Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

Modificaciones postraduccionales de albúmina sérica en pacientes alcohólicos como potencial pronóstico biomarcador mediante espectrometría de masas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

AUTOR

Celia Bertha VARGAS DE LA CRUZ

ASESORES

Dr. Mesías Moisés GARCÍA ORTIZ

PhD. Carlo BERTUCCI (Coasesor)

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vargas C. Modificaciones postraduccionales de albúmina sérica en pacientes alcohólicos como potencial pronóstico biomarcador mediante espectrometría de masas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2021.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0001-9187-5504
DNI o pasaporte del autor	42354741
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-7340-4757
DNI o pasaporte del asesor	07200816
Grupo de investigación	BIOTECHNOLOGY AND OMICS IN LIFE SCIENCES BIOLIFS - Resol. Rectoral 01199-R-19
Agencia financiadora	País de la agencia financiadora: Italia Alma Mater Studiorum Università di Bologna
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Lugar (obligatorio): Lugar (obligatorio): Laboratorio di Spettrometria di massa Proteomica. CENTRO RICERCA BIOMEDICA APPLICATA CRBA. Policlinico S.Orsola-Malpighi, Pad.20, 4°piano- Via Massarenti 9. 40138 - Bologna – ITALIA Coordenadas geográficas (obligatorio): 44.4915983, 11.3597292
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2014-2021
Disciplinas OCDE	http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA

Siendo las **11:00 hrs. del 29 de enero de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por el Dr. Eduardo Flores Juárez e integrado por los siguientes miembros: Dr. Mesías Moisés García Ortiz (asesor), Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes y Mg. Sixto Antonio González Elera; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: **"Modificaciones postraduccionales de albúmina sérica en pacientes alcohólicos como potencial pronóstico biomarcador mediante espectrometría de masas"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CELIA BERTHA VARGAS DE LA CRUZ.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología.** Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... EXCELENTE 20 .....

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **CELIA BERTHA VARGAS DE LA CRUZ,** el Grado Académico de Magíster en **Toxicología.**

Siendo las13:00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 13:00. hrs. del 29 de enero de 2021.

Dr. Eduardo Flores Juárez (P. P., T.C.)
Presidente

Dr. Mesías Moisés García Ortiz (P. P., T.C.)
Miembro - Asesor

Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes (P. P., T.C.)
Miembro

Mg. Sixto Antonio González Elera (P. Aux, T.P)
Miembro

Observaciones:
.....

ÍNDICE

RESUMEN i
ABSTRACT ii
ÍNDICE DE TABLAS 1
ÍNDICE DE FIGURAS 2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 4
1.1. Objetivo General 6
1.2. Objetivos Específicos 6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 7
2.1. Antecedentes 7
2.2. Aspectos teóricos 9
2.2.1. Albúmina de suero humano 9
2.2.2. Estructura de la albúmina sérica humana 10
2.2.3. Modificaciones estructurales de la albúmina de suero humano 11
2.2.4. Fisiología y metabolismo de HSA 13
2.2.6. Cirrosis hepática. 16
2.2.7. Enfermedad hepática alcohólica 17
2.2.8. Metabolismo del etanol 17
2.2.9. Estrés oxidativo y proteínas. 18
2.2.10. Glosario 18
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 20
3.1. Reactivos 20
3.2. Equipos 20
3.3. Pacientes 20
3.4. Análisis NanoHPLC-MS/MS de HSA 21
3.5. Purificación HSA HPLC-UV 22
3.6. Análisis MALDI-TOF de HSA purificada 23
3.7. HSA en solución de digestión 23
3.8. Análisis MALDI-TOF de digestión tríptica de HSA 23
3.9. Análisis NanoHPLC-ESI-Q-TOF de digestión tríptica de HSA 23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 25
4.1. Separación cromatográfica HSA de otras proteínas plasmáticas 26
4.2. Identificación de isoformas de HSA 28
4.3. Identificación de isoformas oxidadas por HSA 30

4.3.1. Purificación de HSA 30
4.3.2. Análisis MALDI-TOF de la HSA purificada 31
4.3.3. Digestión tríptica HSA y análisis MALDI-TOF 32
4.3.4. Oxidación de metionina 42
4.3.5. Oxidación de cisteína 43
4.4. Caracterización de HSA en una población de EHA 44
CAPÍTULO V. DISCUSIONES 46
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 51
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53
CAPÍTULO VIII. ANEXOS 61

