseen carga positiva se denominan intercambiadores aniónicos y los que poseen carga negativa intercambiadores catiónicos. Se clasifican en fuertes y débiles según el grado de variación que presenta su estado de ionización con el pH. El punto isoeléctrico de la proteína que deseamos separar nos brindará una primera pista para la elección de la matriz adecuada.

El procedimiento general de la técnica de intercambio iónico consiste en utilizar un amortiguador A, también denominado amortiguador de unión, que posea un pH que difiera en el valor del PI de la proteína por uno o dos puntos. De esta forma la proteína presentará carga positiva o negativa y será capaz de unirse a una matriz que presente la carga contraria. Una vez que la muestra es cargada en la columna es común incluir un paso de lavado con el amortiguador de unión de forma que eluyan todos aquellos contaminantes que no interaccionan con la matriz. Dependiendo de la cromatografía, el amortiguador utilizado para el lavado puede ser el mismo amortiguador de unión o diferir en aspectos que se explican a continuación. Para la elución de la proteína de interés existen dos estrategias muy utilizadas. La más común involucra un aumento de la fuerza iónica al aumentar la concentración de sales en el amortiguador. En este caso un aumento de la fuerza iónica se traduce en un aumento en la competencia de los iones salinos por las cargas de la matriz provocando el debilitamiento de las interacciones entre la matriz y la proteína. Es común realizar un gradiente de concentración salina (o un lavado con baja fuerza iónica) para romper primero aquellas interacciones débiles y obtener en las fracciones posteriores la proteína en un mayor grado de pureza<sup>3</sup>. La segunda estrategia es variar el pH en el sentido del punto isoeléctrico de la proteína para que ésta pierda su carga y se desprenda de la matriz. Cuando se realiza un gradiente de pH para provocar la elución de la proteína la técnica se denomina cromatoenfoco<sup>8</sup>.

Como todas las técnicas, la de cromatoenfoco tiene ventajas y desventajas. Su principal restricción es el riesgo de precipitación de la proteína si se encuentra en concentraciones altas y a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico donde no posee carga neta. Por esta razón esta técnica solo puede ser utilizada con proteínas que no precipiten en valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico. Por otro lado el cromatoenfoco es conocido por su alta resolución, siendo capaz de separar proteínas que difieren en valores de PI de 0.02 unidades de pH. Su alta resolución permite muchas veces separar isoformas que presentan propiedades muy similares<sup>7</sup>.

Hay dos conceptos claves que explican la alta resolución de la técnica de cromatoenfoco. El primero es que el desarrollo del gradiente de pH es lento en comparación a los gradientes que se utilizan en otro tipo de cromatografías. El segundo es que el flujo de elución es rápido. Esto quiere decir que durante un cromatoenfoco, proteínas con puntos isoeléctricos diferentes migrarán a ritmos distintos a medida que se desarrolla el gradiente de pH. Éstas se van a unir y disociar continuamente provocando su acumulación en bandas angostas que eventualmente van a eluir de la columna<sup>7</sup>.

### 1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y Cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC)

Los estudios de Martin y Synge en 1941 indicaban que una cromatografía líquida de alto desempeño sería posible si se utilizaban partículas mucho más pequeñas como fase estacionaria y grandes diferencias de presión en el largo de la columna. La aparición de sistemas automatizados que posibilitaban la aplicación de mayores presiones marcó un antes y un después en la historia de la purificación de proteínas<sup>6</sup>.

El primer sistema automatizado que hizo uso de los principios de la cromatografía líquida fue el analizador de aminoácidos introducido en 1957. Este instrumento posibilitó el análisis de la composición de hidrolizados proteicos mediante una cromatografía de intercambio iónico y fue el predecesor del moderno instrumento de cromatografía líquida de alto desempeño o HPLC (High Performance Liquid Chromatography)<sup>6</sup>. En la década del 60 existían muy pocos instrumentos sistematizados de cromatografía líquida, siendo la mayoría máquinas caseras inventadas por científicos universitarios. Fue a fines de la década del 60 que Jim Waters, quien se había interesado en el desarrollo de un sistema de cromatografía líquida de alta presión, presentó el primer HPLC comercial con el nombre de ALC-100<sup>9</sup>. En los años siguientes la creciente necesidad del análisis de pequeñas moléculas como drogas por la industria farmacéutica sumada a la necesidad de mejores análisis de biomoléculas producto del crecimiento del área biotecnológica posicionaron a la técnica de HPLC como una de las más importantes en el análisis de biopolímeros en todos los campos de la ciencia. En 1982 Pharmacia (ahora incorporada a GE Healthcare) diseñó un sistema cromatográfico integrado denominado FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) que atendía a las necesidades específicas de los químicos enfocados en el estudio de proteínas. Básicamente estos equipos se componen de un sistema de módulos que integran una o dos bombas de alta precisión, una unidad de control, la columna elegida, un sistema de detección y un colector de fracciones. Esta nueva tecnología permitió la sistematización y reproducibilidad de los procedimientos cromatográficos, dos puntos determinantes a la hora de definir un protocolo experimental. La principal diferencia entre FPLC y HPLC reside en la capacidad de los equipos de ejercer presión sobre las columnas lo que provocó que muchos traduzcan la sigla HPLC como High Pressure Liquid Chromatography o cromatografía líquida de alta presión<sup>6</sup>.

#### 1.3.1. Conceptos teóricos

El objetivo clave en toda cromatografía es obtener una buena resolución. Éste se entiende como la capacidad de separar dos o más compuestos de una mezcla. Hay varios factores que afectan la resolución de una separación por cromatografía de intercambio iónico. A continuación, se detallan los fundamentos teóricos que definen la resolución de una cromatografía.

##### *Volumen de retención*

El volumen de retención ( $V_R$ ) se define como el volumen de elución de la fase móvil en el que sale el compuesto de interés. Este es característico de cada compuesto y se relaciona con el factor de retención ( $k'$ ) según:

$$V_R = V_0 \times (1 + k') \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $V_0$  (también denominado volumen muerto o  $V_M$ ) se define como el volumen de fase móvil necesario para eluir una sustancia no retenida. El factor de retención ( $k'$ ) o factor de capacidad define la velocidad de migración de un analito en una columna determinada y se calcula según:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $V_R$  es el volumen de retención, es decir el volumen de amortiguador necesario para eluir el compuesto de interés. También es muy común utilizar el parámetro tiempo de retención ( $t_R$ ), éste es similar al volumen de retención, pero tiene en cuenta además del tiempo necesario para eluir el analito, el tiempo que éste demora en alcanzar el detector.

### *Eficiencia*

La eficiencia de una cromatografía se puede definir como la capacidad de la columna de producir picos finos y simétricos. Está se relaciona con el fenómeno de ensanchamiento de banda que ocurre dentro de la columna. Una de las principales causas de este fenómeno es la difusión longitudinal de las moléculas de soluto y puede ser reducido si se achican las distancias disponibles para la difusión, por ejemplo empaquetando la fase estacionaria adecuadamente y evitando la formación de burbujas.

Para expresar una medida de la eficiencia de la columna se utiliza el modelo de los platos teóricos. Éste asume que la columna cromatográfica contiene un número determinado de capas adyacentes entre las cuales hay suficiente espacio para que un analito se encuentre en equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil. A estas capas se las conoce como platos teóricos y su número ( $N$ ) proporciona la medida de la eficiencia de la columna, cuantos más platos teóricos más eficiente será la columna. La longitud de una columna ( $L$ ) contiene una altura equivalente de plato teórico (HETP: Height equivalent to a theoretical plate) que normalmente es expresada en  $\mu\text{m}$ . Los valores de  $N$  y de HETP para cada columna particular difieren según el analito. Estos se relacionan según:

$$HETP = \frac{L}{N} \quad \text{Ecuación 3}$$

Por lo que cuanto más pequeño la HETP mayor será la eficiencia de la columna. La cantidad de platos teóricos puede calcularse a partir del cromatograma a partir del pico de un compuesto determinado. El número de platos teóricos ( $N$ ) se define como:

$$N = \frac{t_R^2}{s^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $s$  es la desviación estándar del pico del cromatograma y  $t_R$  es el tiempo de retención previamente definido. Para picos Gaussianos simétricos la anchura en la base ( $w_b$ ) calculada prolongando las tangentes a las curvas del pico hasta cortar el eje de las  $x$  en dos puntos es igual a  $4s$ . Otra forma de calcular  $s$  es medir la anchura del pico a la mitad de su altura ( $w_{1/2}$ ) que es igual a 2.354 desviaciones estándar y por tanto<sup>8</sup>:

$$s^2 = \left[ \frac{w_{1/2}}{2.354} \right]^2 \quad \text{Ecuación 5}$$

Con esto podemos calcular N a la mitad de altura del pico según<sup>8</sup>:

$$N = \frac{5.54 * t_R^2}{w_{1/2}^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

La teoría de los platos no contempla el tiempo necesario para que el analito se equilibre entre la fase móvil y la fase estacionaria (supone un equilibrio infinitamente rápido). Como la fase móvil se desplaza a través de la columna con cierta velocidad el movimiento de los solutos no puede describirse en términos de equilibrio. La ecuación de van Deemter considera los distintos mecanismos que contribuyen al ensanchamiento de los picos:

$$H = \frac{(A + B)}{(u + Cu)} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde  $u$  es la medida de la velocidad de la fase móvil ( $m\ s^{-1}$ ),  $A$  representa la difusión de Eddy ( $m$ ),  $B$  la difusión longitudinal ( $m^2\ s^{-1}$ ) y  $Cu$  la resistencia a la transferencia de masa ( $s$ )<sup>10</sup>. Posterior a la ecuación de Van Deemter otros investigadores, Giddings (1965), Horvath y Lin (1976) y Knox (1977) desarrollaron sus propias teorías formulando nuevas ecuaciones<sup>11</sup>.

### Selectividad

La selectividad ( $\alpha$ ) de la columna indica el grado de separación entre los picos que eluyen de la misma y se expresa en función del tiempo de retención de los máximos de los picos para cada analito:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad \text{Ecuación 8}$$

En general la selectividad varía en función de características del sistema como la composición de la fase móvil (pH, fuerza iónica, solvente orgánico modificador), la forma de elución (gradiente o constante) o el tipo de columna.

### Resolución

La resolución es el parámetro utilizado para definir la calidad de una separación como una medida numérica de la separación entre dos compuestos. Esta se define según:

$$R_S = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{1/2(W_1 + W_2)} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde  $V_R$  es el volumen de retención de cada compuesto y  $W_i$  la anchura de cada pico. Existen tres formas de estimar o calcular la resolución<sup>8</sup>:

1. Cálculos basados en la ecuación 9
2. Comparación con curvas de resolución estándar
3. Cálculos basados en la altura del valle entre dos picos

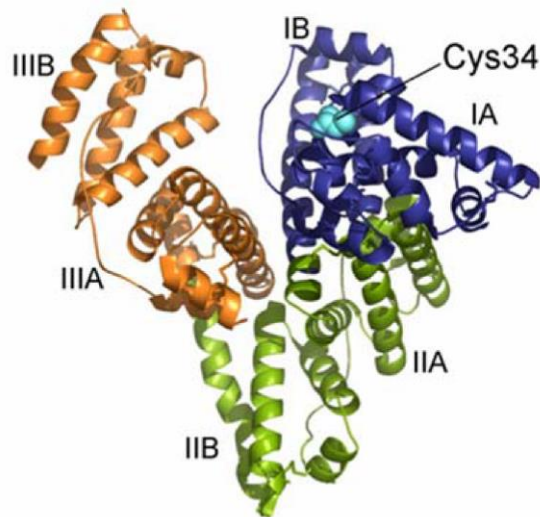
Es posible calcular la resolución con la ecuación 9 si los picos se encuentran separados y bien definidos de manera que los volúmenes de retención puedan ser determinados de forma fiable. Para picos que se superponen son convenientes las opciones dos y tres.

En la opción número dos es posible comparar el cromatograma obtenido con diferentes curvas de resolución estándar. Para esto se debe en primera instancia obtener las curvas de calibración estándar utilizando compuestos conocidos que tengan propiedades similares a los compuestos de interés. Estas poseen un valor de resolución definido y la elección de la curva que más se asemeje al cromatograma obtenido deriva en la determinación de su resolución. La opción número tres involucra un cálculo basado en la altura del valle entre dos picos. Éste método puede ser utilizado para valores de  $0.8 < R_s < 1.5$ . Si bien requiere de mayor esfuerzo, brinda valores de  $R_s$  más precisos. La altura del valle ( $h_v$ ) entre dos picos permite estimar la resolución y el error en la estimación del área producto de su superposición.  $h_v$  se expresa como un porcentaje de la altura del pico más pequeño. Una vez obtenido el valor de  $h_v$  se busca el valor de  $R_s$  y el error en la estimación de las áreas en las tablas correspondientes.<sup>8</sup>

La resolución es entonces una medida relativa de la separación entre dos picos. Un valor de  $R_s = 1.0$  indica que se alcanzó un 98% de pureza en una recuperación de un 98% del pico. Una muy buena resolución se alcanza cuando la detección de la señal regresa a la línea de base entre un pico y otro. Esto sucede para valores de  $R_s > 1.5$ . Entonces existen tres parámetros fundamentales que influyen en la resolución de una separación cromatográfica y estos son, la eficiencia de la columna, la selectividad y el factor de retención. Maximizar estos tres parámetros debe ser el objetivo principal de todo aquel que busque la optimización de una técnica cromatográfica<sup>12</sup>.

#### 1.4. Albúmina sérica humana (HSA)

El nombre albúmina evolucionó del término más general, *albumen*, una palabra alemana sinónima de proteína. Ésta proviene del latín *albus* (blanco) del color que toma la clara del huevo al ser calentada. La primera apreciación de la HSA se remonta unos 400 años A.C. cuando el padre de la medicina occidental, Hipócrates de Cos, describe en su trabajo “*Aphorisms*” que un paciente que produce orina “espumosa”, provocada por la presencia de HSA, posee una enfermedad crónica de riñón <sup>13</sup>.



**Figura 1. Estructura tridimensional de la HSA.** El dominio I se muestra en azul, el II en verde y el III en naranja. La Cys34 se muestra en naranja. Tomado de <sup>14</sup> código de acceso del PDB: 1A06.

La HSA es la proteína más abundante del plasma y es, sin duda, una de las proteínas más estudiadas en la historia de la ciencia. La estructura primaria de la proteína revela que se trata de un único polipéptido de 585 aminoácidos (66438 g/mol) presentando 17 puentes disulfuro y una única cisteína libre, la Cys34<sup>15</sup>. A su vez posee un único triptofano y un alto número de aminoácidos cargados responsables de su alta solubilidad incluso a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico. A pH fisiológico la proteína presenta ~19 cargas negativas debido al alto número de aminoácidos ácidos. La HSA jugó un rol principal en la historia de la descripción y purificación de proteínas. De hecho fue una de las primeras proteínas en ser cristalizada. Su extensa historia se encuentra fielmente resumida en textos específicos <sup>13</sup>.

La elucidación de su estructura permaneció por muchos años inconclusa. En la década del 70 se reportaron varios cristales <sup>16,17</sup> pero éstos no brindaban información estructural debido a su pobre reproducibilidad. La primera estructura cristalográfica de la HSA resuelta por difracción de rayos X fue reportada por Carter y su grupo de investigación <sup>18</sup>. Más adelante el grupo de Carter y otros reportaron estructuras cristalográficas de mayor resolución <sup>19-20</sup> y estructuras de la proteína unida a compuestos de interés <sup>21-22</sup>. Al día de hoy la información estructural de la HSA es abundante. Sabemos que se trata de una proteína monomérica, globular, que posee un patrón repetido de tres dominios helicoidales estabilizados por múltiples puentes disulfuro. Está compuesta por tres dominios homólogos I, II y III que se dividen en dos subdominios (A y B). La estructura terciaria de la proteína se compone de 67% de  $\alpha$ -hélice, nada de hoja- $\beta$ , 10% de giros  $\beta$  y 23% de cadena extendida (Figura 1). La proteína sufre varios cambios conformacionales cuando es sometida a condiciones no fisiológicas. Estos involucran pequeños cambios conformacionales debido a leves cambios de pH y alteraciones más extensas a pHs extremos.

Se han observado cuatro conformaciones producto de cambios en el pH: N (“normal”) entre pH 4.3 y 8, F (“fast”) entre pH 3 y 4.3, E (“extended”) a pH menor que 3, B (“basic”) a pH mayor que 8 y A (“aged”) a pH mayor que 10<sup>13</sup>.

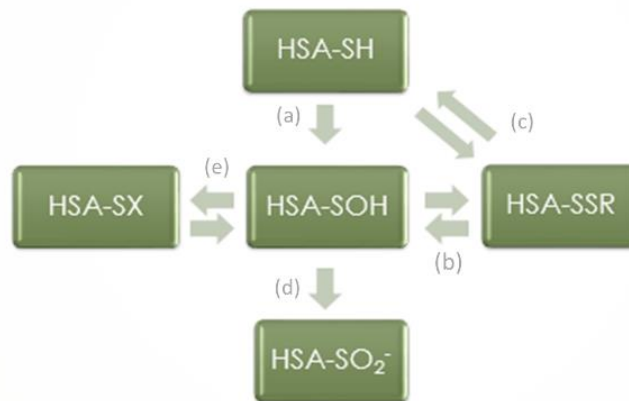
La HSA representa el 60 % de todas las proteínas del plasma sanguíneo y se encuentra en una concentración de ~43 g/L o 0.6 mM. Se sintetiza principalmente en los hepatocitos a una velocidad aproximada de ~10-15 g por día en adultos sanos y posee una vida media de 19 días. Solo un 40% de la HSA se encuentra en el compartimiento intravascular mientras que el restante 60% se encuentra en espacios intersticiales y extracelulares, principalmente piel y músculo. Se ha estimado que el ciclo de circulación de la HSA es de 22-24 horas. Sus funciones se encuentran principalmente relacionadas al transporte de iones y un amplio espectro de ligandos. Juega un rol importante en el mantenimiento de la presión coloidosmótica, así como también en la regulación de los niveles plasmáticos de Ca<sup>2+</sup>. Además, presenta importantes funciones de protección, uniendo toxinas para volverlas menos reactivas y jugando un aparente papel de proteína antioxidante que se detallará más adelante<sup>13,14</sup>.



### 1.5. Tiol de la HSA y su oxidación

La HSA presenta 35 cisteínas de las cuales 17 se encuentran formando puentes disulfuro. La cisteína 34, su única cisteína libre, se encuentra muy conservada en todas las albúminas de mamíferos y ha sido un importante foco de estudio dentro de las particularidades de esta proteína<sup>13</sup>.

La exposición de la HSA a un oxidante como el peróxido de hidrógeno lleva a la formación de un ácido sulfénico (HSA-SOH), el cual puede reaccionar con un tiol de bajo peso molecular dando un disulfuro mixto, sobreoxidarse a ácido sulfínico o decaer a una especie aún no identificada (HSA-SX)<sup>23</sup> (Figura 2). El ácido sulfénico a diferencia de otros que presentan vida media corta demuestra una gran estabilidad, presentando a pH 7.4 una constante de decaimiento espontáneo de  $(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a 25 °C y  $(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a 37 °C<sup>24</sup>. Los ácidos sulfénicos han sido poco estudiados principalmente por su inestabilidad pues reaccionan rápido con otros tioles para formar disulfuros. Por esto la HSA constituye un buen modelo para el estudio de sus propiedades<sup>24</sup>.



**Figura 2. Oxidación del tiol de la HSA.** La oxidación por dos electrones del tiol de la HSA (HSA-SH) da lugar a un ácido sulfénico relativamente estable (HSA-SOH) (camino a). HSA-SOH puede reaccionar con un tiol de bajo peso molecular dando lugar a la formación de un disulfuro HSA-SSR (camino b) que puede reaccionar con un segundo tiol de bajo peso molecular regenerando HSA-SH (camino c). HSA-SOH también puede ser posteriormente oxidado (camino d) dando lugar a un ácido sulfínico (HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Por último, éste puede decaer espontáneamente (camino e) a una especie no identificada, probablemente una sulfenamida.

El estado de oxidación del tiol libre de la HSA es heterogéneo tanto en plasma como en muestras comerciales. Aproximadamente un 70 % de la HSA circulante posee su tiol en forma reducida (HSA-SH) constituyendo la fracción denominada mercaptalbúmina. Esta fracción a una concentración de ~0.45 mM, constituye el 80% de los tioles presentes en plasma. El 30% restante, denominada no-mercaptalbúmina, está compuesta por disulfuros mixtos formados entre el tiol de la HSA y tioles de bajo peso molecular como la cisteína (HSA-SSR) (160 μM, 24 % del total de HSA), cisteinilglicina (16 μM, 2.5 %), homocisteína (8.8 μM, 1.4 %) y glutatión (1.3 μM, 0.2 %). Una fracción de alrededor de 1-3% circula con el tiol oxidado a niveles de oxidación superior, mayoritariamente al estado de ácido sulfínico (HSA-SO<sub>2</sub>H) o ácido sulfónico (HSA-SO<sub>3</sub>H) que no pueden ser reducidos por agentes tales como ditioneol (DTT) o mercaptoetanol<sup>25</sup>.

En el plasma existe una escasa representación de los sistemas enzimáticos antioxidantes, es por esto que las proteínas plasmáticas representan un importante blanco de las especies reactivas. Dentro de éstas, la HSA, con su tiol libre representando la mayoría de los tioles plasmáticos ha sido propuesta como una proteína con un importante rol antioxidante<sup>26</sup>.

## 1.6. Albúmina y cromatografía

Tras el desarrollo del método de Cohn para la purificación de la HSA es común el uso de la misma en tratamientos de pacientes, sin embargo, hay varias cuestiones que siguen inconclusas. En primera instancia no están claras las ventajas de la suplementación con HSA en lugar de otros fluidos similares que no conlleven los mismos riesgos biológicos. Por otro lado, tampoco se ha relacionado la heterogeneidad del estado de oxidación con lo que podría significar una ventaja por su rol antioxidante<sup>13</sup>.

La heterogeneidad en cuanto al estado de oxidación del tiol libre de la HSA si se ha estudiado *in vitro* y en el plasma de ancianos por espectrometría de masa<sup>27,28,29</sup> y por análisis cromatográficos. Sogami y colaboradores fueron los primeros en analizar por HPLC las diferentes isoformas oxidadas de la HSA<sup>30</sup>. Utilizando una columna de intercambio aniónico fueron capaces de separar las fracciones que denominaron mercaptalbúmina humana (HMA) que contenía principalmente HSA-SH y no-mercaptalbúmina humana (HNA) que contenía principalmente HSA-SSR y HSA oxidada. Más adelante Era y colaboradores evaluaron diferentes condiciones variando las columnas y amortiguadores utilizados y encontraron una combinación adecuada que les permitió separar además la fracción de HNA en una con disulfuros mixtos y en otra sobreoxidada a ácidos sulfínico y sulfónico. Además en ese mismo trabajo se analizaron las alteraciones de la HSA en pacientes ancianos<sup>29</sup>. Esta técnica fue ampliamente utilizada para posteriores estudios sobre la heterogeneidad de la HSA, a pesar de la falta de confirmación de la composición de los picos por una técnica como espectrometría de masa.

Recientemente el Dr. Botti en conjunto con la Dra. Turell diseñaron otra técnica cromatográfica que permite separar las diferentes isoformas de la HSA en función de las diferencias en sus puntos isoeléctricos y propiedades químicas<sup>31</sup>. Este nuevo procedimiento cromatográfico consiste en un cromatoenfoco con gradiente de pH externo (EPGC) (los principios han sido descritos en esta introducción). Hace uso de una columna intercambiadora aniónica débil de alta resolución (TSK DEAE 5PW glass 7.5 cm x 8 mm I.D., 10  $\mu$ m) de Tosoh Biosciencias LLC que puede ser utilizada de forma analítica y semi-preparativa. Se utilizan dos amortiguadores de igual composición (acetato de amonio 10 mM) de fuerza iónica media que difieren únicamente en su valor de pH. Se definió un valor de pH para el amortiguador de unión de 5.35 y para la elución se utiliza un gradiente de 0 a 40% (en 60 minutos) de un amortiguador B de pH = 3.95.

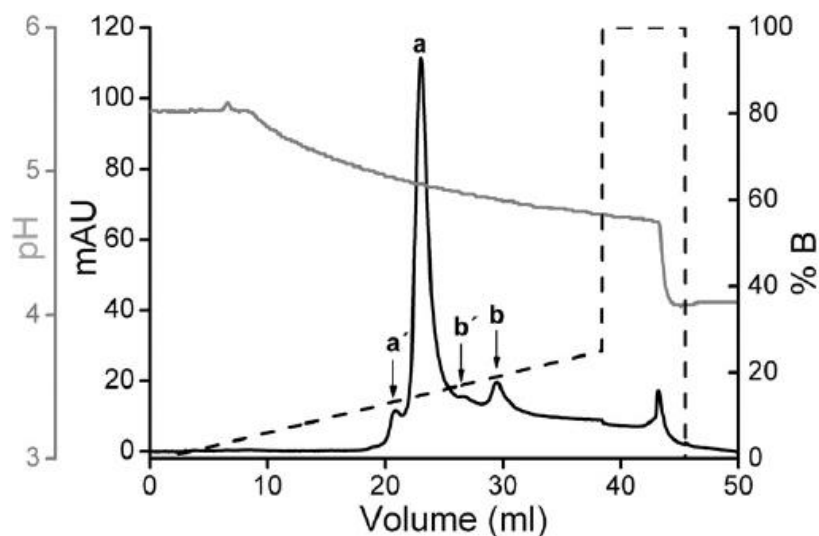
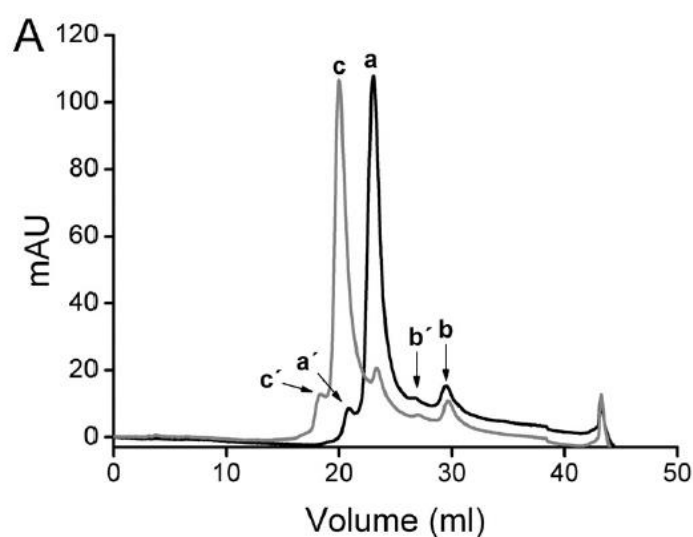


Figura 3. Análisis de HSA comercial delipidada y reducida mediante la técnica de cromatoenfoco con gradiente externo de pH. Tomada de<sup>31</sup>.

La figura 3 muestra el análisis de HSA comercial delipidada y reducida mediante cromatoenfoco realizado por Turell, Botti y col.<sup>31</sup>. En este trabajo los picos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masa confirmando la composición de los mismos. El pico *a* corresponde a HSA-SH mientras que *a'* corresponde a HSA<sub>3-585</sub>-SH que resulta de la proteólisis del segmento terminal Asp1-Ala2 provocando una pérdida neta de una carga negativa que explica el menor tiempo de retención. Por otro lado el pico *b* contiene de forma mayoritaria la especie HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> mientras que el pico *b'* corresponde a la especie HSA<sub>3-585</sub>-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Apreciamos que este procedimiento cromatográfico permite separar aquellas modificaciones de la HSA que provoquen un cambio en la carga neta superficial de la proteína. Por este motivo es de suma importancia la confirmación de los picos por espectrometría de masa. En este artículo los investigadores calcularon un punto isoeléctrico aparente de  $4.88 \pm 0.06$  para HSA-SH pero hay que tener en cuenta que en una técnica de EPGC el pH de la fase estacionaria en general difiere de aquel de la fase móvil debido a las cargas presentes en la primera por lo que se espera que el pH de elución del analito sea menor que el verdadero punto isoeléctrico de la proteína cuando se utiliza un intercambiador aniónico.

El tiol de la HSA puede ser selectivamente oxidado por dos electrones si se incuba con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dando lugar a la formación de HSA-SOH, HSA-SX y HSA-SSR (en presencia de otros tioles). Como estas tres especies no presentan diferencias en su carga neta superficial se desarrolló un protocolo alternativo para la preparación de ese tipo de muestras. Este involucra una incubación previa de la muestra con cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). Los iones Hg (II) reaccionan únicamente con HSA-S<sup>-</sup> dando lugar a la formación de HSA con su tiol bloqueado (HSA-SHg<sup>+</sup>) que presenta una carga positiva extra y resulta en un menor tiempo de retención en la cromatografía.



**Figura 4.** Análisis de HSA comercial delipidada y reducida incubada (trazo gris) o no (trazo negro) con un exceso de 1.2 de HgCl<sub>2</sub> mediante la técnica de cromatoenfoco con gradiente externo de pH. Tomada de <sup>31</sup>.

En la figura 4 se aprecia que con este protocolo es posible discriminar la especie HSA-SH que coeluye junto a las especies HSA-SOH y HSA-SX de estar presentes en la muestra. En estas condiciones el pico *a* corresponde a HSA-SH, el *b* a HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, el *c* a HSA-SHg<sup>+</sup>, el *a'* a HSA<sub>3-585</sub>-SH, el *b'* a HSA<sub>3-585</sub>-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> y el *c'* a HSA<sub>3-585</sub>-SHg<sup>+</sup> <sup>31</sup>.

Esta técnica resulta potencialmente útil para aquellos que necesiten cuantificar o purificar diferentes isoformas de la HSA, tanto en muestras de plasma como en muestras de HSA comercial. El empleo de una columna semi-preparativa permite purificar una cantidad considerable de proteína. Las variaciones en el procedimiento de preparación de la muestra permiten discriminar diferentes isoformas de HSA dependiendo de los requisitos del usuario.

En este trabajo se puso a punto esta técnica cromatográfica y sus diferentes variantes en un equipo HPLC Agilent Infinity 1260 con detector de fluorescencia. Se optimizó de acuerdo a las herramientas disponibles y las condiciones usuales de nuestro laboratorio permitiendo el análisis de diferentes muestras de HSA comercial y muestras de HSA provenientes de plasma fresco.

Una vez optimizada, la técnica se utilizó para purificar la isoforma HSA-SX para su posterior análisis por espectrometría de masa. Por otro lado, también se intentó determinar el  $pK_a$  del ácido sufénico de la HSA.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos generales

- Analizar las diferentes isoformas de la HSA en muestras de albúmina comercial y en muestras de plasma fresco.

### 2.2. Objetivos específicos

- Adaptar una técnica cromatográfica que permita el análisis de variantes de HSA oxidada a nivel del tiol libre al equipamiento presente en nuestro laboratorio.
- Utilizar la técnica para elucidar propiedades bioquímicas de la albúmina sérica humana y de su derivado ácido sulfénico, particularmente el decaimiento de este último.
- Verificar la utilidad de la técnica para el análisis de muestras de plasma fresco.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Soluciones de HSA

Para la puesta a punto del procedimiento cromatográfico se utilizaron varias muestras de HSA comercial, siendo las principales de las marcas Sigma y Grifolds. La HSA es derivada de un conjunto de plasma de sangre venosa y se obtiene por fraccionamiento mediante el método de Cohn con etanol frío<sup>4</sup>. Según el prospecto de Grifolds, cada ml de solución contiene 0.200 g de HSA, caprilato de sodio, N-acetilriptofanato de sodio, sodio 130-160 mmol/l y potasio 2 mmol/l. El producto es pasteurizado a 60°C por 10 horas. Las soluciones de HSA comercial se desalaron realizando una gel-filtración en una columna Sephadex G-25M (columna PD-10, GE-Healthcare) previamente equilibrada en un amortiguador fosfato de sodio (100 mM, pH = 7.4, dtpa 0.1 mM) o agua y se almacenaron a - 80°C. Las soluciones de plasma fresco fueron concedidas por el servicio nacional de sangre (SNS).

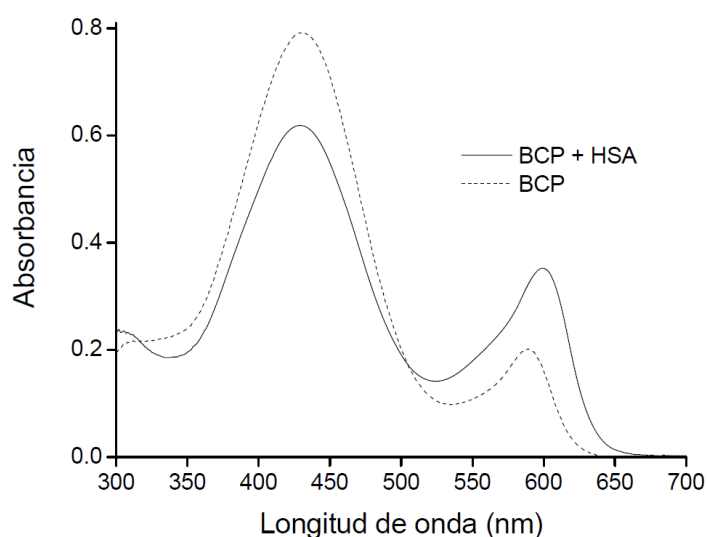
#### 3.2. Cuantificación de albúmina

##### 3.2.1. Medidas espectrofotométricas

En soluciones puras de HSA la cuantificación se realizó por medidas de absorbancia a 279 nm utilizando su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 0.531 \text{ (g/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )<sup>13</sup>.

##### 3.2.2. Método del púrpura de bromocresol

En soluciones más complejas como plasma, la cuantificación de HSA se realizó por el método del púrpura de bromocresol. Este método utiliza el colorante bromocresol púrpura (BCP) que cambia de color amarillo a púrpura en el intervalo de pH 5.2-6.8 permitiendo el uso del mismo a un pH aproximado de 5. La adición de HSA a la solución de BCP provoca un aumento en la absorbancia a 590 nm con un corrimiento del pico de 590 a 603 nm. (Figura 5)

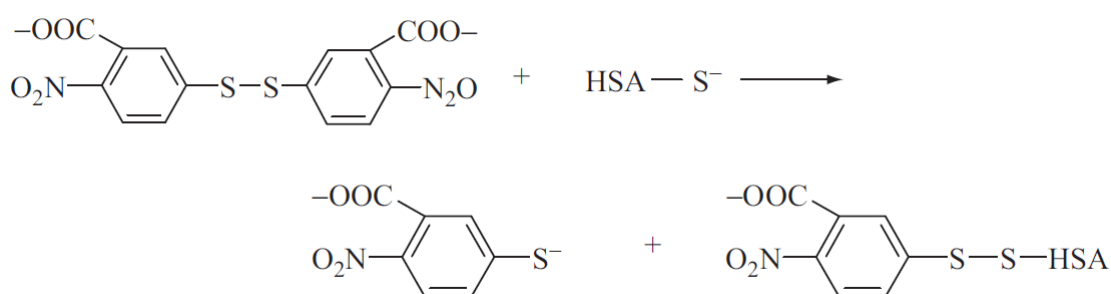


**Figura 5. Espectro UV-vis de púrpura de bromocresol (BCP, 40  $\mu\text{M}$  en amortiguador acético, 0.1 M, pH 5.2) en ausencia (línea punteada) y presencia (línea continua) de HSA (0.066  $\text{g/L}^{-1}$ , 1  $\mu\text{M}$ ) Tomado de<sup>32</sup>.**

La solución de BCP 40  $\mu\text{M}$  se preparó disolviendo 0.0043 g de BCP en amortiguador acetato (pH = 5.2, 0.1 M) en un volumen final de 200 mL. La curva de calibración se realizó con un estándar de HSA delipidada con concentraciones finales entre 0-3  $\mu\text{M}$ . Se incubaron los volúmenes correspondientes de HSA con 1 mL de BCP 40  $\mu\text{M}$  durante 5 minutos a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 603 nm.

### 3.3. Cuantificación de tioles

La cuantificación de tioles se realizó por el método de Ellman<sup>33</sup>, un método colorimétrico basado en la reacción de tioles con el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) dando lugar a la formación de TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico). Figura 6<sup>32</sup>.



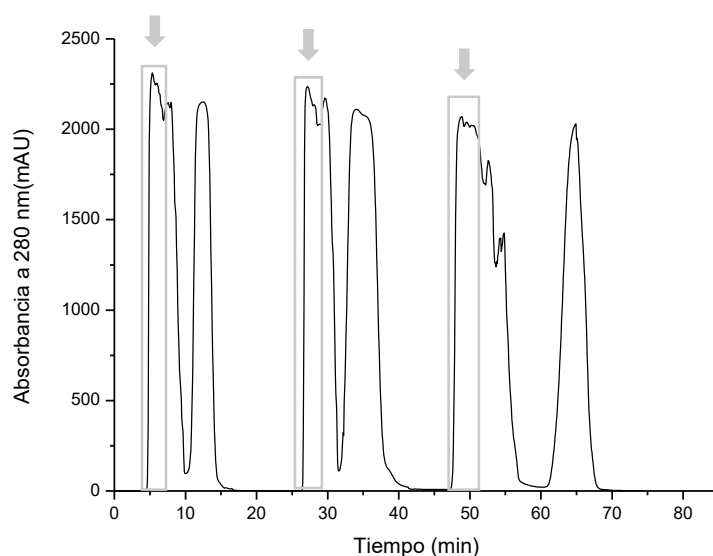
**Figura 6. Reacción de TNB con el tiol libre de la HSA en su estado desprotonado (HSA-S<sup>-</sup>)**

El TNB formado presenta un coeficiente de absorción a 412 nm de 14150  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  el cual es utilizado para su cuantificación por medio de medidas de absorbancia. En el caso de la reacción con el tiol libre de la cisteína 34 de la HSA el tiempo medio de reacción en un amortiguador pirofosfato (pH = 9, 0.1 M) es de 0.85 minutos (temperatura ambiente, 0.2 mM DTNB ~ 20  $\mu\text{M}$  HSA-SH)<sup>32</sup>. Es necesario incluir un control sin tioles para restar la sobreestimación producto de la dismutación alcalina del DTNB.