RESUMEN

El presente trabajo fue investigar cómo una condición de estrés oxidativo puede afectar la estructura de la Albúmina de Suero Humano (HSA) y la identificación de modificaciones postraduccionales (MPTs) como potencial pronóstico biomarcador en una población de pacientes afectados por enfermedad hepática alcohólica (EHA). La metodología fue adaptada y modificada basándose en la separación mediante cromatografía líquida en fase inversa de albúmina de suero humano (HSA) de otras proteínas plasmáticas, seguida de la detección por espectrometría de masas para la identificación y cuantificación relativa de isoformas de HSA derivadas de varias modificaciones postraduccionales en pacientes sanos y con EHA. La purificación de proteínas fue mediante un enfoque cromatográfico, seguida de digestión tríptica y análisis de NanoHPLC-ESI-MS/MS, mostró que las nuevas MPTs son el producto de una oxidación marcada en residuos de cisteína y/o metionina, así como la glicosilación. La metodología optimizada se aplicó para un cribado preliminar de HSA derivadas del plasma de 10 pacientes alcohólicos con diagnóstico de cirrosis y de 10 voluntarios sanos. A partir de los datos obtenidos, se evidencia de inmediato un cambio drástico en la estructura de la HSA. En primer lugar, el porcentaje relativo de albúmina sérica nativa sin modificar se reduce drásticamente. Este efecto puede atribuirse a las condiciones de estrés oxidativo que conducen tanto a la formación de nuevos puentes disulfuro con residuos de cisteínas libres como a la oxidación de residuos de cisteína y metionina. Esta hipótesis está respaldada por el fuerte aumento de las isoformas cisteiniladas y oxidadas, que puede concluir en un potencial pronostico biomarcador.

Palabras clave: Suero de Albumina Humana, Modificaciones Postraduccionales, Biomarcador, Espectrometría de Masas.

ABSTRACT

The present work was to investigate how an oxidative stress condition can affect the structure of Human Serum Albumin (HSA) and the identification of Post-Translational Modifications (PTMs) as a potential prognostic biomarker in a population of patients affected by Alcoholic Liver Disease (ALD).The methodology was adapted and modified based on the reverse phase chromatography separation of HSA from other plasma proteins, followed by detection by mass spectrometry for the identification and relative quantification of HSA isoforms derived from various Post-translational modifications in patients. Purification of proteins was by means of a chromatographic approach, followed by tryptic digestion and HPLC-ESI-MS / MS analysis, it showed that the new PTMs are the product of a marked oxidation in cysteine and methionine residues, as well as glycosylation. The optimized methodology was applied for a preliminary screening of HSA derived from the plasma of 10 alcoholic patients with a diagnosis of cirrhosis and 10 healthy volunteers. From the data obtained, a drastic change in the structure of the HSA is immediately evidenced. First, the relative percentage of unmodified native serum albumin is drastically reduced. This effect can be attributed to oxidative stress conditions that lead both to the formation of new disulfide bridges with free cysteine residues and to the oxidation of cysteine and methionine residues. This hypothesis is supported by the strong increase in cysteinylated and oxidized isoforms.

Keywords: Human Albumin Serum, Post-Translational Modifications, Biomarker, Mass Spectrometry.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente de sistema de solventes NanoHPLC-DAD 21
Tabla 2. Gradiente de sistema de solventes HPLC-UV 22
Tabla 3. Valores relacionados con la masa molecular y la abundancia porcentual de las isoformas de HSA. 35
Tabla 4. Resultados de identificación de proteínas obtenidos después del envío de datos al servidor MASCOT. 36
Tabla 5. Lista de péptidos de HSA identificados obtenida para el sujeto de control (CTRL) de la base de datos MASCOT. 37
Tabla 6. Lista de péptidos identificados de HSA obtenida para EHA 1 de la base de datos de MASCOT 38
Tabla 7. Lista de peptidos de HSA identificados obtenida para EHA 2 de la base de datos MASCOT. 40
Tabla 8. Lista de péptidos de HSA identificados obtenida para EHA 3 de la base de datos MASCOT. 41
Tabla 9. Perfil de oxidación de Metionina 42
Tabla 10. Residuos de cisteína oxidada identificados en pacientes con EHA. La puntuación y el rango se refieren al péptido que contiene el residuo indicado. 43
Tabla 11. La abundancia relativa de isoformas para sujetos sanos como para pacientes con EHA. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de la separación de HSA de otras proteínas plasmáticas obtenidas por HPLC, con una columna C4 tradicional..... 27