### 3.4. Reducción del tiol libre de la albúmina

La HSA comercial presenta un patrón heterogéneo en cuanto al estado de oxidación del tiol de la cisteína 34. Es por esto que para llevar a cabo ensayos específicos que requieren la disponibilidad del tiol en su forma reducida es necesario un paso previo de reducción. En este caso, la elección del agente reductor supone un compromiso entre la capacidad de reducir de forma eficiente al tiol libre y la inhabilidad de reducir los puentes disulfuros. En nuestro grupo de estudio y con las muestras de HSA que se utilizan regularmente un método apropiado para la reducción del tiol involucra una incubación de 1 mL de la solución de HSA con 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación la solución se gel-filtra en una columna Sephadex G-25M (columna PD-10, GE-Healthcare) previamente equilibrada en un amortiguador fosfato de sodio (100 mM, pH = 7.4, dtpa 0.1 mM). De esta manera se remueve el exceso de agente reductor. Este procedimiento resulta en relaciones ~ 0.7 de HSA-SH/HSA.

Para realizar este procedimiento a una mayor escala se incubaron 15 ml de HSA Grifolds 20% con  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se utilizó una columna Hi Prep 26/10 Desalting de GE Healthcare en un sistema de FPLC Akta Prime Plus con el fin de remover el exceso de reductor. Se realizaron 3 inyecciones de 5 ml y se eluyó con agua colectando en fracciones de 1 ml. Por último, se juntaron las fracciones marcadas que corresponden a HSA sin reductor, dejando eluir las siguientes que coeluyen con el reductor. Figura 7.



**Figura 7. Cromatograma del desalado de HSA Grifolds 20%.** Se realizaron tres inyecciones de 5 mL de HSA Grifolds 20% reducida con  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM en una columna Hi Prep 26/10 de GE Healthcare. La elución se realizó con agua y se recolectaron fracciones de 0.5 mL.

### 3.5. Bloqueo de tioles con $Hg^{2+}$

El bloqueo del tiol libre de la HSA se realizó incubando la solución de HSA con un exceso de 1.2 de una solución de cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) por un tiempo aproximado de 5 minutos a temperatura ambiente.

### 3.6. Oxidación con peróxido de hidrógeno

Para oxidar el tiol a ácido sulfénico se incubó HSA (0.5 mM) con peróxido de hidrógeno 4 mM por 4 minutos a 37°C en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, dtpa 0.1 mM)<sup>23</sup>. La solución de peróxido de hidrógeno se preparó a partir de una solución stock comercial diluyéndola en agua ultrapura y se cuantificó inmediatamente antes de ser utilizada por medio de medidas de absorción a 240 nm ( $\epsilon = 43.6 M^{-1} cm^{-1}$ ).

La reacción puede ser detenida con la adición de catalasa suficiente para que se consuma el 90 % del peróxido de hidrógeno en  $\sim 3s$ . Si se desea sobreoxidar HSA se puede aumentar el tiempo de incubación o la concentración de peróxido de hidrógeno. Esto se realizó en la aproximación a punto final del  $pK_a$  del ácido sulfénico descrito la sección 4.7.1.



### 3.7. Preparación de soluciones de catalasa

La cinética de la catalasa es diferente a la de enzimas típicas. Su  $K_M$  es infinitamente grande y la descomposición de peróxido de hidrógeno siempre sigue una reacción de primer orden. Es posible medir la actividad de catalasa por la disminución en la absorbancia a 240 nm con 10 mM de peróxido de hidrógeno durante un período corto de tiempo (1-2 min) y obtener la constante inicial de reacción  $v_0$ . Es recomendable utilizar la constante de pseudo-primer-orden  $k'$  como una medida de concentración de catalasa según:  $v_0 = k' [H_2O_2] = k [catalasa][H_2O_2]$ .<sup>32</sup>

La solución de catalasa se preparó a partir de un stock de catalasa Sigma. Se preparó 1 mL de solución de catalasa 5 mg/mL en agua milli-Q. El ensayo de actividad se realizó a dos pHs diferentes para evaluar la dependencia con esta variable y establecer la constante de pseudo-primer-orden  $k'$ . Para esto se siguió la disminución en la absorbancia como antes mencionado de una dilución 1/40000 del stock de catalasa en amortiguador HAC/Mes/Tris 0,05/0,05/0,10 M pH = 5 y pH = 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM.

**Tabla 2. Ensayo de actividad solución de catalasa**

Tubo	pH	Abs <sub>inicial</sub>	$\Delta Abs/\Delta t$ (min <sup>-1</sup> )
1	7.4	0.4214	-0.0242
2	7.4	0.4269	-0.0244
3	7.4	0.4318	-0.0231
4	5	0.4192	-0.0054
5	5	0.4158	-0.0057
6	5	0.4130	-0.0056

Con estos datos se calculó la constante de pseudo-primer-orden para cada pH según:

$$v_0 = k[catalasa] [H_2O_2] \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\frac{-dAbs/dt}{\epsilon} * FD = k_{stock} \frac{Abs_0}{\epsilon} \Rightarrow \frac{-dAbs/dt}{Abs_0} * FD = k_{stock} \quad \text{Ecuación 11}$$

La  $k_{stock}$  para la solución de catalasa (5 mg/ml) en amortiguador pH = 7,4, se calculó a partir de los tubos 1 y 2 según:

$$\frac{k_1 + k_2}{2} * FD = 0.0572 \times 40000 = 2290 \text{ min}^{-1}$$

La  $k_{stock}$  para solución de catalasa 5 mg/ml en amortiguador pH= 5, se calculó según:

$$\frac{k_4 + k_5 + k_6}{3} * FD = 0.0133 \times 40000 = 533 \text{ min}^{-1}$$

Una vez que tenemos el valor de la constante de pseudo-primer-orden se puede realizar el cálculo de cuanta catalasa debemos utilizar para descomponer cierta cantidad de peróxido de hidrógeno en un tiempo determinado. Para realizar este cálculo utilizamos la siguiente ecuación:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_0 e^{-k't} \quad \text{Ecuación 12}$$

Un ejemplo de este cálculo se encuentra en la sección 4.7.2.

### 3.8. Procedimiento cromatográfico

#### 3.8.1. Equipamiento

Para llevar a cabo el procedimiento cromatográfico se hizo uso de un HPLC Agilent Infinity 1260 con bomba cuaternaria y detector de fluorescencia. La columna elegida fue una columna intercambiadora aniónica débil de alta resolución (TSK DEAE 5PW glass 7.5 cm x 8 mm I.D., 10 µm) de Tosoh Biosciences LLC.

#### 3.8.2. Soluciones y amortiguadores

Se utilizaron dos amortiguadores de igual composición (acetato de amonio 10 mM) que difieren únicamente en su pH. El amortiguador A se ajusta con ácido acético glacial a un pH de 5.95, el cual se encuentra por arriba del punto isoeléctrico de la proteína y es el amortiguador que se utiliza para la inyección de la muestra. El amortiguador B se ajusta con ácido acético glacial a un pH de 3.95, el cual se encuentra por debajo del punto isoeléctrico de la HSA y es el utilizado para la elución de la muestra. El pH de las soluciones amortiguadoras fue ajustado a temperatura ambiente con un electrodo de vidrio con referencia de calomel utilizando soluciones estándar Sigma de pH 4, 7 y 10. Además de las soluciones descritas es necesario preparar una solución de isopropanol 10% para efectuar el lavado de la bomba e inyector y etanol 20% para guardar la columna por largos períodos de tiempo. Todos los solventes utilizados son aptos para HPLC y fueron diluidos en agua milli-Q (conductividad = 0.18 µS). Las soluciones fueron filtradas por un sistema de vacío utilizando filtros Durapore de PVDF o Nylon (tamaño del poro = 0.45 µm) y desgaseadas en un sistema de vacío cerrado con agitador magnético por 10 minutos.

#### 3.8.3. Muestras

Las muestras de HSA comercial se diluyeron en amortiguador A y fueron filtradas previo a su inyección utilizando jeringas descartables y unidades de filtros Millex Durapore PVDF (tamaño del poro 0.22 µm) comercializados por Sigma-Aldrich. En general se inyectaron 300 µg de HSA (20 µL de HSA 225 µM) excepto que se especifique de otra forma. Las muestras de plasma fresco se diluyeron en amortiguador A (FD = 1/10) y se filtraron igual que las muestras de HSA comercial. En general se inyectaron 300 µg de HSA (220 µL de dilución de plasma HSA 20 µM).

### 3.8.4. Método

La cromatografía se adaptó para ser llevada a cabo en un equipo Agilent Infinity 1260 con bomba cuaternaria y detector de fluorescencia. Para esto se diseñó un programa en el software Chemstation B.04.03 que define el gradiente de pH descrito para la elución de la muestra, el cual consistió en un gradiente de 0 a 40 % de amortiguador B en 60 minutos. La tabla 3 representa los comandos introducidos para la función cambio de solvente.

**Tabla 3 Método definido en Chemstation B.04.03 para el análisis de muestras de HSA comercial.**

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>Parámetro</i>
0.00	A:100% B:0%
1.00	A:100% B:0%
61.00	A:60% B:40%
62.00	A:0% B:100%
77.00	A:0% B:100%
78.00	A:100% B:0%
98.00	A:100% B:0%

El equipo interpreta que el cambio introducido en el método debe ser llevado a cabo linealmente en la diferencia de tiempo que separa cada comando. El flujo se establece inicialmente en un valor de 1 ml/min y se mantiene incambiado durante el curso de la cromatografía.

La detección se realizó mediante el detector de fluorescencia fijando un  $\lambda_{exc} = 280$  nm,  $\lambda_{em} = 340$  nm y un PMTG (Photomultiplier gain) = 9, en donde la fluorescencia detectada corresponde a los triptófanos presentes en la proteína. La determinación de PMTG fue empírica, utilizando el método y las muestras descritas, buscando un valor adecuado que no sature la señal y que a su vez no sea muy pequeño aprovechando la escala establecida.

Para el análisis de muestras de plasma se modificó el método aumentando la cantidad de amortiguador A post-inyección y previo al inicio del gradiente de amortiguador B como se aprecia en la tabla 4. Este paso involucra un lavado equivalente a 4 volúmenes muertos de la columna con el amortiguador A que busca desalojar el resto de los componentes del plasma que no se unen a la matriz.

**Tabla 4 Método definido en Chemstation B.04.03 para el análisis de muestras de plasma humano.**

<i>Tiempo (min.)</i>	<i>Parámetro</i>
0.00	A:100% B:0%
10.00	A:100% B:0%
71.00	A:60% B:40%
72.00	A:0% B:100%
87.00	A:0% B:100%
88.00	A:100% B:0%
108.00	A:100% B:0%

### 3.8.5. Limpieza de la columna

En el transcurso de este trabajo la columna se sometió más de una vez a un protocolo de limpieza. Este consistió en realizar un lavado de la columna con 4 volúmenes de NaOH. La soda se inyectó en un loop de 5 mL para evitar su pasaje por el sistema de bombas. A continuación se lavó la columna con agua milli-Q a un flujo de 1 ml/min por una hora y media con el fin de protonar nuevamente la matriz. Por último la columna se guardó en etanol 20%<sup>34</sup>.

En una ocasión, un fallo en el sistema del loop provocó la entrada de aire a la columna. Esto fue solucionado lavando la columna durante la noche con etanol 30% a un flujo de 0.2 ml/min.

### 3.8.6. Purificaciones semipreparativas de HSA-SH

Para la purificación semipreparativa de HSA-SH se realizaron tres corridas con inyecciones de 300 y 200  $\mu\text{L}$  de HSA reducida 0.78 mM con el protocolo anteriormente descrito. Se realizó una recolección de fracciones en alícuotas de 0.5 mL y se juntaron las fracciones de interés. Por último, éstas fueron concentradas por ultrafiltración en un Corning Spin-x UF 6 5K MWCO por medio de dos ciclos de centrifugación de 12 minutos a 6000 g en una centrifuga Sigma 3-16KL.

## 3.9. Aproximación a la determinación del $pK_a$ del ácido sulfénico

Para los experimentos se prepararon las siguientes soluciones:

- HSA reducida 0.6 mM en amortiguador fosfato 0.09 M
- Solución stock de peróxido de hidrógeno 0.138 M
- Amortiguador HAc/Mes/Tris 0.15/0.15/0.30 M pH = 5–9
- Solución stock de catalasa,  $k' = 8.88 \text{ s}^{-1}$  (a pH = 5)

Todas las diluciones se realizaron con agua milli-Q y se ajustó el pH en un electrodo de vidrio con referencia calomel utilizando soluciones estándar Sigma de pH 4.0, 7.0 y 10.0.

### 3.9.1. Aproximación de punto final

Para la aproximación de punto final se preformó HSA-SOH en un amortiguador fosfato (0.1 M, pH = 7.4) (incubación de HSA-SH con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4 mM, 4 min, 37°C) y se incubó a diferentes pHs durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno (4 mM, 30 min, 25°C) en amortiguadores compuestos HAc/Mes/Tris 0.15/0.15/0.30 M que poseen capacidad amortiguadora en un amplio rango de pH (5-9). Se eligieron estas condiciones de pre-formación de sulfénico en las cuales el rendimiento es máximo según estudios previos y se consideró un tiempo total de decaimiento de 30 minutos a partir de las constantes cinéticas a pH 7.4,  $(0.2 \pm 0.1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la sobreoxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para el decaimiento a SX<sup>14</sup>.

### 3.9.2. Aproximación de velocidades iniciales

Para la aproximación de velocidades iniciales se incubaron 98  $\mu\text{L}$  de HSA 0.6 mM con 2.9  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.138 M en amortiguador fosfato 0.1 M pH = 7.4 por 8 minutos a temperatura ambiente con el fin de preformar ácido sulfénico. Pasados los 8 minutos se incubó la solución de HSA con 167  $\mu\text{L}$  de amortiguador HAc/Mes/Tris 0.15/0.15/0.30 M (pH variable) y 30 mM finales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por el tiempo de incubación seleccionado.

Cumplido este tiempo de incubación se agregaron 13.8  $\mu\text{L}$  de catalasa (stock  $k' = 8.88 \text{ s}^{-1}$  a pH 5) para frenar la reacción. Luego de preparadas, las muestras fueron guardadas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento previo a su análisis.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Puesta a punto y optimización del método

La puesta a punto del método en el equipo Agilent 1260 Infinity que disponemos en nuestro laboratorio consistió en pruebas sistemáticas modificando ciertas variables con el fin de determinar el rol de cada una en la resolución cromatográfica. Entre éstas las más influyentes fueron aspectos técnicos relacionados a la geometría del equipo, el estado de la matriz de la columna y la calidad y concentración de las muestras.

En una primera instancia fue necesario medir la presión que ejercía el equipo sobre la columna al tener conectados los diferentes detectores. Esto llevó a la elección del detector de fluorescencia para la detección debido a que al conectar el detector de absorbancia la presión que se ejercía sobre la columna sobrepasaba el límite sugerido por el fabricante.

#### 4.1.1. Regeneración de la columna y primeras pruebas

Al comienzo de este trabajo se realizaron las primeras pruebas en una columna adquirida en el año 2011 (de ahora en más c11). Esta columna fue utilizada por la Dra. Turell y el Dr. Botti en los ensayos publicados en <sup>31</sup> y se sospechaba de la integridad de su matriz luego de posteriores experimentos con muestras de plasma. Esta columna se sometió al protocolo de limpieza completo sugerido por el fabricante que consistió en lavados consecutivos de la columna con soluciones de NaOH 0.2 M (15 mL), ácido acético 40% en H<sub>2</sub>O milli-Q (15 mL) y acetonitrilo 30% en H<sub>2</sub>O milli-Q (70 mL). Por último la matriz se lavó con agua suficiente y se equilibró con amortiguador A.

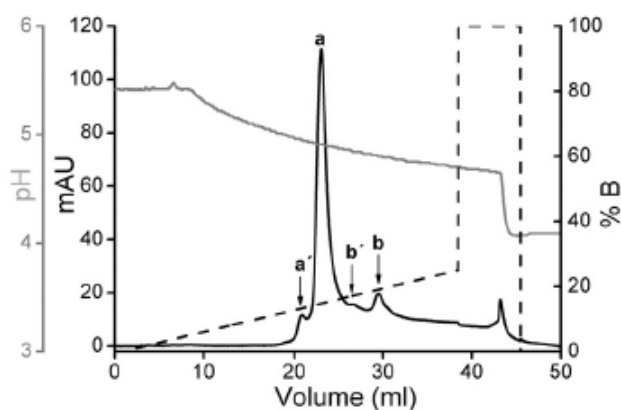
Para evaluar la resolución de la columna se corrieron muestras de HSA comercial de Sigma-Aldrich reducidas según el protocolo descrito. A su vez una muestra se oxidó con peróxido de hidrógeno y otra se bloqueó con Hg<sup>2+</sup> según los procedimientos ya descritos en materiales y métodos.

El panel A de la figura 8 muestra resultados publicados por Turell y Botti <sup>31</sup>. En esta publicación los picos obtenidos fueron analizados por espectrometría de masa confirmando la composición de los mismos. El pico *a* corresponde a HSA-SH mientras que *a'* corresponde a HSA<sub>3-585</sub>-SH que resulta de la proteólisis del segmento terminal Asp1-Ala2 provocando una pérdida neta de una carga negativa que explica el menor tiempo de retención. Por otro lado el pico *b* contiene de forma mayoritaria la especie HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> mientras que el pico *b'* corresponde a la especie HSA<sub>3-585</sub>-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

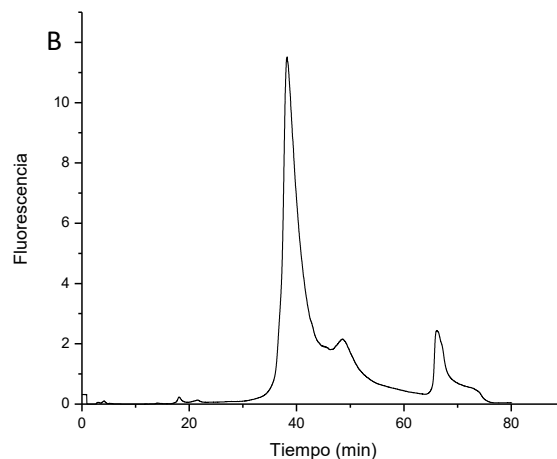
Comparando la resolución que se obtuvo en las primeras pruebas con la figura del artículo mencionado, es posible apreciar que si bien es posible separar las isoformas reducidas y oxidadas de la HSA no se resuelven los picos correspondientes a las especies truncadas (*a'* y *b'*) y la distancia entre los picos es menor en nuestro caso.

Para mejorar la resolución en este punto se probaron inicialmente variaciones en el gradiente y también diferentes muestras de HSA obteniendo resultados variables que impedían determinar cómo estos parámetros afectaban la resolución obtenida (datos no mostrados).

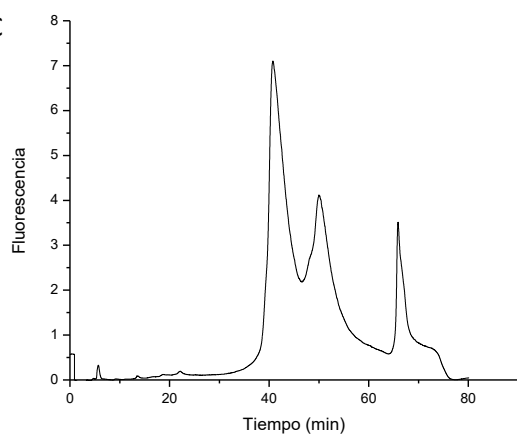
A



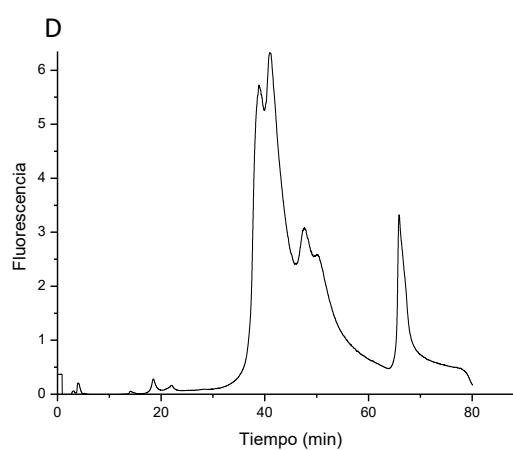
B



C



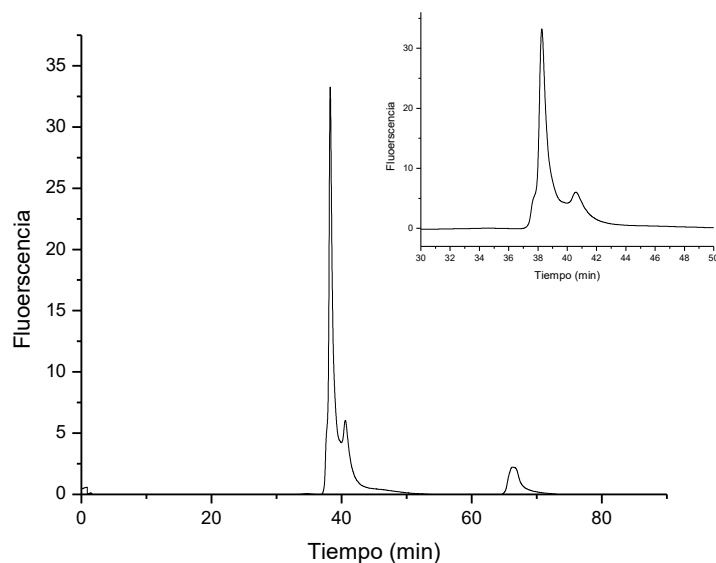
D



**Figura 8. Comparación de primeras pruebas en c11 con los cromatogramas publicados en <sup>31</sup>.** Figura tomada de <sup>31</sup> (panel A). 50  $\mu$ g de HSA comercial Sigma reducida con  $\beta$ -mercaptoetanol (panel B), oxidada con  $H_2O_2$  15 mM (11 min, T. amb.) (panel C) y bloqueada con  $HgCl_2$  (1 a 1) (panel D). Los tres cromatogramas se obtuvieron utilizando el método descrito en la tabla 3 en la c11 con la única variación que el gradiente comienza a los 5 minutos.

Ante la sospecha de la integridad de la matriz de la columna que disponíamos se compró una columna nueva (c14). También dispusimos gracias a la amabilidad del Dr. Botti alícuotas de HSA comercial “fresca” (Grifolds) para estandarizar los experimentos posteriores. (Figura 9).

Si bien se apreció una mejora utilizando la columna nueva y muestras de HSA frescas, ésta no alcanza aún los resultados publicados previamente<sup>31</sup>, indicando que la matriz de la columna y la edad de la preparación de HSA no eran los únicos factores afectando la capacidad resolutive.



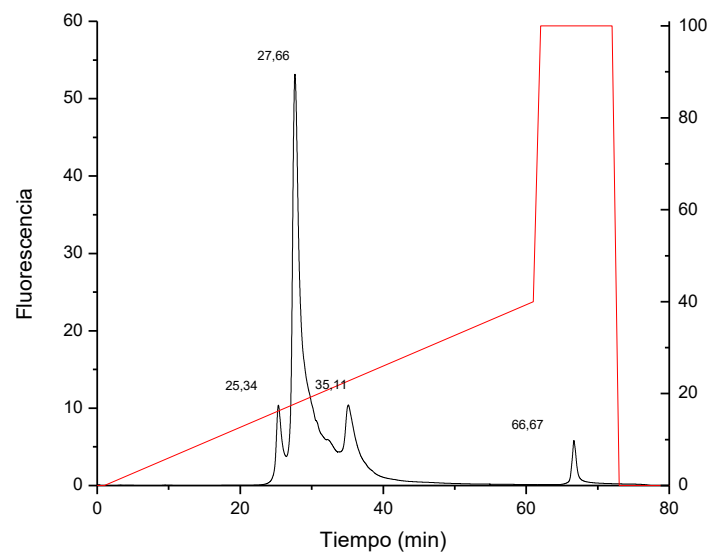
**Figura 9. HSA “fresca” en c14.** Se inyectó manualmente una alícuota de HSA comercial Grifolds “fresca” (50  $\mu\text{g}$ ) en la nueva columna (c14). El inserto permite apreciar la aparición de un hombro en el pico principal, posiblemente correspondiente a HSA<sub>3-585</sub>-SH

Luego se intentó mejorar la resolución realizando pequeños cambios en el método dirigidos por la idea que la pendiente de la concentración de amortiguador B puede comportarse de manera diferente en equipos con bombas distintas. También se evaluó el rol de la concentración de muestra en la capacidad resolutive de la cromatografía (explicado más adelante) y se definió además que es necesario pasar al menos 15 mL de amortiguador para equilibrar la columna (5 veces el volumen muerto). Sin embargo, estas pruebas no permitieron entender las diferencias en la capacidad resolutive.

Analizando detalladamente los resultados y revisando el camino recorrido, se identificó finalmente el factor determinante, resultando ser éste no un problema del método o las muestras, sino un problema emergente de las diferencias en la geometría de los equipos utilizados, FPLC Akta Purifier en el trabajo realizado por Turell, Botti y col. y HPLC Agilent 1260 Infinity en nuestro caso. Mientras que en el FPLC Akta Purifier la columna se conecta directamente a la entrada del detector de absorbancia, en el HPLC Agilent que disponemos en el laboratorio es necesario realizar la conexión al detector de fluorescencia por medio de una tubuladura. En la puesta a punto, con las limitaciones de presión que nos exigen el trabajar con una columna de camisa de vidrio, se optó por una tubuladura que presentaba un largo aproximado de 60 cm y un grosor de 0.030” (pulgadas).

Al cambiar el pequeño tubo conector por uno más corto (10 cm) y de menor grosor (0.010”) se observó una mejora dramática en el cromatograma (Figura 10). Esto puso en evidencia la existencia de un fenómeno de difusión en el conector que provocaba que los picos eluidos de la columna alcanzarán el detector con una separación menor. Esto, junto a la determinación de la cantidad adecuada de muestra a sembrar (300  $\mu\text{g}$ ), permitieron obtener una capacidad resolutive acorde a lo observado en la publicación del Dr. Botti.

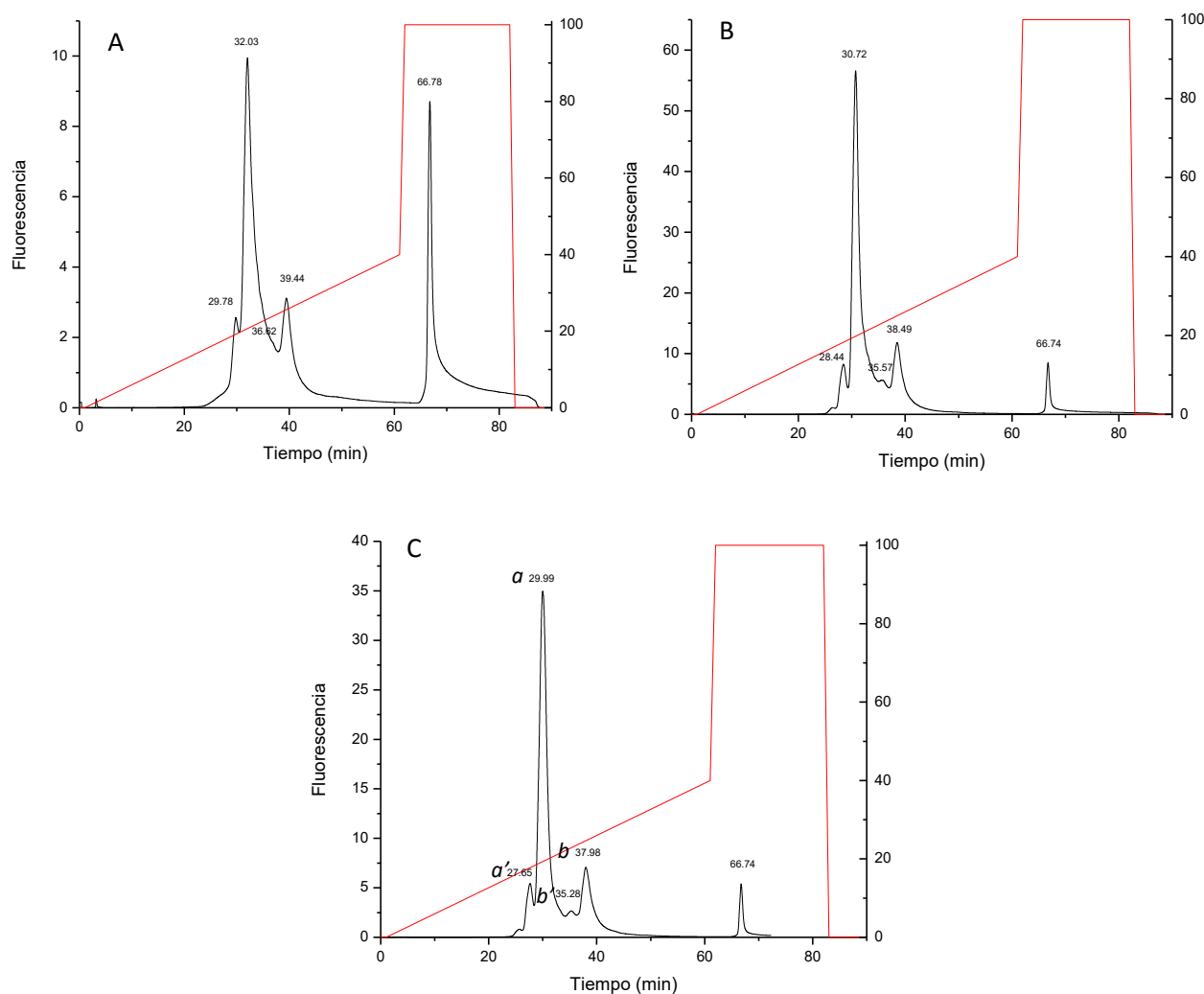




**Figura 10.** 300 µg de HSA Grifolds reducida en c14. La cromatografía se llevó a cabo según el método descrito en la tabla 3.

#### 4.1.2. Rol de la concentración de muestra en la resolución cromatográfica.

En el proceso de ajuste y optimización del procedimiento se realizaron múltiples ensayos variando diferentes parámetros. Una variable que dio indicios de jugar un rol importante en la capacidad de resolución del método fue la cantidad de muestra que se inyectaba en la columna. Por este motivo se realizaron en el mismo día (igual temperatura, mismos amortiguadores, misma muestra) tres corridas con cantidades crecientes de HSA con el fin de evaluar este efecto en la resolución de los picos. Se inyectaron 50, 300 y 890  $\mu\text{g}$  de HSA comercial Grifolds previamente reducida. El PMTG fue ajustado para cada corrida, siendo ésta la única variación entre las mismas (Figura 11).



**Figura 11. Rol de la concentración de muestra en la resolución cromatográfica.** Se inyectaron manualmente 50, 300 y 890  $\mu\text{g}$  de HSA comercial Grifolds reducida y se utilizó el método descrito en la tabla 3.

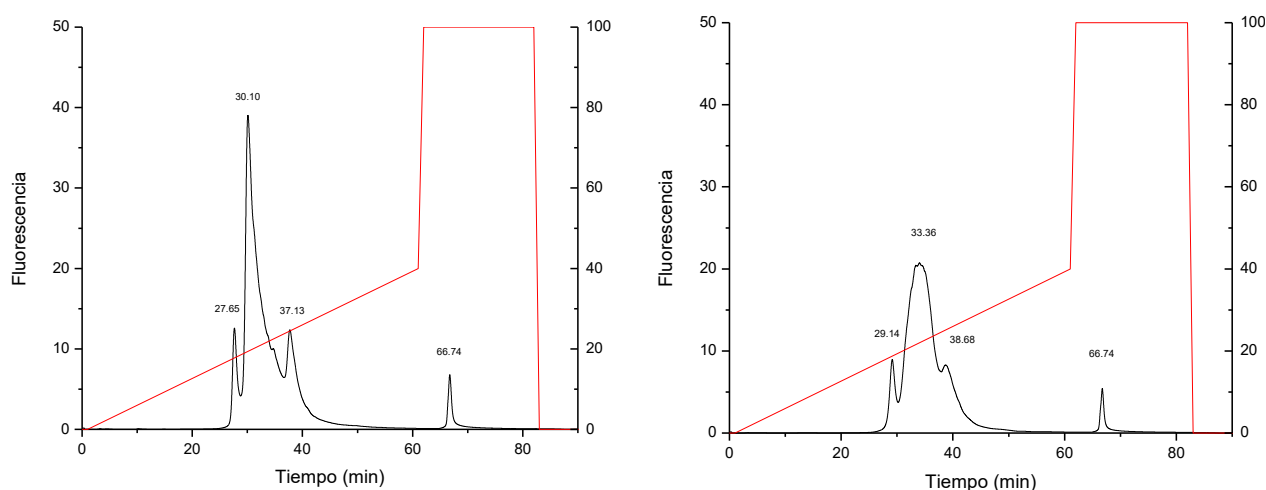
Como se puede apreciar en la figura 11 existe una clara dependencia entre la cantidad de muestra que se inyecta en la columna y la resolución cromatográfica.

Es difícil brindar una explicación a este fenómeno debido a la cantidad de interacciones electrostáticas posibles. Sugerimos que al aumentar la concentración de muestra se favorecen interacciones proteína-proteína que de alguna manera favorecen a su vez las interacciones

proteína-matriz provocando un aumento de la capacidad resolutive claramente reflejada en la definición de los picos y su separación. El cálculo de la resolución entre los picos *a* y *b* se realizó con la ecuación 9. Los valores de  $R_s$  fueron de 1.04 en el cromatograma de 50  $\mu\text{g}$ , 1.51 en el de 300  $\mu\text{g}$  y 1.64 en el de 890  $\mu\text{g}$  confirmando que al menos en este rango un incremento en la cantidad de muestra que se inyecta provoca un aumento en la resolución cromatográfica de los picos *a* y *b*. Es importante destacar que el valor de  $R_s$  calculado para el cromatograma de 50  $\mu\text{g}$  no es un valor confiable debido a la superposición que existe entre los picos.

#### 4.1.3. Rol de la temperatura en la resolución cromatográfica

La temperatura es una variable utilizada para mejorar la resolución en varios tipos de cromatografía (revisado en <sup>35,36</sup>). El efecto de la misma depende del tipo de cromatografía y el tipo de muestra, por ejemplo muestras ionizables resultan más afectadas por cambios en la temperatura. Con el fin de evaluar el rol de la temperatura en este procedimiento cromatográfico se realizaron dos corridas a diferentes temperaturas. Como el equipo no cuenta con una cámara termostaticadora se revistió de forma casera la columna con un tubo de plástico conectado a un baño por el que circulaba agua a una temperatura seleccionada. Se realizaron dos cromatografías, una sin el tubo de plástico y con la temperatura de la habitación en 20°C y otra mientras circulaba agua a 37°C con el fin de determinar el rol de la temperatura en la resolución cromatográfica (Figura 12).

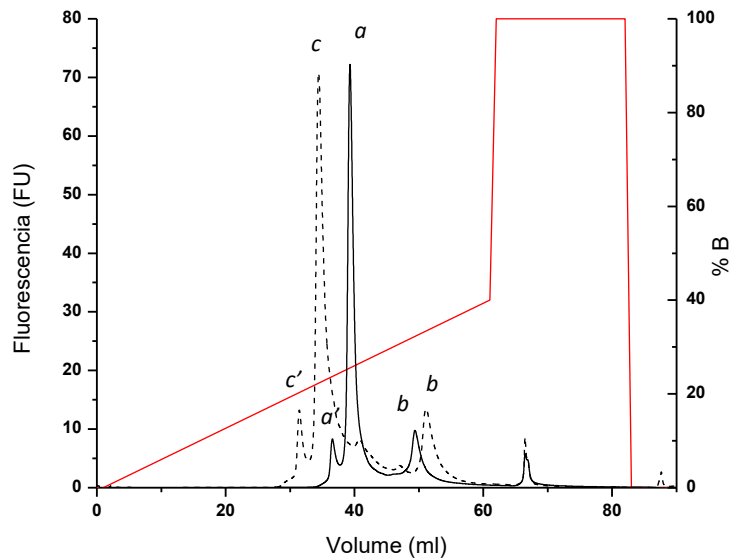


**Figura 12. Rol de la temperatura en la resolución cromatográfica.** Cromatografía a temperatura ambiente (izquierda) y cromatografía a 37°C (derecha).

En este ensayo se concluyó que la temperatura es un factor determinante en la resolución cromatográfica. El aumento de la temperatura significó en este caso una pérdida de resolución y por este motivo se determinó que todas las cromatografías deben realizarse ambientando de forma previa la habitación donde se ubica el HPLC a una temperatura de 20°C.

## 4.2. Bloqueo de tioles con $\text{Hg}^{2+}$

En este trabajo el bloqueo del grupo tiol libre de la HSA tiene dos propósitos. El primero surge de la necesidad de discriminar entre las especies HSA-SH Y HSA-SOH/HSA-SX en el procedimiento cromatográfico. Para cumplir con este requisito se utiliza cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). Este agente reacciona únicamente con el tiol libre de la HSA en su estado desprotonado (HSA-S) aumentando a su vez su carga neta total en una unidad. Este aumento de carga provoca un cambio en el punto isoeléctrico de la HSA que deriva en un tiempo de elución menor en el transcurso de la cromatografía. Esta diferencia permite separar efectivamente el pico  $a$  compuesto por las especies HSA-SH y HSA-SX.