Figura 2. Cromatograma de la separación de HSA de otras proteínas plasmáticas obtenidas por HPLC, con una columna monolítica CIMac C4 27

Figura 3. Espectros de masas con carga múltiple adquiridos en el pico eluyendo a los 6,3 min e identificados como HSA. 28

Figura 4. Espectro de masas deconvolucionado de HSA. 29

Figura 5. Las MPTs de HSA mediante NanoHPLC ESI-MS/MS (Q-ToF Micro, Micromass). (3a) Isoformas identificado en HSA de su forma nativa, (3b) Isoformas de HSA en pacientes alcoholicos. 30

Figura 6.Cromatograma de HSA purificado con la columna CIMac C4 mediante HPLC-UV 31

Figura 7. Espectro de HSA purificado mediante Espectrometría MALDI-TOF 32

Figura 8. Espectro que evidencia la ausencia de HSA mediante Espectrometría MALDI-TOF 33

Figura 9. Espectros de masas obtenidos mediante Espectrometría MALDI-TOF en a) plasma simplemente diluido con agua y b) plasma ultrafiltrado. 33

Figura 10. Secuencia de aminoácidos de HSA; Abajo: formación de puente disulfuro entre dos Cys 34 34

Figura 11. Espectro de masas deconvolucionado del análisis de plasma de un control sano (negro) en comparación con el de un paciente EHA (rojo). 36

Figura 12. (A) Espectro de masas por electropulverización de CBr1 de HSA normal. (B) Espectro de EM-MALDI del péptido CBr5 de HSA normal subdigerido con endoproteinasa Glu-C. 61

Figura 13. Análisis cromatográfico de HSA plasmática de (a) pacientes de control; (b) Pacientes cirróticos; (c) paciente con ACLF. 62

Figura 14. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra A. 62

Figura 15. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra B. 63

Figura 16. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra C. 63

Figura 17. Espectros deconvolucionados de HSA de A) sujetos sanos y B) preparación comercial. 64
Figura 18. Espectro de ESI-MS deconvolucionado de HSA por (a) pacientes con TC y (b) pacientes con HC. 65
Figura 19. Organización de dominio modular de HSA 66
Figura 20. Estructura 3D de la albúmina humana. 66
Figura 21. Diagrama representativo que muestra los principales dominios de unión de la molécula y sus funciones. 67
Figura 22. Propiedades antioxidantes y pro-oxidantes de la albúmina. 68
Figura 23. Principales modificaciones oxidativas del tiol de la albúmina Cys34.. 68
Figura 24. Fases hepáticas durante el consumo crónico de alcohol.. 69
Figura 25. Metabolismo del etanol y lesión celular. 69

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La Albúmina de Suero Humano (HSA) es una de las proteínas humanas más estudiadas, sin embargo sus diferentes y múltiples funciones han atraído y siguen atrayendo el interés de los investigadores. En individuos sanos, la HSA es la proteína plasmática más abundante con valores normales de aproximadamente 40 a 55g/L, por lo que representa el 50 a 60% de la proteína sérica. Una alta concentración intravascular y su fuerte carga negativa implican que la HSA juega un papel principal en la modulación de la distribución de líquidos entre los compartimentos corporales. Además de su capacidad oncótica, la HSA presenta otras propiedades biológicas, como actividades antioxidantes y depuradoras, unión y transporte de muchas sustancias endógenas y exógenas y regulación de la función endotelial.[1] Clínicamente, la albúmina se ha empleado como expansor del plasma en diferentes campos clínicos. La HSA es una macromolécula monomérica de múltiples dominios que consta de 585 aminoácidos, con una masa molecular basada en una secuencia de aminoácidos de 66,438 Da. La HSA contiene 35 residuos de cisteína (Cys) que forman 17 puentes disulfuro, con el único residuo Cys libre ubicado en la posición 34. Los puentes disulfuro contribuyen significativamente a la estabilidad de la HSA.[2] El residuo Cys34 está altamente conservado en los mamíferos y representa la fracción más grande de tiol libre en el plasma humano y es la única cisteína libre de la molécula HSA. Se caracteriza por una fuerte nucleófilia y, debido a la alta concentración plasmática de HSA y su semivida relativamente larga, representa el eliminador más importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el compartimento extracelular.[3,4] En adultos sanos, la HSA se considera un biomarcador valioso en muchas enfermedades, como el cáncer, la artritis reumatoide, la isquemia, la obesidad posmenopáusica y enfermedades que necesitan un seguimiento del control glucémico. Además, la HSA de grado farmacéutico se usa ampliamente en entornos clínicos para el tratamiento de varias enfermedades, que incluyen hipovolemia, shock, quemaduras, pérdida de sangre quirúrgica, trauma, hemorragia, derivación cardiopulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, hemodiálisis, insuficiencia hepática aguda, enfermedad hepática crónica, soporte nutricional, reanimación e hipoalbuminemia.[5] Por tanto, estudios recientes han demostrado que durante la cirrosis hepática, la HSA presenta modificaciones postraduccionales (MPTs) extensos que afectan sus propiedades. Estas modificaciones incluyen cisteinilación de Cys34, truncamiento de la porción N-terminal,

glicosilación y nitrosilación. De hecho, en los pacientes cirróticos, la HSA se encuentra en un entorno estresante caracterizado por una concentración sérica elevada de ROS (observado con frecuencia en pacientes cirróticos), hiperglucemia (un tercio de los pacientes cirróticos también son diabéticos) y un estado proinflamatorio.[6] De hecho, recientemente se había informado que, durante la cirrosis, una condición en la que el estrés oxidativo juega un papel principal, la proporción de la isoforma HSA nativa inalterada era realmente menor que la concentración absoluta de albúmina; esto se debe a los extensos cambios estructurales que se producen en la molécula y que conducen a varias isoformas de HSA.

Estas isoformas de HSA provienen de estas modificaciones que podrían representar biomarcadores prometedores para la enfermedad hepática. Por ello, este trabajo se ha centrado en la caracterización de estas modificaciones (MPTs), como mercaptoalbúmina (HMA) con Cys34 libre, no mercaptoalbúmina1 (HNA1) con cisteína, homocisteína o glutatión unido a Cys34 por un enlace disulfuro y no mercaptoalbúmina2 (HNA2) con Cys34 oxidada a ácido sulfinico o sulfónico que se fraccionaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).[7]

Los objetivos del presente trabajo fueron: aplicar y evaluar un valioso enfoque analítico basado en cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem (nanoHPLC-MS/MS) y desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para la detección y cuantificación relativa de albúmina, isoformas y MPTs en muestras de plasma de pacientes con alcoholismo cirrótico. La separación de HSA de las otras proteínas plasmáticas se obtuvo mediante cromatografía líquida de fase inversa. El espectro de masas de carga múltiple que se obtuvo mediante deconvolución pudo rastrearse hasta el peso molecular de la proteína intacta. En el caso de las HSA no se obtuvo un solo peso molecular sino una serie de señales que corresponden a las distintas isoformas. La determinación de MPTs se obtuvo mediante digestión enzimática con tripsina, luego se realizaron análisis de masa de los péptidos obtenidos. Con el fin de evaluar el potencial de las isoformas y MPTs como biomarcador innovador en caso de enfermedades hepáticas alcohólicas, se ha utilizado el método descrito para realizar un cribado del plasma de una población de pacientes con alcoholismo cirrótico.

1.1. Objetivo General

Caracterizar las modificaciones postraduccionales en albúmina sérica de pacientes alcohólicos como potencial pronóstico biomarcador mediante espectrometría de masas.

1.2. Objetivos Específicos

(1) Determinar la albúmina de suero humano mediante HPLC-UV y colectar la albúmina de suero humano (HSA) purificado.

(2) Determinar la albúmina de suero humano (HSA) purificado mediante HPLC-ESI-micro TOF-MS/MS.

(3) Caracterizar la modificación estructural que afecta a la HSA con HPLC-ESI-MS/MS y MALDI-TOF para obtener información sobre el aminoácido específico involucrado en la modificación postraduccional.

(4) Evaluar las condiciones de estrés oxidativo pueden afectar la estructura de la HSA en la enfermedad hepática alcohólica.