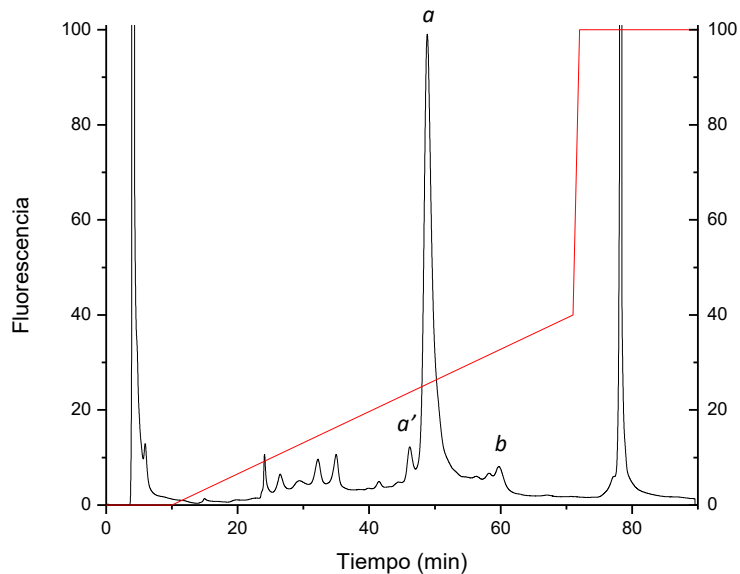


**Figura 13. HSA reducida con  $\beta$ -mercaptoetanol (10 mM) bloqueada con  $\text{Hg}^{2+}$  (trazo punteado) y sin bloquear (trazo completo).** El pico  $a$  corresponde a las isoformas HSA-SH y HSA-SX. El pico  $c$  corresponde a  $\text{HSA-SHg}^+$  y los picos  $a'$  y  $c'$  corresponden a  $\text{HSA}_{3-585}\text{-SHg}^+$ . La diferencia en el tiempo de elución del pico  $b$  se debe a que las corridas se realizaron en días diferentes con amortiguadores diferentes.

Por otro lado el bloqueo del tiol en su forma reducida es importante en el análisis de muestras de plasma fresco. Al bloquear el tiol reducido de forma inmediata luego de la extracción de las muestras se evita la posterior oxidación observada en muestras almacenadas por mucho tiempo. A su vez, en muestras de plasma que contienen tioles de bajo peso molecular una porción de la HSA se encuentra formando disulfuros y posee la misma carga neta que la HSA-SH por lo que como se mencionó anteriormente, el bloqueo del tiol nos brinda más información acerca de la composición del pico  $a$ .

### 4.3. Análisis de HSA en una muestra de plasma

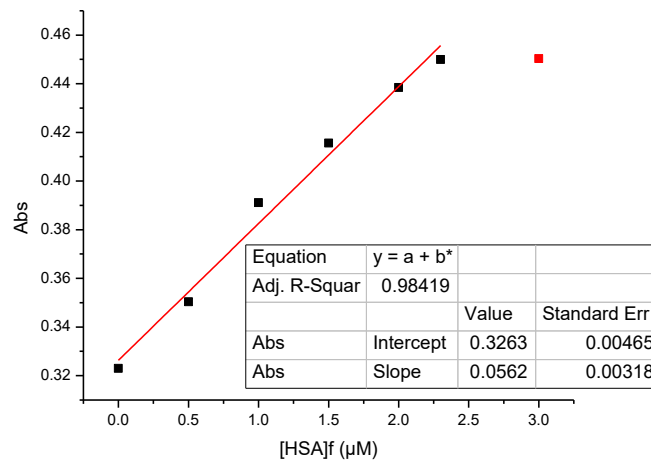
La HSA presente en la muestra de plasma se encuentra principalmente en su forma reducida (HSA-SH) y formando disulfuros mixtos (HSA-SSR). Utilizando el procedimiento cromatográfico descrito (figura 14) se encontró un pico principal (pico *a*,  $t_R = 48.83$ ) que se corresponde con el pico *a* de la figura 8 A. También se observó un pequeño pico *a'* ( $t_R = 46.16$ ) que corresponde a HSA<sub>3-585</sub>-SH y un pico *b* ( $t_R = 59.77$ ) consistente con el pico *b* de la figura 8 A. Comparando los tiempos de retención con los de la figura 11 se observa que la separación entre los picos es consistente. La resolución de los picos *a* y *b* se calculó utilizando la ecuación previamente descrita, siendo  $R_S = 2.66$ .



**Figura 14. Análisis de HSA en una muestra de plasma.** Se inyectaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de plasma diluida en buffer A ( $\text{FD} = 1/10$ ). Para este cromatograma se utilizó el método descrito en la tabla 4.

#### 4.4. Cuantificación de HSA en plasma

Se realizó la cuantificación de HSA en una muestra de plasma fresco, cedido por el servicio nacional de sangre, mediante el método de BCP. En primer lugar se realizó una curva de calibración utilizando HSA comercial delipidada en concentraciones finales de 0-3  $\mu\text{M}$ . (Figura 15).

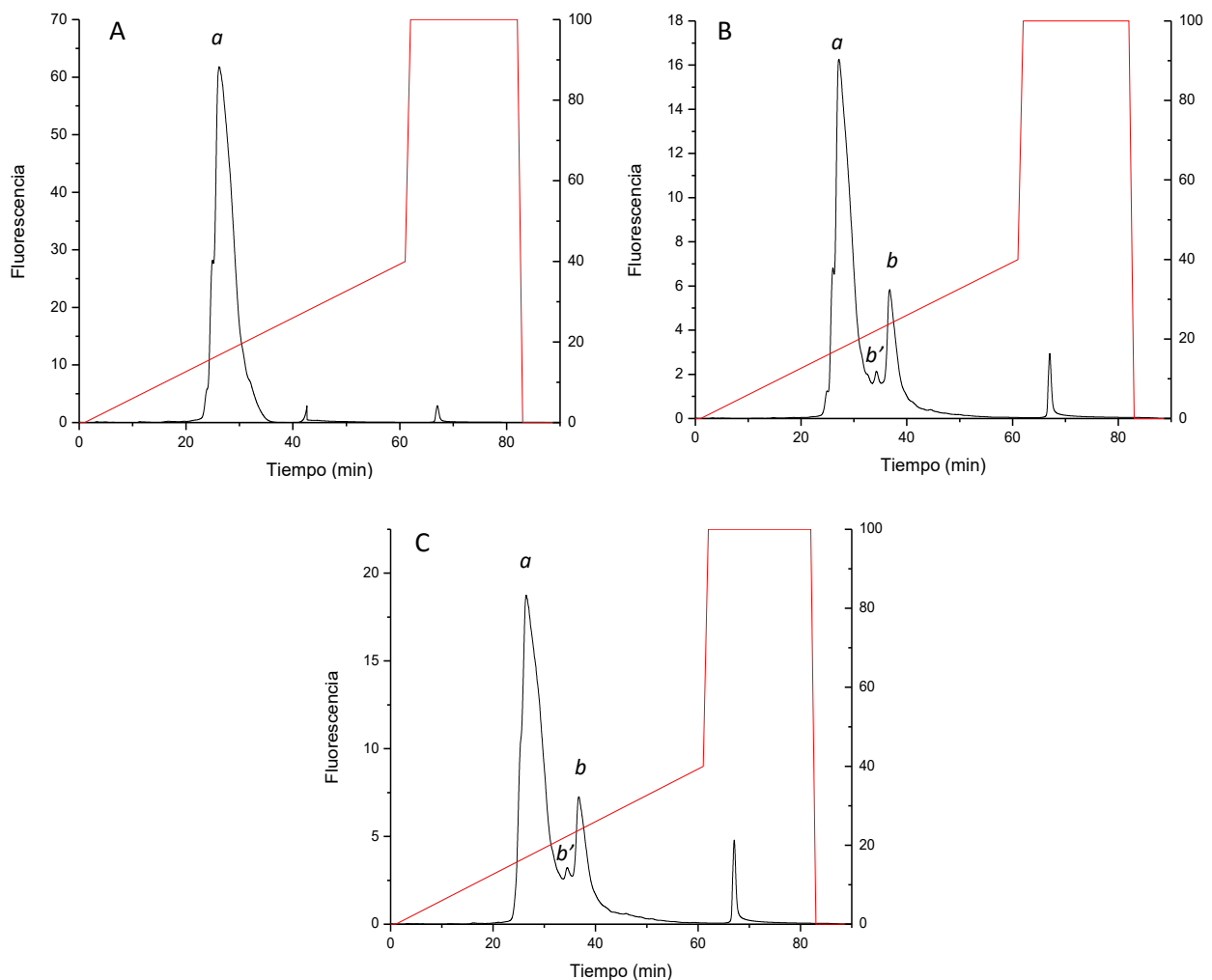


**Figura 15. Curva de calibración de concentraciones finales de HSA comercial delipidada (cedida por Martina Steglich) de 0-3  $\mu\text{M}$ .**

Para la cuantificación se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de plasma en 1 mL de reactivo de BCP. Las medidas se realizaron por triplicado. Se determinó una concentración de HSA en la muestra de plasma de 29 g/L. Se verificó a su vez que no existe precipitación de la HSA cuando se diluye el plasma en amortiguador A (FD = 1/10).

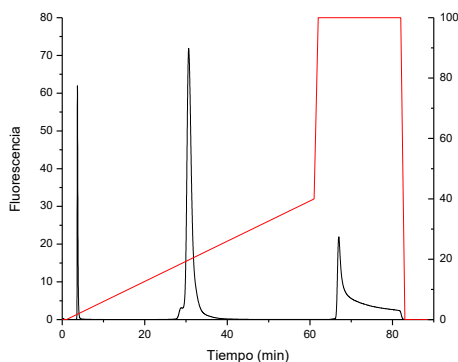
#### 4.5. Purificación semipreparativa de HSA-SH

Para realizar los experimentos de aproximación del  $pK_a$  del ácido sulfénico más adelante, se necesitaba contar con HSA-SH de alta pureza. Como se mencionó anteriormente la HSA comercial es heterogénea en cuanto al estado de oxidación de su tiol libre y este procedimiento cromatográfico es útil para purificar una isoforma específica que sea necesaria. Una gran ventaja del método es que hace uso de una columna semipreparativa, es decir que se puede inyectar una concentración de muestra considerable y así obtener suficiente proteína purificada para posteriores experimentos. En las condiciones que se han descrito en este trabajo es posible inyectar hasta 15 mg de HSA comercial reducida (datos no mostrados) y purificar el pico correspondiente a HSA-SH con un rendimiento aproximado de 20% (con una exigencia de pureza alta).



**Figura 16. Pre-purificación semi-preparativa de HSA-SH.** Se inyectaron 300 (A) y 200  $\mu$ L (B y C) de HSA reducida 0.78 mM siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Se recolectaron fracciones de 0.5 mL que fueron posteriormente seleccionadas y juntas para obtener la fracción HSA-SH pura.

Para verificar la pureza de la fracción HSA-SH se repitió el procedimiento inyectando 300  $\mu$ g de las fracciones concentradas (figura 17) donde se aprecia un único pico predominante con un pico hijo correspondiente a una pequeña fracción de HSA<sub>3-585</sub>-SH y la cantidad de tioles se midió con DTNB revelando una relación 0.95 HSA-SH/HSA.

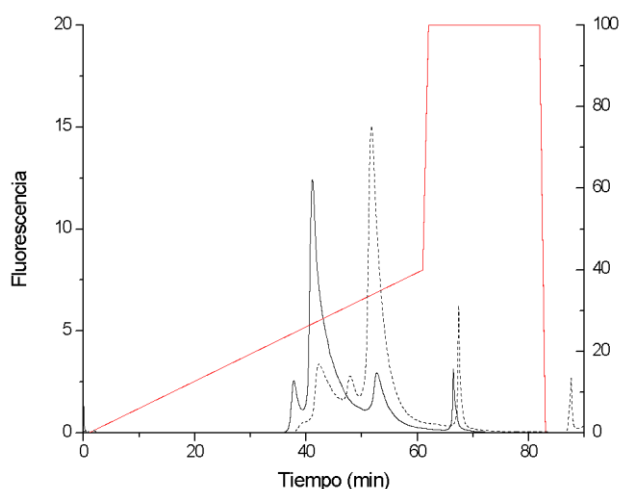


**Figura 17. Verificación de la pureza de la fracción seleccionada.** Se inyectaron 300  $\mu\text{g}$  de la fracción purificada para evaluar su estado de pureza. Se utilizó el método previamente descrito. El primer pico corresponde a un rastro de fluoresceína de un experimento anterior.

#### 4.6. Integración de picos complejos

Para realizar los experimentos de aproximación del  $\text{pK}_a$  del ácido sulfénico descritos más adelante, se necesitaba poder cuantificar las diferentes especies derivadas de HSA-SOH. Para ello se debe determinar el área de los picos de interés. Esto es en general sencillo en aquellas cromatografías con buena resolución donde los picos se encuentran separados y la señal regresa a la línea de base entre pico y pico. Para casos más complejos donde la resolución cromatográfica no es tan buena se utilizan herramientas informáticas que intentan ajustar los picos a funciones conocidas (Gaussianas, Lorentzianas, etc.). En nuestro caso un exhaustivo intento de ajustar los picos de nuestro cromatograma a las diferentes funciones que ofrece el software OriginPro 8 no tuvo un resultado exitoso. En busca de un método confiable para la integración de las áreas de los picos se realizaron diferentes pruebas con el software del equipo Agilent, el ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03.

Se presenta a continuación el análisis de un mismo resultado con las diferentes opciones que ofrece este software. Para ello se utilizaron los resultados de las corridas de HSA reducida y tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM por 16 min a temperatura ambiente (Figura 18).



**Figura 18. Cromatogramas de HSA reducida y oxidada.** Se sembraron 300  $\mu\text{g}$  de HSA reducida con  $\beta$ -mercaptoetanol (10 mM, 60 min, T. amb.) y posteriormente gel-filtrada en columna PD-10 contra amortiguador fosfato de Sodio (100 mM,  $\text{pH} = 7,4$ , dtpa 0,1 M) (línea llena) y misma muestra de HSA tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30mM, 16 min, T. amb) (línea punteada).



Se efectuaron integraciones para los picos correspondientes (pico  $a'$  en 37,78 min.,  $a$  en 41.12 min. y  $b$  en 52.71 min. para el trazo de línea llena y pico  $a$  en 42.3 min.,  $b'$  en 47.2 min. y  $b$  en 51,7 min. para el trazo de línea punteada), con 3 métodos diferentes cambiando los parámetros de integración en el software ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03.

#### 4.6.1. Tangent Skim (Exponential curve fitting)

Activando la opción “tangent skim mode” (exponencial) el modelo dibuja una curva utilizando una ecuación exponencial a través del inicio y fin del pico “hijo”. La curva pasa por debajo de cada pico “hijo” anterior o posterior al pico “padre” y el área debajo de la curva es restada de cada pico “hijo” y sumada a cada pico “padre” (Figuras 19 y 20).

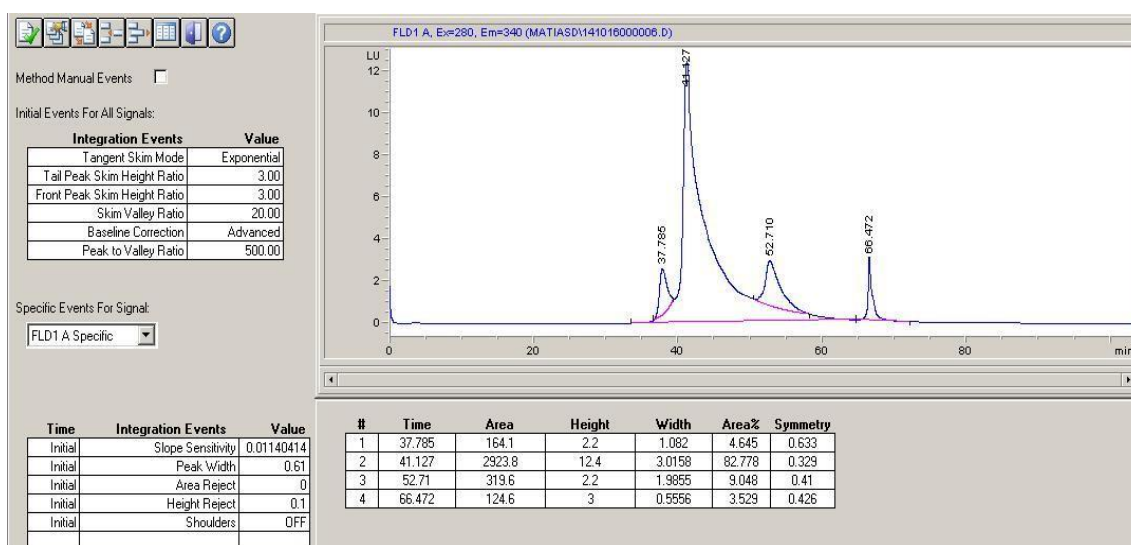


Figura 19. Captura de pantalla de la integración con el método tangent skim de HSA reducida.

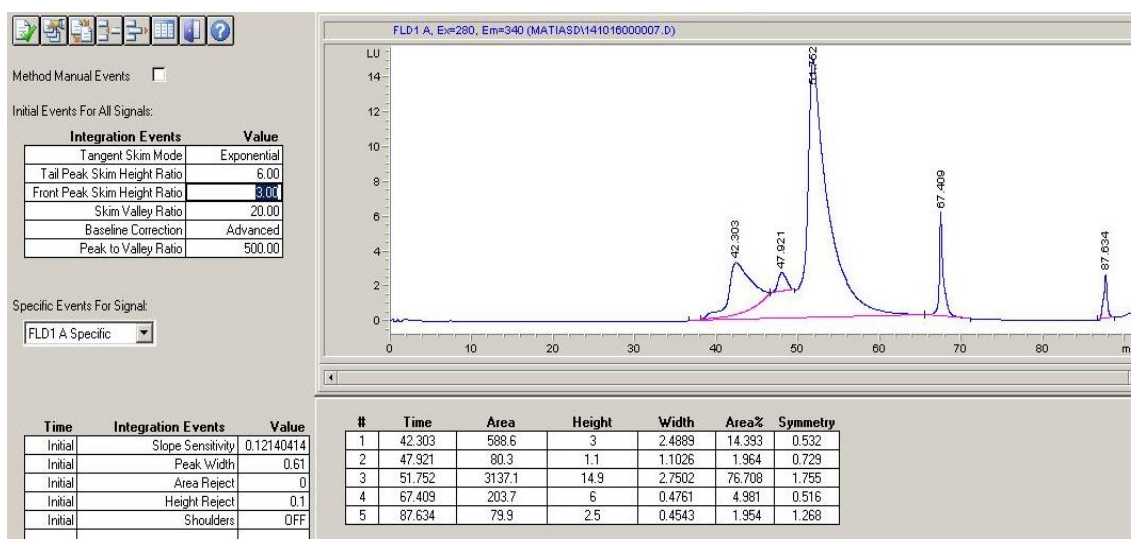


Figura 20. Captura de pantalla de la integración con el método tangent skim de HSA oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

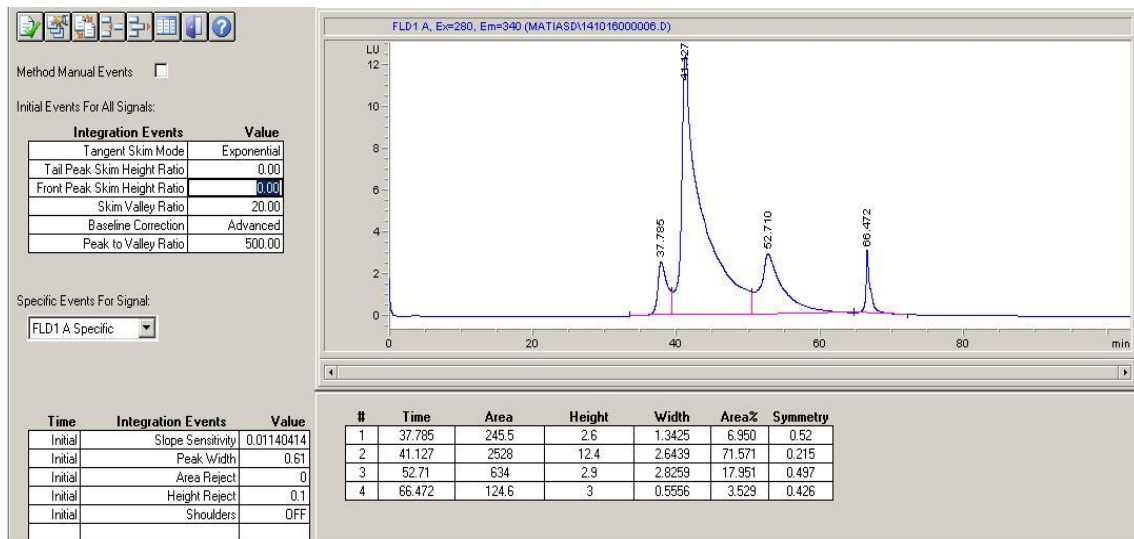
**Tabla 5. Relaciones de áreas de los diferentes picos del cromatograma utilizando el método tangent skim.**

Relaciones	HSA reducida	HSA oxidada
$HSA-SH/HSA_{Total}$	0.8580	0.1546
$HSA-SO_2^-/HSA_{Total}$	0.0937	0.8242
$HSA-SH_{3-585}/HSA_{Total}$	0.04815	-
$HSA_{3-585}-SO_2^-/HSA_{Total}$	-	0.021

La tabla 5 refleja los cocientes de las áreas, tomando como área total la suma de los picos 1,2 y 3.