(5) Analizar una población de pacientes afectados por enfermedad hepática alcohólica para evaluar e identificar las modificaciones postraduccionales (MPTs) de HSA.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Como se informó anteriormente, la aparición de modificaciones postraduccionales (MPTs), como resultado de la oxidación, glicosilación y truncamiento que involucran a Cys34 y otros sitios moleculares, contribuye a la microheterogeneidad de la HSA circulante. Los MPTs representan el principal contaminante en las preparaciones farmacéuticas de HSA.[1]

Hoy en día, las proteínas utilizadas para tratamientos terapéuticos se obtienen a partir de la purificación de plasma humano. Es probable que este proceso sea la causa de las modificaciones estructurales de la HSA. Además, la HSA y MPTs a menudo se asocian con enfermedades como la cirrosis hepática. Muchos trabajos se han dirigido a la caracterización de las isoformas de HSA.[2,8]

Durante las últimas décadas, las técnicas de espectrometría de masas y proteómica han contribuido en gran medida al desarrollo de métodos analíticos sensibles y específicos dedicados a la cuantificación de MPTs en fluidos biológicos con un enfoque tanto de downstream como de upstream.[9,10]

El primer estudio dirigido a la caracterización de variantes de HSA fue propuesto por Amoresano et al.[11] Se desarrolló un procedimiento de HPLC para aislar todos los fragmentos generados por la hidrólisis química con bromuro cianógeno (CNBr) de HSA en un único análisis cromatográfico. Las masas moleculares de los péptidos CNBr se determinaron con precisión mediante ESI-MS (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y electrosprays) y la secuencia de proteínas que porta la anomalía estructural se identificó por su valor de masa. A continuación, los péptidos de CNBr se digirieron con tripsina o endoproteinasa Asp-N y las mezclas de péptidos resultantes se analizaron directamente mediante técnicas de espectrometría de masas con bombardeo rápido de átomos (FABMS) o espectrometría de masas por desorción láser asistida por matriz (MALDI). El análisis sugiere que la cisteinilación de la proteína estaba al nivel de Cys34. Figura 12 (anexo).

Otro estudio fue realizado por Oettl et al.[12] El objetivo del estudio fue investigar la correlación entre la modificación oxidativa de la HSA y sus propiedades fisiológicas en pacientes con enfermedad hepática avanzada. El estudio se realizó en plasma de pacientes con cirrosis hepática, insuficiencia hepática aguda sobre crónica (ACLF) y voluntarios controles sanos. Se separaron tres fracciones de albúmina mediante HPLC-IA

(cromatografía de intercambio aniónico) según el estado redox de la Cys34 y se detectaron mediante detectores de fluorescencia y UV. Los grupos carbonilo se midieron mediante transferencia de Western como marcador de modificación oxidativa en proteínas plasmáticas y en HSA. Las propiedades de fluorescencia de la albúmina se alteraron por oxidación.[13,14] Como se puede ver en la Figura 13 (anexo), por la relación fluorescencia/absorción UV, la intensidad de la fluorescencia disminuye significativamente para los pacientes cirróticos y para los que padecen ACLF. Por tanto, se encontró que el aumento de la modificación oxidativa en HSA, indicado por un mayor contenido de grupos carbonilo y oxidación de Cys34, era proporcional a la gravedad de la enfermedad hepática.[13,14]

En el estudio de Kleinová et al.[15] se propuso una metodología para la investigación de la microheterogeneidad de tres preparaciones farmacéuticas de HSA obtenidas de diferentes fabricantes. Las microheterogeneidades de HSA de tres muestras (A, B y C) derivadas de plasma humano (grado farmacéutico, HSA), obtenidas de diferentes fuentes comerciales, se investigaron mediante análisis TI-MS (espectrómetro de masas con trampa de iones). Las proteínas intactas junto con los péptidos trípticos se sometieron a caracterización espectrométrica de masas. Las muestras de proteína intacta se analizaron sin ningún paso de separación excepto por una simple desalación. Como estos se pueden ver en las Figuras 14, 15 y 16 (anexo) de los espectros de masas ESI (Ionización electrospray) desconvolucionados, la forma no modificada de HSA se detectó en las tres preparaciones de HSA a valores m/z ligeramente diferentes (66448 ± 3,6, 66450 ± 0,6 y 66451 ± 3,2 para [MH]+). El segundo compuesto presente con alta intensidad se interpretó como derivado de un residuo de cisteína unido covalentemente. En las tres muestras se encontró un pico adicional en los espectros ESI deconvolucionados e interpretado como la forma glicada de la proteína. La verificación de las modificaciones de HSA covalentes propuestas se realizó posteriormente a nivel de péptido usando enfoques HPLC-ESI-MS y HPLC-ESI-MS/MS. Antes de la digestión tríptica, las muestras de HSA se alquilaron sin una etapa de reducción previa. Siguiendo este procedimiento, los péptidos, se incluyó el residuo Cys34 en ambas formas: cisteinilado (m/z 639.15 [M+ 4H] 4+) así como vinilpiridina-alquilado (m/z 635.69 [M+ 4H] 4+). Finalmente, se realizaron experimentos HPLC-ESI-CID-MS/MS de baja energía para confirmar estas dos estructuras propuestas.

Mayimura et al.[16] realizó una investigación más detallada sobre las HSA- MPTs. Se analizó la HSA intacta de seis preparaciones comerciales para uso clínico con un enfoque HPLC-MS y se identificaron y cuantificaron relativamente sus principales isoformas de HSA (cisteinilada, nitrosilada, glicada y truncada). Figura 17 (anexo).

Recientemente, la caracterización de las isoformas de albúmina plasmática fue realizada por Naldi et al.[17] El objetivo de ese estudio fue desarrollar un método analítico relativamente rápido para el cribado del plasma de los pacientes para la identificación y cuantificación de los MPTs que se producen en la HSA circulante. Al ser un análisis de proteínas intactas, el método no requirió una digestión enzimática que consumiera mucho tiempo. El método describió el aislamiento de HSA de otras proteínas plasmáticas mediante un enfoque de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). La HSA eluída de la columna se detectó con un enfoque de espectrometría de masas de ionización por nano electropulverización utilizando un analizador de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo. En particular, las isoformas de HSA se identificaron y cuantificaron a partir de su masa e intensidad en el espectro de masas ESI deconvolucionado, obtenido mediante un algoritmo del espectro de carga múltiple de HSA adquirido en el ápice del pico cromatográfico. El método resultó robusto con una preparación de muestras simple y rápida; además, la metodología fue validada en términos de reproducibilidad intradiaria e interdiaria, tanto para los resultados cuantitativos como para la determinación del peso molecular de los MPTs. El método validado se aplicó a la caracterización de isoformas de MPTs después de su aislamiento a partir del plasma tanto de un voluntario no cirrótico (CT) como de un paciente cirrótico (CH) y resultó efectivo para revelar cambios en la abundancia relativa de isoformas de HSA y, por lo tanto , podría utilizarse para el cribado sistemático de pacientes cirróticos para la identificación de nuevos biomarcadores prometedores de enfermedades hepáticas. El método realizado proporcionó mucha más información en comparación con la medición del contenido total en plasma de HSA que se utiliza hoy en día para definir de forma rutinaria la hipoalbuminemia. Figura 18 (anexo)

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. Albúmina de suero humano

La HSA es la proteína circulante más abundante y representa el principal determinante de la presión oncótica plasmática. Además de la conocida capacidad de actuar como

expansor del plasma, la HSA tiene muchas otras propiedades, incluida la unión y el transporte de muchas sustancias endógenas y exógenas, función antioxidante, inmunomodulación, actividad antiinflamatoria y estabilización endotelial.[18,19] En el campo clínico, la HSA se usa ampliamente para tratar lesiones graves por quemaduras, choque hemorrágico, hipoproteinemia, eritroblastosis fetal y ascitis causada por cirrosis hepática. Además, la HSA representa un valioso biomarcador de muchas enfermedades, incluido el cáncer, la isquemia, la enfermedad injerto contra huésped aguda grave y enfermedades que necesitan un seguimiento del control glucémico.[20,21]

2.2.2. Estructura de la albúmina sérica humana

La proteína plasmática madura de HSA está constituida por una cadena simple de 585 residuos, correspondiente a un peso molecular de 66 438 Da. Durante su larga vida, la HSA puede sufrir varias modificaciones estructurales que afectan sus propiedades antioxidantes y de unión al ligando.[1,22]

La HSA contiene un único residuo de Trp en la posición 214; La abundancia de Met, Gly e Ile es baja, mientras que los altos niveles de Cys, Leu, Glu y Lys caracterizan la secuencia. El gran número de residuos ionizados le da a HSA una alta carga total (es decir, 215 iones por molécula a pH 7,0), lo que contribuye a su solubilidad. Los residuos de aminoácidos ácidos son más abundantes que los básicos en HSA, lo que da como resultado una carga negativa por molécula de aproximadamente -15, a pH 7,0; La HSA contiene 35 residuos de Cys que forman 17 puentes disulfuro, con el único residuo Cys libre ubicado en la posición 34. Los puentes disulfuro contribuyen significativamente a la estabilidad de la proteína y dejan en claro su larga vida biológica.[6,23,24]