#### 4.6.2. Tangent skim OFF

Al modificar los parámetros que sirven de criterio de selección de picos “hijos” para el programa a un valor igual a cero se desactiva el método de tangent skim. La alternativa que utiliza el software en este caso es integrar cada pico hasta el mínimo del valle. De esta forma se asume que el área del primer pico termina al alcanzar el mínimo del valle donde comienza el área correspondiente al segundo pico.



**Figura 21. Captura de pantalla de la integración sin el método tangent skim de HSA reducida.**

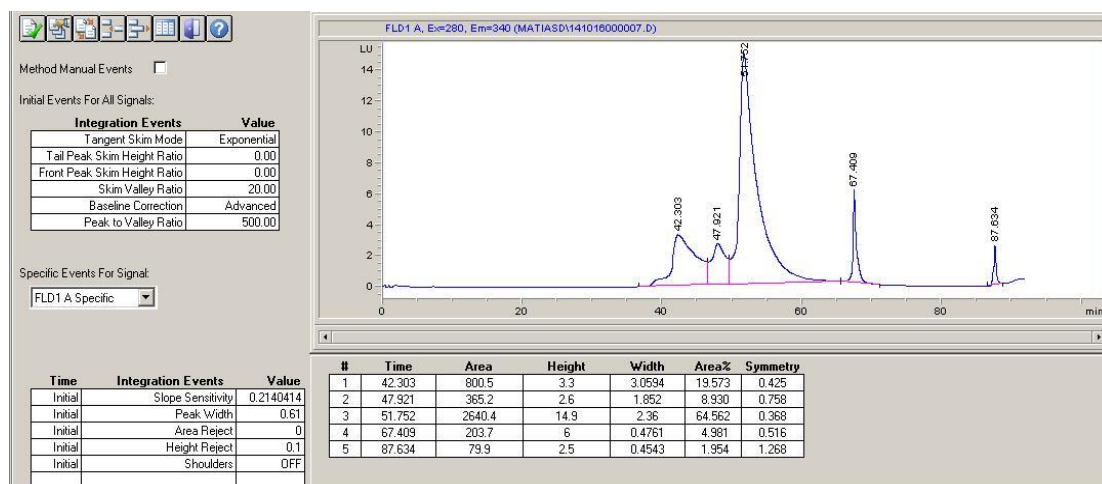


Figura 22. Captura de pantalla de la integración sin el método tangent skim de HSA oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabla 6. Relaciones de áreas de los diferentes picos del cromatograma sin el método tangent skim.

Relaciones	HSA red	HSA oxidada
$HSA-SH/HSA_{Total}$	0.7420	0.2103
$HSA-SO_2^-/HSA_{Total}$	0.1860	0.6937
$HSA-SH_{3-585}/HSA_{Total}$	0.0719	-
$HSA_{3-585}-SO_2^-/HSA_{Total}$	-	0.0959

La tabla 6 refleja los cocientes de las áreas, tomando como área total la suma de los picos 1,2 y 3.

### 4.6.3. Valley to Valley

Modificando el parámetro peak to valley ratio a un valor igual a cero el software define una nueva línea de base que va desde el inicio del pico al inicio del valle y de valle a valle dependiendo de la composición de picos del cromatograma.

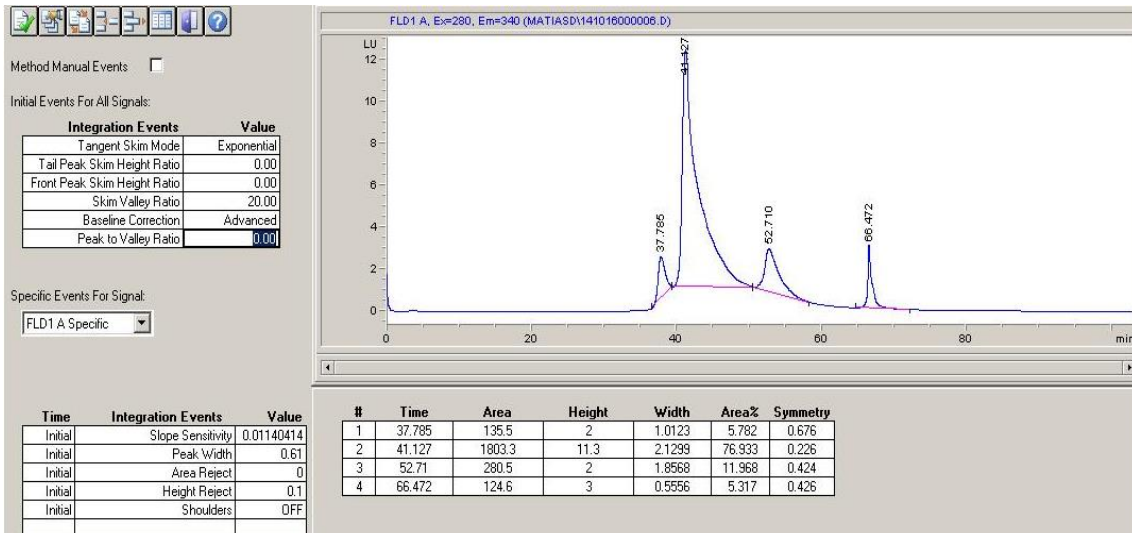


Figura 23. Captura de pantalla de la integración con el método valley to valley de HSA reducida.

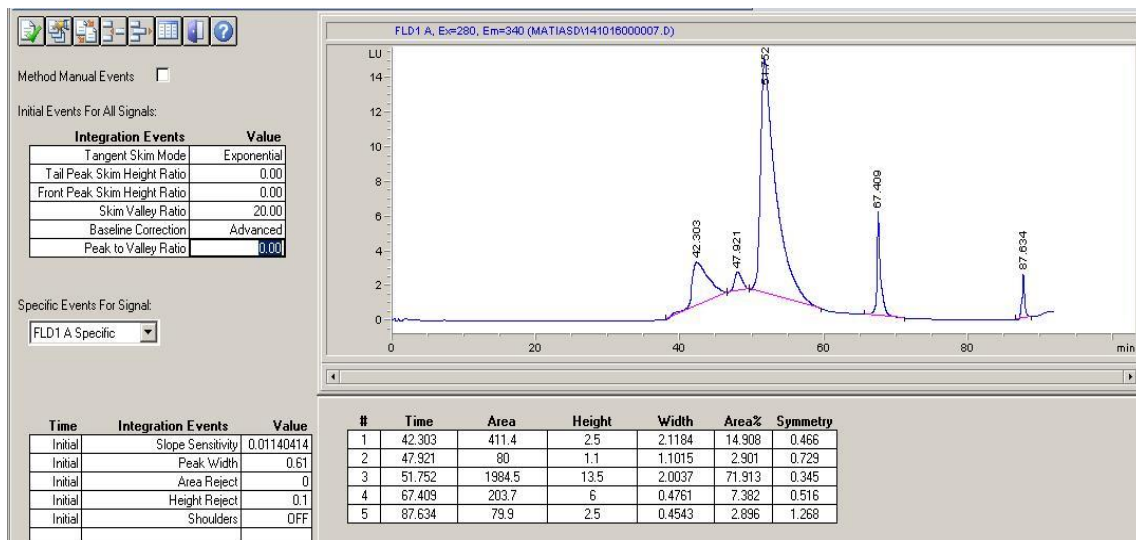


Figura 24. Captura de pantalla de la integración con el método valley to valley de HSA oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 7. Relaciones de áreas de los diferentes picos del cromatograma con el método valley to valley.**

<i>Relaciones</i>	<i>HSA red</i>	<i>HSA oxidada</i>
$HSA-SH/HSA_{Total}$	0.8125	0.1661
$HSA-SO_2^-/HSA_{Total}$	0.1263	0.8015
$HSA-SH_{3-585}/HSA_{Total}$	0.0610	-
$HSA_{3-585}-SO_2^-/HSA_{Total}$	-	0.0323

La tabla 7 refleja los cocientes de las áreas, tomando como área total la suma de los picos 1,2 y 3.

Por último la tabla 8 resume las relaciones obtenidas por medio de los distintos métodos para facilitar su comparación.

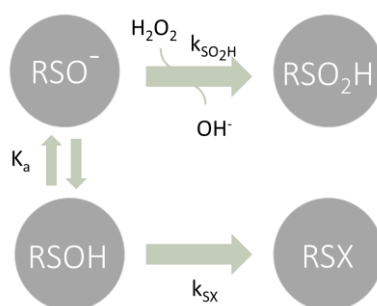
**Tabla 8. Cocientes obtenidos por los distintos métodos.**

<i>Relaciones</i>	<i>HSA<sub>reducida</sub></i> <i>(tangent</i> <i>skim)</i>	<i>HSA<sub>oxidada</sub></i> <i>(tangent</i> <i>skim)</i>	<i>HSA<sub>reducida</sub></i> <i>(tangent</i> <i>skim off)</i>	<i>HSA<sub>oxidada</sub></i> <i>(tangent</i> <i>skim off)</i>	<i>HSA<sub>reducida</sub></i> <i>(valey to</i> <i>valey)</i>	<i>HSA<sub>oxidada</sub></i> <i>(valey to</i> <i>valey)</i>
$HSA-SH/HSA_{Total}$	0.8580	0.1546	0.7420	0.2103	0.8125	0.1661
$HSA-SO_2^-/HSA_{Total}$	0.0937	0.8242	0.1860	0.6937	0.1263	0.8015
$HSA-SH_{3-585}/HSA_{Total}$	0.04815	-	0.0719	-	0.0610	-
$HSA_{3-585}-SO_2^-/HSA_{Total}$	-	0.021	-	0.0959	-	0.0323

Es claro que dependiendo de cada caso (o de las características de cada cromatograma) uno u otro método será el más adecuado. En el caso de picos bien resueltos, el método tangent skim off parece ser la opción más robusta. Esta fue la que se utilizó en los experimentos de aproximación a la determinación del pK<sub>a</sub> del ácido sulfénico mostradas más adelante. La integración de los picos se realizó con el software OriginPro 8 de forma similar al método 4.6.2 tangent skim off, determinando de forma manual por el usuario el límite entre un pico y otro y efectuando la integración.

#### 4.7. Aproximación a la determinación del $pK_a$ del ácido sulfénico

El ácido sulfénico (HSA-SOH) puede oxidarse a ácido sulfinico (HSA-SO<sub>2</sub>H), reaccionar con tioles de bajo peso molecular para generar disulfuros (HSA-SSR) o puede decaer espontáneamente a un producto que llamamos HSA-SX, probablemente una sulfenamida. En muestras de HSA comercial donde no se encuentran tioles de bajo peso molecular el HSA-SOH puede en presencia de un oxidante oxidarse a HSA-SO<sub>2</sub>H o decaer a HSA-SX. Consideraciones acerca de la química de estos dos procesos permiten prever que la oxidación a HSA-SO<sub>2</sub>H predominará a pHs más bien alcalinos donde el sulfénico esté ionizado, mientras que el decaimiento a HSA-SX, si esta especie es una sulfenamida, requerirá pHs relativamente ácidos, donde el sulfénico esté protonado (Esquema 1).



**Esquema 1. Esquema de las especies involucradas en la oxidación de HSA-SOH a HSA-SO<sub>2</sub>H o el decaimiento a HSA-SX.**  $K_a$  representa la constante de disociación ácida del ácido sulfénico,  $k_1$  representa la constante de reacción de orden dos de formación de sulfinico y  $k_2$  representa la constante de reacción de primer orden del decaimiento espontáneo a RSX.

Por lo tanto el análisis cromatográfico de muestras de HSA enriquecidas en HSA-SOH incubadas a distintos pHs en presencia de peróxido de hidrógeno, podría constituir una estrategia experimental para determinar el  $pK_a$  del HSA-SOH. Basándose en la competencia entre estas dos reacciones se realizaron dos aproximaciones experimentales con el fin de determinar este  $pK_a$ . A continuación se presentan los resultados de ambas aproximaciones en orden cronológico pues eso explica las consecuentes decisiones tomadas en busca de alcanzar el objetivo propuesto.

#### 4.7.1. Aproximación de punto final

Sabiendo que cuando dos procesos compiten, a tiempo final el cociente de productos equivale al cociente de constantes y teniendo en cuenta que para este caso:

$$\frac{[RSO_2H]}{[RSX]} = \frac{k_{SO_2H}[H_2O_2][RSO^-]}{k_{SX}[RSOH]} = \frac{k'_{SO_2H}[RSO^-]}{k_{SX}[RSOH]} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$K_a = \frac{[RSO^-][H^+]}{[RSOH]} \quad \rightarrow \quad \frac{K_a}{[H^+]} = \frac{[RSO^-]}{[RSOH]} \quad \text{Ecuación 14}$$

Se puede sustituir:

$$\frac{[RSO_2H]}{[RSX]} = \frac{k'_{SO_2H}}{k_{SX}} \frac{K_a}{[H^+]} \quad \text{Ecuación 15}$$

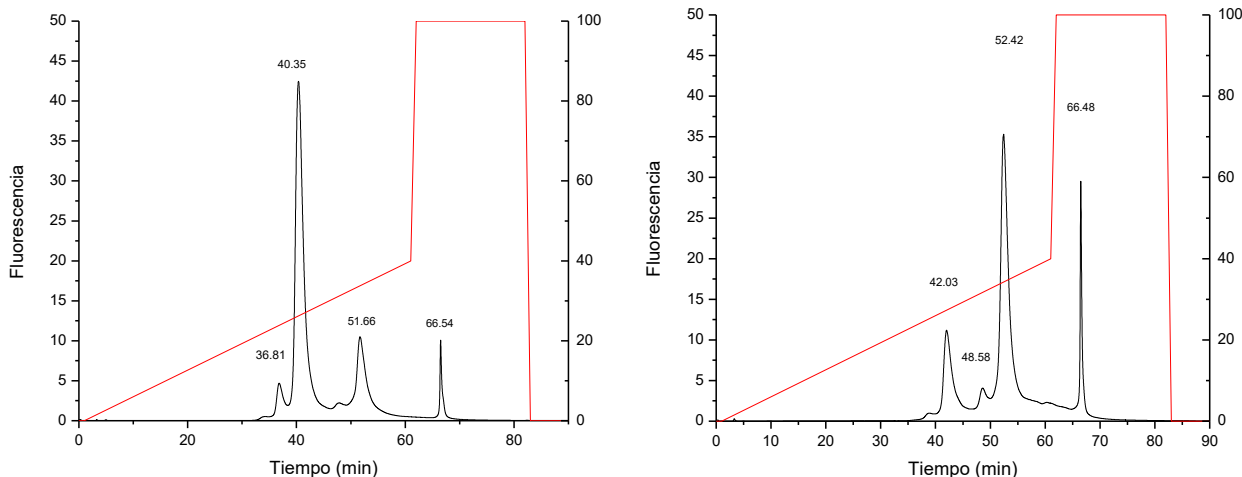
que es lo mismo que,

$$\frac{[RSO_2H]}{[RSX]} = \frac{k'_{SO_2H}}{k_{SX}} 10^{(pH-pK_a)} \quad \text{Ecuación 16}$$

Utilizando el procedimiento cromatográfico anteriormente descrito se pueden obtener las áreas correspondientes a los picos de cada especie. Graficando la relación entre  $[HSA-SO_2^-]/[HSA-SX]$  en función del pH y utilizando las ecuaciones descritas es posible obtener un valor de  $pK_a$  por medio de esta aproximación experimental.

A primera vista la aproximación de punto final nos atrajo por su simpleza experimental. Una primera prueba de oxidación de ácido sulfénico ( $H_2O_2$  4 mM, 30 min, 37°C) que fue pre-formado mediante una incubación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  4 mM, 4 min, 37°C) a dos pHs diferentes ( $pH_1 = 5.30$  y  $pH_2 = 8.09$ ) confirmó la dependencia de la competencia en la formación de las dos especies con el pH (Figura 25).

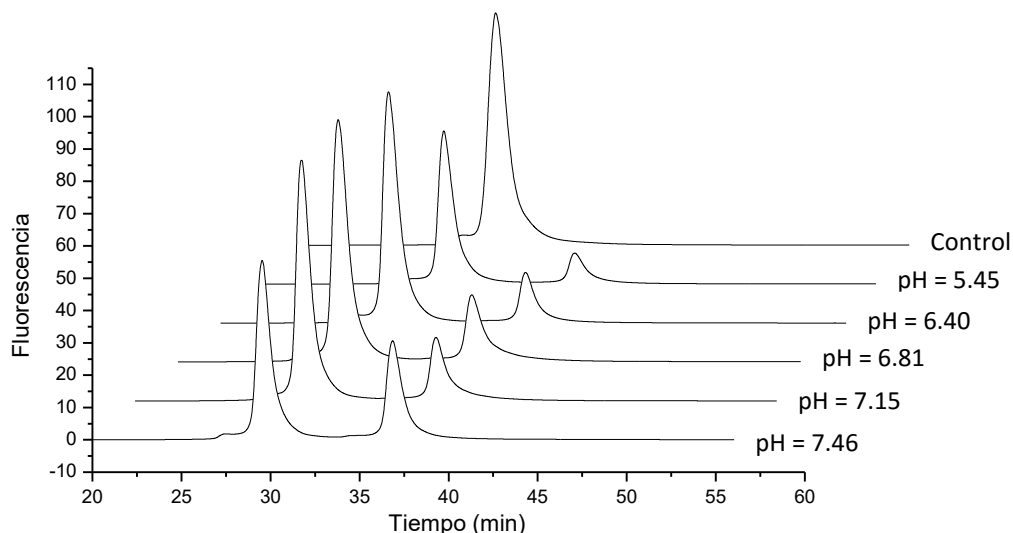
Este primer experimento confirmó la hipótesis de dependencia presentada en el esquema 4.3. A  $pH = 5.30$  se observó que el pico mayor corresponde a la especie HSA-SX mientras que a  $pH 8.09$  se forma predominantemente HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Hay que recordar que con un tiempo de incubación con peróxido tan largo, todo el HSA-SH va a decaer y lo hará a través de dos vías en competencia. Esta competencia depende de la proporción relativa de HSA-SOH y HSA-SO<sup>-</sup> en equilibrio rápido. Si el pH al cual se realiza la oxidación es menor al  $pK_a$ , la especie protonada HSA-SOH predomina sobre la especie desprotonada HSA-S<sup>-</sup> y se formará mayoritariamente el producto HSA-SX. Por otro lado cuando la oxidación se realiza a un pH por encima del  $pK_a$  la especie de partida predominante será la desprotonada y se espera en este caso que la competencia se vea favorecida para la formación de HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> tal como se confirma experimentalmente.



**Figura 25. Oxidación de HSA en amortiguador HAc/Mes/Tris a pH = 5.30 (izq.) y pH = 8.09 (der.) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM (30 min, 37°C).** A pH más alcalino predomina la especie HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> y se refleja en la formación de mayor cantidad de HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, mientras que a pH más ácido predomina la especie HSA-SOH que favorece el decaimiento espontáneo reflejado en la formación de mayor cantidad de HSA-SX (tr=41 ± 1 min).

Estos experimentos pilotos fueron muy alentadores y se prosiguió a repetirlos incluyendo más puntos. Un aspecto importante en esta aproximación es descontar el ácido sulfínico inicial en la muestra, ya que es muy difícil contemplarlo en las ecuaciones. Para esto existen dos posibilidades, utilizar una muestra de HSA reducida que siguiera el mismo proceso que las otras muestras pero sin ser expuesta a peróxido de hidrógeno como control o partir de una muestra pre-purificada de HSA-SH que no presentara la isoforma HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Nuestros intentos con la primera opción no concluyeron en resultados confiables y optamos por el segundo camino, siendo éste más trabajoso pero de cierta forma más “limpio”. Se utilizó la muestra pre-purificada (sección 4.5) para realizar el mismo experimento antes descrito, esta vez en amortiguadores HAc/Mes/Tris de pHs = 5, 6, 6.5, 7, 7.5. Los pHs finales (luego de agregar HSA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron medidos con un mini-electrodo de vidrio de calomel previamente equilibrado utilizando soluciones estándar de Sigma pH = 4, 7 y 10 (Figura 26)





**Figura 26. Experimento de oxidación de HSA-SH pre-purificada.** Se preformó HSA-SOH y se dejó decaer a distintos pHs durante 30 minutos a 37°C en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4mM. A continuación se sembraron 300 µg de HSA en amortiguador HAC/Mes/Tris a pHs = 5.45, 6.40, 6.81, 7.15, 7.46.

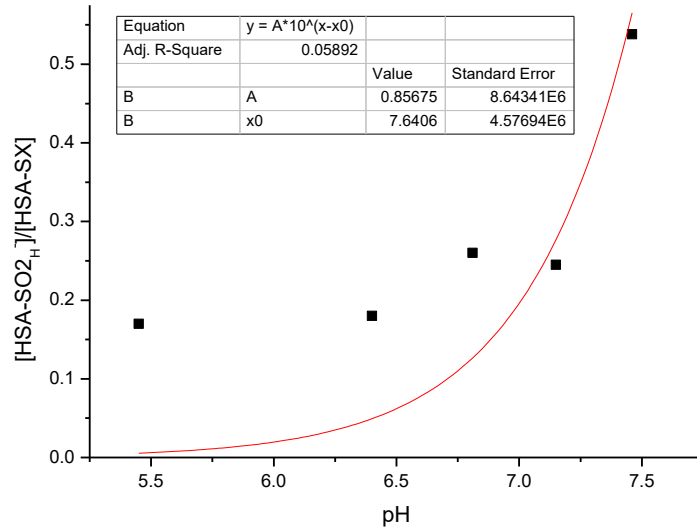
A su vez en estos experimentos se realizó la recolección de fracciones de 0.5 mL con el fin de obtener una muestra pura de HSA-SX para su estudio por espectrometría de masa por la Dra. Turell.

Las áreas de los picos se calcularon utilizando la herramienta de integración del OriginPro 8 seleccionando manualmente los límites de la integración. La siguiente tabla resume las áreas calculadas.

**Tabla 9. Áreas de los picos calculadas con el software OriginPro8**

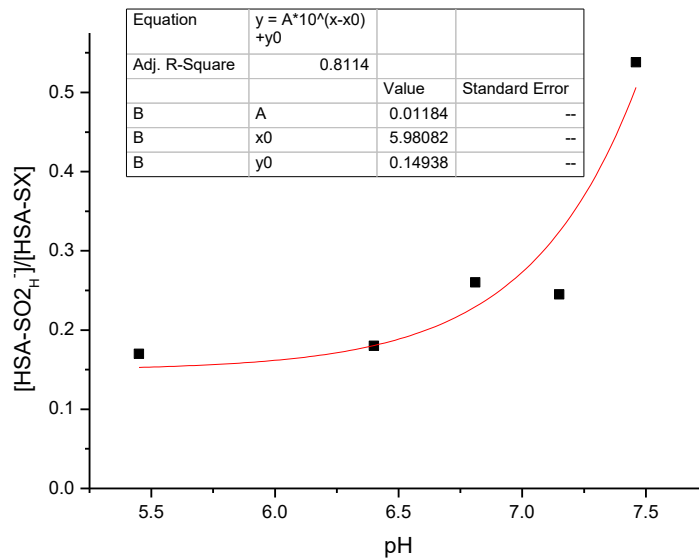
<i>pH</i>	<i>Área HSA-SX</i>	<i>Área HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup></i>	<i>Á HSA SO<sub>2</sub><sup>-</sup>/Á HSA-SX</i>
5.45	3161.8	539	0.170
6.40	4968.7	897.3	0.180
6.81	5240.5	1366.4	0.260
7.15	4793.4	1176.6	0.245
7.46	3477	1869.5	0.538

Los datos presentados en la tabla 9 se utilizaron para realizar el gráfico pH vs [HSA-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>]/ [HSA-SX]. La curva del gráfico se ajustó a la ecuación 16.



**Figura 27.** Gráfico pH vs  $[HSA-SO_2^-]/[HSA-SX]$  del experimento de aproximación a punto final a partir de HSA pre-purificada. La línea representa el ajuste a la función  $y = A \times 10^{(x-x_0)}$ .

Como se observa en la figura 27 no se logró ajustar adecuadamente a la función, fundamentalmente porque la función predice que a pH ácido el cociente debería ser igual a cero, lo cual no se verificó experimentalmente, probablemente por errores asociados a la complejidad experimental. Se logró un mejor ajuste cuando la ecuación incluyó un término constante (Figura 28).



**Figura 28:** Gráfico pH vs  $[HSA-SO_2^-]/[HSA-SX]$  del experimento de aproximación a punto final a partir de HSA pre-purificada. La línea representa el ajuste a la función  $y = A \times 10^{(x-x_0)} + y_0$ .

En este caso se obtuvo un mejor ajuste a juzgar por el valor de  $R^2$  pero no se logró que la función convergiera adecuadamente. No obstante, es posible concluir que el  $pK_a$  del ácido sulfénico se encuentra en valores próximos a la neutralidad. Las características de la ecuación derivada para esta aproximación, con asíntotas cero y más infinito, llevan a que sea difícil determinar el  $pK_a$  a partir de experimentos con errores asociados. Por lo tanto, se procedió a cambiar de aproximación experimental, de una de punto final a una de velocidades iniciales.

#### 4.7.2. Aproximación de velocidades iniciales

La aproximación de velocidades iniciales involucra un procedimiento experimental más complejo. Esta implica preformar ácido sulfénico a pH 7.4 y exponer alícuotas a diferentes pHs a una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suficientemente elevada como para competirle al decaimiento a la especie HSA-SX pero que a su vez permita frenar la reacción antes de que ésta sobrepase las condiciones de velocidad inicial, que corresponden a una transformación de HSA-SOH en HSA-SO<sub>2</sub>H del orden de 10-20%. La proporción de HSA-SO<sub>2</sub>H formada reflejará el pK<sub>a</sub> del ácido sulfénico solo si representa la velocidad inicial del proceso, pues todo el sulfénico evolucionará a sulfínico en presencia de concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si se le da tiempo suficiente, cualquiera sea el pH.

A pH 7.4 la constante de decaimiento espontáneo para formar HSA-SX vale  $(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a 25 °C y  $(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a 37 °C. Por su parte la constante de orden dos de formación de HSA-SO<sub>2</sub>H vale  $(0.4 \pm 0.2) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 37°C y se puede asumir un valor de  $(0.2 \pm 0.1) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a 25°C<sup>14,37</sup>. Para que la formación de ácido sulfínico supere en un orden de magnitud al decaimiento espontáneo es necesario utilizar concentraciones de peróxido de hidrógeno del orden de 30 mM de tal forma que el producto de la constante por concentración de peróxido ( $6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) supere el valor de  $(5.6 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . En estas condiciones, la reacción debe transcurrir por un período relativamente corto de 30 segundos antes de detener la reacción con catalasa.

Para calcular el tiempo de incubación necesario se utilizó la ecuación:

$$[R - SOH] = [R - SOH]_{inicial} * e^{-(k_{SO_2H}[H_2O_2] + k_{SX}) t} \quad \text{Ecuación 17}$$

Por último, es necesario asegurar una concentración de catalasa elevada de forma de detener la reacción en forma prácticamente instantánea (5 segundos). La concentración de catalasa a agregar se calculó según la ecuación:

$$[H_2O_2] = [H_2O_2]_0 e^{-k' t} \quad \text{Ecuación 12}$$

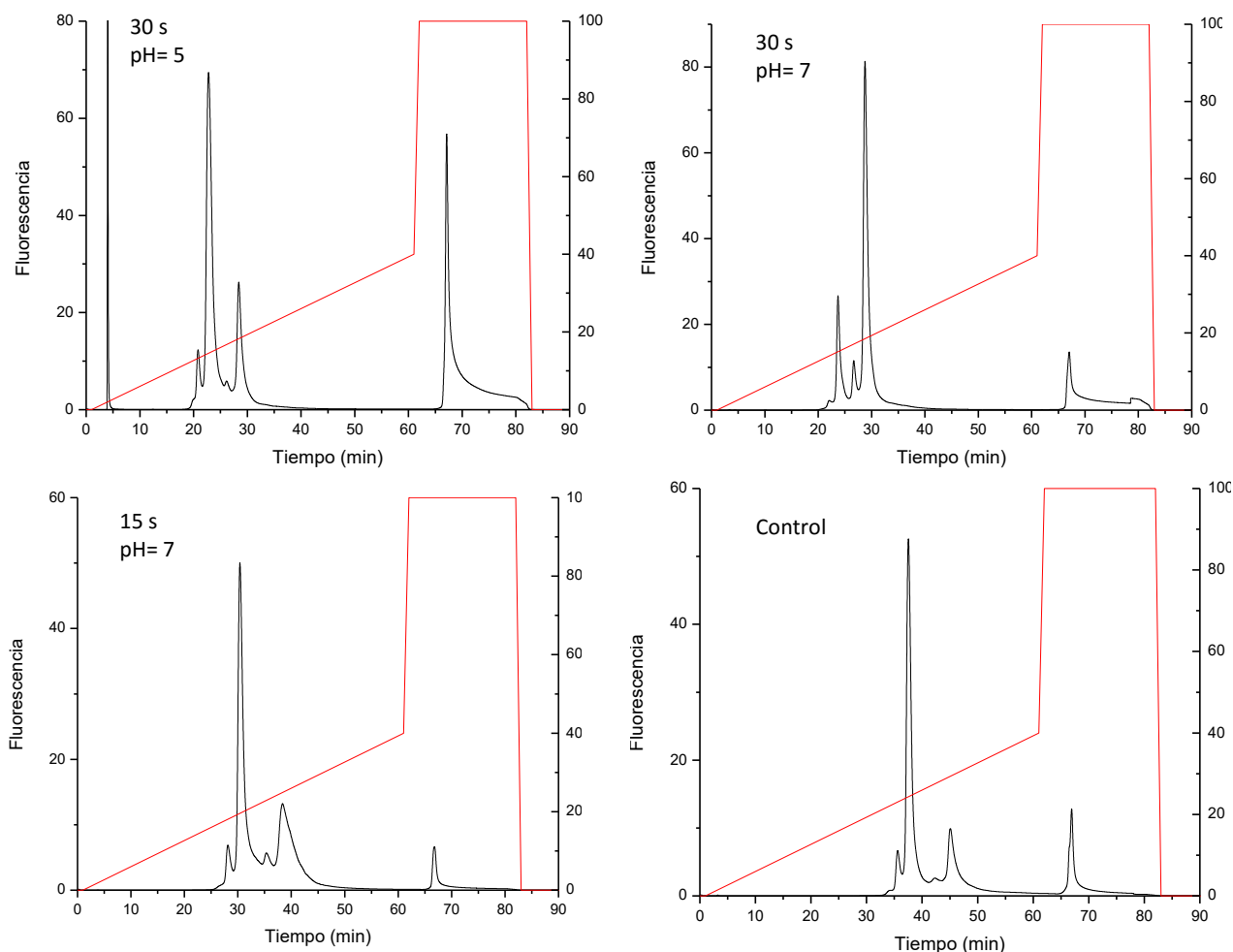
Entonces para descomponer el 90 % de 30 mM de peróxido de hidrógeno en un tiempo de 5 segundos:

$$3 = 30 e^{-k' 5} \quad \longrightarrow \quad \ln \frac{3}{30} = -k' 5 \quad \longrightarrow \quad k' = 0.46 \text{ s}^{-1}$$

Un punto importante radica en el hecho que estos cálculos deben ser apropiados tanto para pHs ácidos como para pHs alcalinos. Es decir debemos buscar las condiciones adecuadas para observar un cambio significativo en la formación de HSA-SO<sub>2</sub>H a pH ácido, donde ésta se ve desfavorecida por el estado de protonación del HSA-SOH y a la misma vez evitar un exceso de formación de HSA-SO<sub>2</sub>H a pH alcalino cuando la desprotonación del HSA-SOH lo favorece. Por otro lado debemos tener en cuenta que una cierta cantidad de HSA-SO<sub>2</sub>H estaba presente inicialmente en la muestra si ésta no fue pre-purificada. La etapa de preformación de ácido sulfénico si bien enriquece en HSA-SOH, implica también la formación de una pequeña cantidad de HSA-SO<sub>2</sub>H. Ambas sobreestimaciones pueden contemplarse realizando un control de HSA reducida que sufra el mismo procedimiento experimental de pre-formación de HSA-SOH, pero deteniendo la reacción con catalasa cumplidos los 8 minutos de preformación. En este control

el pico de HSA-SO<sub>2</sub>H representa la cantidad de sulfínico inicial de la muestra y la cantidad de sulfínico producto de la etapa de preformación.

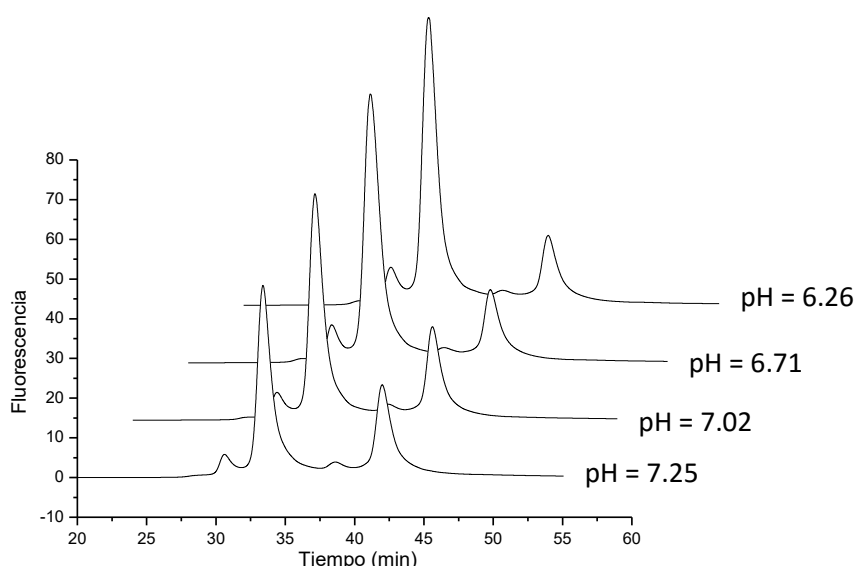
Teniendo en cuenta estos aspectos se realizó una primera tanda de pruebas preliminares donde se evaluaron tiempos de incubación de 30 y 15 segundos siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Figura 29).



**Figura 29. Experimento preliminar de oxidación de ácido sulfénico en condiciones de velocidad inicial.** Se incubó una muestra enriquecida en HSA-SOH con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM por 30 segundos (pH = 5, pH = 7) y por 15 segundos (pH = 7) y la reacción se detuvo con el agregado de catalasa. La figura abajo a la derecha es el control.

En la Figura 29 se observa el resultado de la oxidación de una mezcla enriquecida en HSA-SOH al incubarla con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM por 15 y 30 segundos. Analizando este experimento preliminar se concluye que las condiciones de oxidación fueron muy fuertes para el pH más alcalino (30 s, pH = 7) ya que la formación de HSA-SO<sub>2</sub>H resultó en un 70 % en relación a la HSA total. En vista de estos resultados se bajó el tiempo de incubación a 15 segundos (Figura 29). En este caso la formación de HSA-SO<sub>2</sub>H alcanzó un 12%. Observamos que nos encontramos en el rango de velocidad inicial pero teniendo en cuenta que esta oxidación se realizó a un pH alcalino y es posible que no se observe formación de HSA-SO<sub>2</sub>H a pHs ácidos se decidió aumentar el tiempo de incubación a 20 segundos.

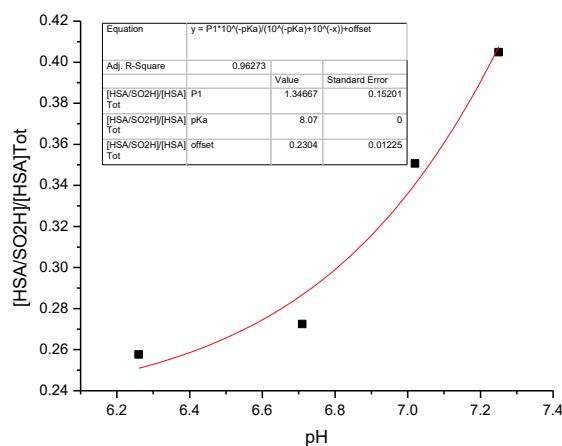
Una vez determinado el tiempo de incubación que cumpla con el compromiso de las condiciones de velocidad inicial y que a su vez permita observar cambios significativos en las oxidaciones a pHs ácidos se prepararon cinco muestras donde la oxidación ocurrió en amortiguadores de pH = 5, 6, 6.5, 7 y 7.5. Al agregar la HSA al amortiguador existe un cambio de pH de la solución final por lo que éste fue medido luego de finalizada la reacción con un mini-electrodo. Los pHs resultantes fueron 5.46, 6.26, 6.71, 7.02 y 7.25. La muestra correspondiente al pH 5.46 no se pudo correr el mismo día por lo que no se contabilizó en los cálculos.