El 68% de α-helices dominan su estructura secundaria. La HSA se caracteriza por una conformación globular en forma de corazón, que contiene tres dominios homólogos indicados convencionalmente como I (1–195), II (196–383) y III (384–585).Figura 19 (anexo). La secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria y terciaria son similares a lo largo de los tres dominios.[5]

Cada dominio, Figura 20 (anexo) incluye diez hélices empaquetadas en dos subdominios separados denominados A y B, Figura 21 (anexo). Como consecuencia del alto número de residuos ácidos y básicos, la estructura de la HSA puede experimentar transiciones conformacionales reversibles a diferentes valores de pH: a pH menor que 2.7, la HSA presenta una conformación extendida (E); a pH 2.7-4.3, HSA asume la forma de migración rápida (F), con aumento de viscosidad, menor solubilidad y pérdida de hélice

a si se compara a condiciones fisiológicas. Entre pH 4.3 y 8.0, la HSA se caracteriza por la estructura en forma de corazón (forma N). A pH mayor que 8.0, la HSA cambia su conformación a la forma básica (B) caracterizada por la pérdida de α-hélice y una mayor afinidad por algunos ligandos con respecto a la forma N.[7,25,26]

En general, la arquitectura de la albúmina se puede resumir en tres características principales, Figura 22 (anexo)

- La cisteína 34 que expone el grupo tiol, SH, definido como principal acción antioxidante de la HSA.
- Los dominios I y II que son el sitio de unión y tantas moléculas transportan ambos choques exógenos endógenos.
- Alto grado de ionización de la molécula que porta una alta solubilidad

2.2.3. Modificaciones estructurales de la albúmina de suero humano

La HSA puede sufrir varias modificaciones estructurales que alteren sus propiedades no oncóticas.

Cisteinilación, homocisteinilación y glutationilación

La Cys34 representa la mayor fracción de tiol libre en plasma humano; se encuentra en la superficie de ASH, junto a Asp38, His39 y Tyr84. Estos tres residuos afectan su estado de ionización modulando su reactividad.[27]En adultos sanos, alrededor del 70 al 80% de las moléculas de HSA tienen el residuo Cys34 con el grupo sulfhidrilo libre, mientras que alrededor del 25 al 30% de las moléculas de albúmina tienen Cys34 formando un disulfuro mixto con cisteína, homocisteína o glutatión. Estas modificaciones afectan el potencial redox de Cys34.[27–29]

La Cys34 actúa como un antioxidante fisiológico, participando en la captación de radicales (p. Ej., NO) y como un sitio de unión para una amplia variedad de ligandos endógenos (p. Ej., NO), iones metálicos y fármacos. Las modificaciones de Cys34 influyen en la reactividad de HSA; de hecho, la unión de Cys34 con cisteína induce la rápida N-homocisteinilación de Lys525. La oxidación de Cys34 conduce a la formación de ácido sulfénico, que puede oxidarse aún más a ácido sulfínico o sulfónico. Sorprendentemente, el ácido sulfénico desempeña un papel fundamental en la modulación redox reversible e irreversible de las acciones de las proteínas por parte de las especies reactivas. Además, el ácido sulfénico en HSA participó recientemente en la formación de disulfuro mixto, lo que respalda el papel de HSA como un importante regulador redox en los compartimentos extracelulares.[28,30–32]

Glicosilación y glicación

La HSA es una de las pocas no glucoproteínas plasmáticas; a la HSA le falta la secuencia (Asn-X-Ser/Thr) necesaria para la N-glicosilación. Sin embargo, la HSA puede estar sujeta a la reacción no enzimática de un monosacárido, conocida como glicación. Esta modificación se produce, de forma reversible, mediante la reacción de base de Schiff del grupo carbonilo del azúcar con los grupos amino de HSA. Los Arg410 y Lys525 son los principales sitios de glicación de HSA. Otros sitios de modificaciones menores son Arg114, Lys186, Lys199, Arg218, Lys281, Arg428 y Lys439.[33,34]

La glicación de HSA se asocia normalmente con la oxidación de los residuos de His y Trp, la fragmentación de la cadena principal y la pérdida de la estructura secundaria y terciaria. La glicación de HSA puede alterar la unión de los sitios I y II de ligandos endógenos y exógenos, y la interacción con ácidos grasos (AF).[3]La concentración de HSA glucosilada en seres humanos normales es de alrededor de 10%, pero aumenta a 20 a 30% en pacientes hiperglucémicos.[35]