**Figura 30. Oxidación de HSA-SO<sub>2</sub>H con [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] 30 mM y tiempo de incubación de 20 segundos a pH = 6.26, 6.71, 7.02 y 7.25.**

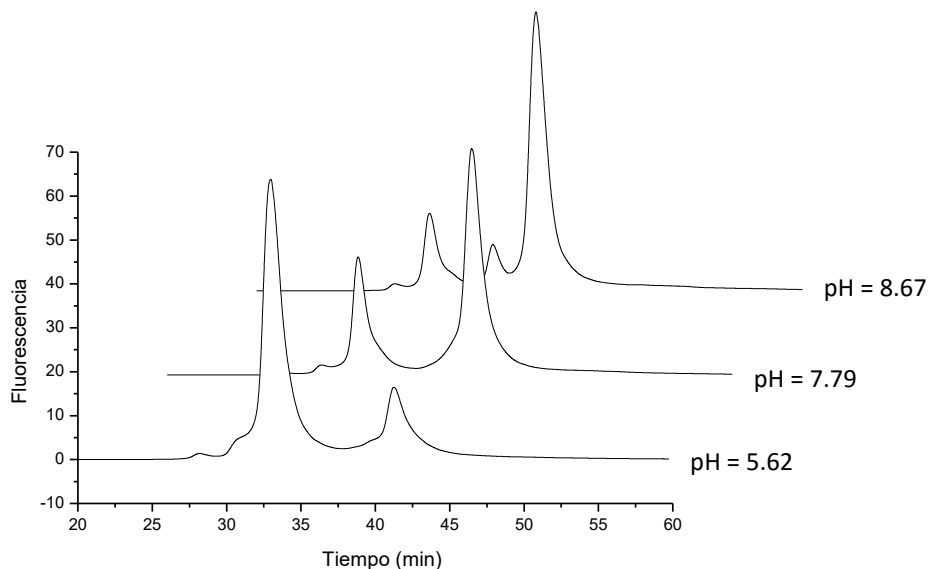
El cálculo de las áreas se realizó en el software OriginPro 8 como se explicó anteriormente. Se graficó [HSA-SO<sub>2</sub>H]/[HSA]<sub>Tot</sub> vs pH y se ajustó la curva a la ecuación:

$$y = P_1 * \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-x}} + y_0 \quad \text{Ecuación 18}$$



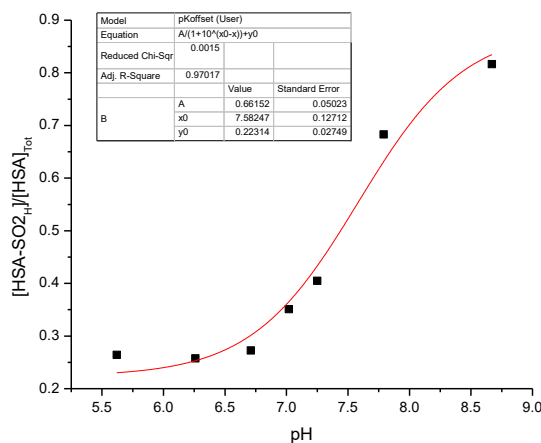
**Figura 31. Grafico [HSA-SO<sub>2</sub>H]/[HSA]<sub>Tot</sub> vs pH. La curva se ajustó a una ecuación con un pK<sub>a</sub> para obtener una aproximación del pK<sub>a</sub> del ácido sulfénico.**

Analizando el ajuste de la curva observamos que los puntos se encuentran en un rango de una unidad de pH y esto no es suficiente para definir los extremos de la sigmoide. Para complementar este experimento se prepararon nuevas muestras con pHs finales de 5.62, 7.79 y 8.67 que se muestran a continuación.



**Figura 32. Oxidación de HSA-SOH con  $[H_2O_2]$  30 mM y tiempo de incubación de 20 segundos a pH = 5.62, 7.79 y 8.67.**

Las áreas se calcularon según lo descrito anteriormente y los datos se juntaron para complementar el grafico de la figura 31. La curva se ajustó a la misma ecuación.

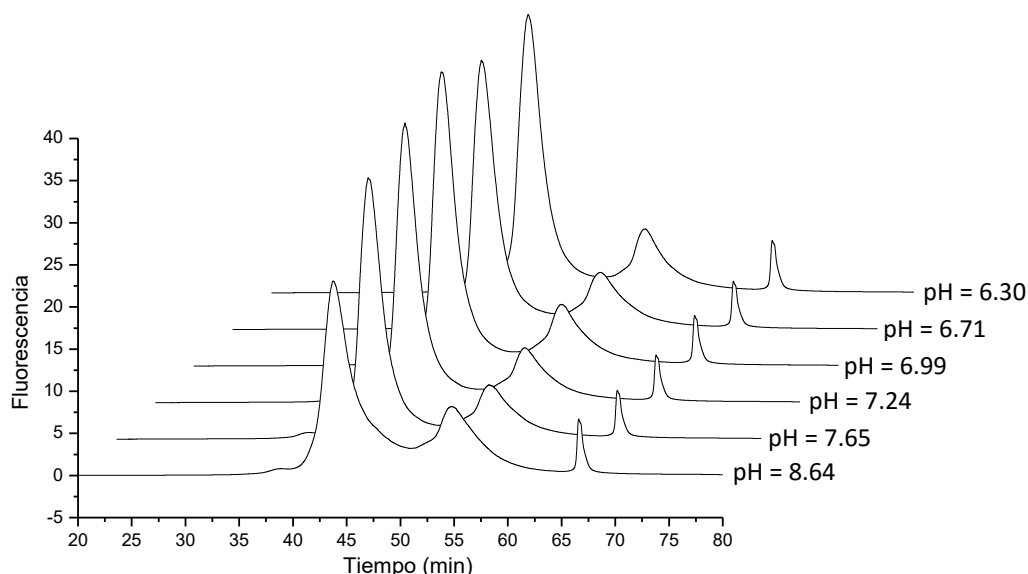


**Figura 32. Se juntaron todos los datos y se graficó pH vs  $[HSA-SO_2H]/[HSA]_{Tot}$  ajustando a la ecuación descrita anteriormente para obtener una aproximación del  $pK_a$  del ácido sulfénico.**

Al intentar extender el rango de pH de oxidación de HSA-SOH con el protocolo previamente definido observamos que los puntos de pH más alcalinos se oxidaron demasiado cayendo por fuera del rango aceptable de velocidad inicial. De todas maneras es posible definir con certeza de este experimento que el  $pK_a$  del ácido sulfénico se encuentra por debajo de 7.58. Esta afirmación es posible porque teniendo en cuenta que los últimos dos puntos se encuentran por encima del valor correspondiente a velocidad inicial y aumentan de esta forma el  $x_0$  de la curva,

es razonable decir que los valores correctos que respeten las condiciones de velocidad inicial van a caer por debajo de estos puntos disminuyendo de esta forma el  $x_0$  de la curva.

Aún en la búsqueda de las condiciones de oxidación ideales, se realizaron pruebas preliminares utilizando el mismo protocolo disminuyendo la concentración de  $[H_2O_2]$  a 20 mM y el tiempo de incubación a 10 segundos. En este caso se verificó que la formación de HSA-SO<sub>2</sub>H en el pH más alcalino (pH = 9) resultó en un 30% en relación al total de HSA (datos no mostrados). Se prepararon muestras correspondientes a los pHs = 6.3, 6.71, 6.99, 7.24, 7.65 y 8.64 además del control correspondiente. Salvo el control, todas las muestras se corrieron en el mismo día (Figura 33).



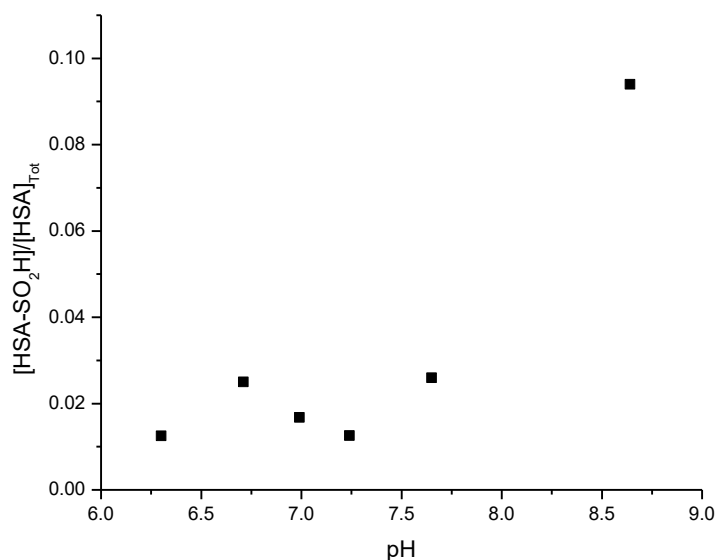
**Figura 33. Oxidación de HSA-SOH con  $[H_2O_2]$  20 mM y tiempo de incubación de 10 segundos.** La oxidación a pH = 6.30, 6.71, 6.99, 7.24, 7.65 y 8.64 se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

El resultado de este exhaustivo experimento de 6 corridas de 98 minutos cada una fue desalentador. La tabla 10 permite apreciar la correlación de las relaciones de  $[HSA-SO_2H]/[HSA]_{Total}$  en la oxidación a diferentes pHs.

**Tabla 10. Áreas calculadas para el experimento de oxidación de HSA-SOH con  $[H_2O_2]$  20 mM y tiempo de incubación de 10 segundos.**

<i>pH</i>	Área[HSA-SH]/ [HSA-SX]	Área [HSA- SO <sub>2</sub> H]	Área [HSA] <sub>Total</sub>	Área[HSA-SO <sub>2</sub> H]/ Área[HSA] <sub>Total</sub>	Resta control
<i>Control</i>	254.18	81.03	335.21	0.2417	-
6.3	103.62	35.32	138.94	0.2542	0.0125
6.71	98.21	35.72	133.93	0.2667	0.0250
6.99	106.14	37.01	143.15	0.2585	0.0168
7.24	98.82	33.71	132.53	0.2543	0.0126
7.65	95.91	35.07	130.98	0.2677	0.026
8.64	92.16	46.58	138.74	0.3357	0.094

En este caso no observamos el comportamiento esperado. La formación de HSA-SO<sub>2</sub>H aumenta a pH 6.71 en relación al pH 6.3 y luego disminuye en los dos pHs subsiguientes. Este comportamiento anormal debe ser artefacto del error en la manipulación experimental que se asume aumentó considerablemente al reducir el tiempo de incubación a 10 segundos. En la figura 34 se observa el gráfico de [HSA-SO<sub>2</sub>H]/[HSA]<sub>Tot</sub> vs pH. En este no fue posible ajustar la curva a la ecuación anteriormente descrita por lo que no se pudo extraer información útil de este experimento.



**Figura 34. Gráfico [HSA-SO<sub>2</sub>H]/[HSA]<sub>Tot</sub> vs pH.** No fue posible realizar el ajuste a la ecuación descrita anteriormente.

Se sospecha que, en estos experimentos, el error de manipulación experimental es el principal componente que impide un cálculo confiable del pK<sub>a</sub> del HSA-SOH. Como se ha mencionado con anterioridad, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizado en la oxidación y el tiempo de incubación del mismo con la HSA previo a la adición de catalasa dependen de un compromiso entre permanecer en condiciones de velocidades iniciales y a su vez permitir observar pequeños cambios en el estado de oxidación de la proteína. Es por esto que la elección de estas variables se encuentra restringido en un rango que complica la manipulación experimental. Sin embargo, el marco teórico del experimento es sólido y se sugiere con perspectivas a futuro, utilizar un sistema robotizado para la preparación de las muestras que reduzca este error de manipulación experimental. Se cree que de esta manera será posible determinar un valor más aproximado para el pK<sub>a</sub> del ácido sulfénico de la albúmina sérica humana.



## 5. Conclusiones

En este trabajo se puso a punto una técnica cromatográfica que permitió el análisis de variantes de HSA oxidada a nivel del tiol libre en el equipamiento presente en nuestro laboratorio. En este proceso, resultó fundamental la revisión de la configuración entre los módulos del instrumento para poder lograr una buena resolución cromatográfica. Específicamente, resultó necesario acortar la tubuladura que conectaba la columna con el detector con el fin de minimizar procesos de difusión post-columna. Además se evaluó el rol de diferentes variables en la capacidad de resolución del procedimiento. Por un lado se concluye que la cantidad de HSA que se inyecta muestra una dependencia proporcional con la resolución. Se definió que es importante inyectar al menos 300  $\mu\text{g}$  de HSA para obtener una resolución adecuada ( $R_s = 1.54$ ) y se sugiere incrementar este valor en aquellos casos que la cantidad de muestra disponible no sea una limitante. Por otro lado se concluye que la temperatura afecta la resolución y se sugiere realizar el procedimiento en condiciones de temperatura constante, idealmente en valores menores a los 25°C. Es importante destacar que los tiempos de retención demostraron diferencias al comparar cromatogramas de días diferentes, probablemente debido a diferencias de temperatura entre corridas o pequeñas diferencias en la composición de los amortiguadores. Sin embargo, en general, la anchura de los picos y su separación se mantuvieron incambiables, siendo éstos los aspectos más importantes en términos de reproducibilidad. Además se analizó la capacidad de analizar las variantes de HSA oxidada en muestras de plasma fresco y se verificó la no precipitación de la HSA al realizar diluciones en el amortiguador A. Estos aspectos junto a otros permitieron definir las condiciones necesarias para efectuar un análisis satisfactorio de muestras de HSA con el equipamiento presente en nuestro laboratorio.

Por otro lado la técnica se utilizó para elucidar propiedades bioquímicas de la HSA y de su derivado ácido sulfénico (HSA-SOH), particularmente el decaimiento de este último. En primer lugar, fue posible purificar el producto del decaimiento espontáneo de ácido sulfénico al que denominamos HSA-SX, para posteriores estudios por espectrometría de masa a cargo de la Dra. Lucía Turell. En segundo lugar se abordaron dos aproximaciones para la determinación del  $pK_a$  del ácido sulfénico de la HSA. En estos experimentos se demostró la dependencia de la competencia entre los procesos de decaimiento espontáneo y oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el pH. La aproximación a velocidades iniciales presenta un marco teórico robusto para la determinación del  $pK_a$  del ácido sulfénico, pero dificultades a nivel de la manipulación experimental impidieron obtener dicho valor. Específicamente se sospecha que el error introducido por la manipulación del usuario en la oxidación de las muestras es el paso limitante para cumplir con el objetivo. Como los tiempos de incubación son necesariamente pequeños sería ideal preparar las muestras en un sistema robotizado que reduzca dicho error. Sin embargo, se concluye de esta aproximación que el valor de  $pK_a$  del ácido sulfénico se encuentra por debajo de 7.5.

## 6. Bibliografía

1. Tanford, C. & Reynolds, J. *Nature's Robots: A History of Proteins*. (Oxford University Press, 2003).
2. GE Healthcare Handbook. Strategies for protein purification.
3. Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. (Ed. Médica Panamericana, 2007).
4. Cohn, E. J. *et al.* A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Amer Chem Soc* **68**, 459–475 (1946).
5. Ettre, L. S. MS Tswett and the invention of chromatography. *LC GC N. Am.* **21**, 458–467 (2003).
6. Karger, B. L. *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules: Fundamentals*. (Elsevier, 1996).
7. GE Healthcare Handbook. Ion exchange chromatography & chromatofocusing.
8. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*. (John Wiley & Sons, 2012).
9. Ettre, L. S. Jim Waters: The Development of GPC and the First HPLC Instruments.
10. Van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. & Klinkenberg, A. van. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci.* **5**, 271–289 (1956).
11. Ettre, L. S. & Horvath, C. Foundations of modern liquid chromatography. *Anal. Chem.* **47**, 422A–446a (1975).
12. Hernández, J. M. Cromatografía líquida de alta eficacia. Educación continua en el laboratorio Clínico **8**, 49–62 (2005).

13. Peters, T. J. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. (Academic Press, 1995).
14. Lucía Turell. Ácido sulfénico en albúmina sérica humana, Tesis de doctorado. (Universidad de la República).
15. Dugaiczky, A., Law, S. W. & Dennison, O. E. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 71–75 (1982).
16. McClure, R. & Craven, B. X-Ray Data for 4 Crystalline Forms of Serum-Albumin. *J. Mol. Biol.* **83**, 551–555 (1974).
17. Preliminary x-ray investigation of an orthorhombic crystal form of human plasma albumin.
18. Carter, D. C. *et al.* Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* **244**, 1195–1198 (1989).
19. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–215 (1992).
20. Carter, D., Chang, B., Ho, J., Keeling, K. & Krishnasami, Z. Preliminary Crystallographic Studies of 4 Crystal Forms of Serum-Albumin. *Eur. J. Biochem.* **226**, 1049–1052 (1994).
21. Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P. & Franks, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **5**, 827–835 (1998).
22. Bhattacharya, A. A., Curry, S. & Franks, N. P. Binding of the General Anesthetics Propofol and Halothane to Human Serum Albumin High Resolution Crystal Structures. *J. Biol. Chem.* **275**, 38731–38738 (2000).

23. Turell, L. \et al. Reactivity of Sulfenic Acid in Human Serum Albumin †. \Biochemistry \47, 358–367 (2008).
24. Carballal, S. \et al. Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite †. \Biochemistry \42, 9906–9914 (2003).
25. Turell, L., Radi, R. & Alvarez, B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 244–253 (2013).
26. Bruschi, M., Candiano, G., Santucci, L. & Ghiggeri, G. M. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 5473–5479 (2013).
27. Musante, L. *et al.* Characterization of oxidation end product of plasma albumin ‘in vivo’. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 668–673 (2006).
28. Beck, J. L. *et al.* Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **325**, 326–336 (2004).
29. Era, S. *et al.* Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pept. Protein Res.* **31**, 435–442 (1988).
30. Sogami, M. *et al.* HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **25**, 398–402 (1985).
31. Turell, L. *et al.* HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *J. Chromatogr. B* **944**, 144–151 (2014).
32. Alvarez, B., Carballal, S., Turell, L. & Radi, R. in *Methods in Enzymology* **473**, 117–136 (Elsevier, 2010).
33. Ellman, G. & Lysko, H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* **93**, 98–102 (1979).

34. Operating Conditions and specifications -TSKgel DEAE-5PW - DS1030DEAE5PW.
35. Wenclawiak, B. W., Giegold, S. & Teutenberg, T. High-Temperature Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* **41**, 1097–1105 (2008).
36. Greibrokk, T. & Andersen, T. High-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1000**, 743–755 (2003).
37. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. & Alvarez, B. Sulfenic acid—A key intermediate in albumin thiol oxidation. *J. Chromatogr. B* **877**, 3384–3392 (2009).