Oxidación de la albúmina sérica humana

Se da la oxidación de Cys y Met y el residuo Cys34 en el dominio I de HSA constituye la mayor porción de tiol libre en sangre. También se ha informado que los residuos de metionina HSA (Met87, Met123, Met298, Met329, Met446 y Met548) actúan como agentes antioxidantes. De hecho, los residuos de Met y Cys representan entre el 40% y el 80% de la actividad antioxidante total HSA.[34,36] Si bien se informa que Cys34 funciona como un eliminador de radicales libres, los residuos de Met actúan principalmente como un quelante de metales. El principal cambio estructural en la albúmina oxidada en el plasma sano es una Cys unida por enlaces disulfuro en el tiol de Cys34.[34,37]

La oxidación de las cadenas laterales de Met conduce al derivado de sulfóxido, mientras que la oxidación de Met-sulfóxido a Met-sulfona rara vez ocurre en sistemas biológicos. El Met-sulfóxido se puede revertir a Met en condiciones reductoras leves o mediante Met-sulfóxido reductasas, mientras que la formación de Met-sulfona es biológicamente irreversible. Se ha planteado la hipótesis de que la oxidación y la reducción de residuos de Met sirven como un sistema de captación de ROS para proteger las proteínas de modificaciones importantes. [38]

Nitrosilación.

La HSA actúa como un depósito de óxido nítrico (NO) y un transductor de NO. El 82% del NO en sangre se transporta como un S-nitrosotiol unido al residuo Cys34 de HSA. Además, la podría unir NO en los residuos de Trp y Tyr.(25,8) La ASH puede representar

un reservorio circulante de NO y puede actuar como donante de NO en aplicaciones terapéuticas. Sorprendentemente, la nitrosilación de Cys34 S se deriva de la formación y disociación de enlaces de hidrógeno con residuos de Asp38, His39 y Tyr84. En condiciones fisiológicas y patológicas también son frecuentes las modificaciones del residuo Trp por RNS\1. El Trp libre se puede modificar a 1-N-nitrosotriptófano y a varios productos oxidados por reacción con varios RNS. El 1-N-nitrosotriptófano y el 6-nitrotriptófano son los productos más abundantes derivados de la reacción con peroxinitrito.[39,40]

Acetilación.
La HSA puede acetilarse en el N-terminal. Esta modificación se encuentra comúnmente al nivel de los grupos amino de los residuos aminoacídicos de lisina y arginina que provocan un desplazamiento de masa de 42Da en el aminoácido modificado. La formilación es una modificación similar (desplazamiento de masa de 28 Da) común en el caso de proteínas bacterianas.[27]

Carbonilación
En condiciones de oxidación catalizada por metales, los únicos residuos modificados son Lys97 y Lys186. Se han observado niveles elevados de proteínas plasmáticas carboniladas en fumadores, siendo la HSA la principal proteína carbonilada en el líquido de lavado broncoalveolar de los fumadores.[28]

Fosforilación.
La fosforilación de HSA no ocurre *in vivo*.[27]

Biotinilación.
La biotinilación de HSA no ocurre *in vivo*. La albúmina de suero bovino (BSA) biotinilada demostró unirse a diferentes subconjuntos vasculares en diferentes tejidos y órganos linfoides. El uso de BSA biotinilado puede ofrecer una sonda confiable para la identificación histológica de endotelios microvasculares seleccionados en tejidos linfoides.[36]

Homocisteinilación.
La HSA puede estar sujeta a N-homocisteinilación no enzimática al nivel de diferentes residuos de Lys; la HSA homocisteinilada representa 0.26–0.36% de HSA en sujetos sanos y aumenta en condiciones patológicas.[41]

2.2.4. Fisiología y metabolismo de HSA

La HSA se sintetizan de 9-12 g/día en los hepatocitos del hígado. La síntesis y secreción de proteínas es bastante rápida, (30 minutos), y desde el espacio intravascular pasa al

líquido intersticial con una concentración igual a 7 g/h. La distribución de proteínas en el cuerpo es variable dependiendo de las diferentes regiones anatómicas y está regulada por el proceso de filtración: en las regiones donde el endotelio vascular se caracteriza por poros grandes, el transporte de albúmina es pasivo, mientras que, donde no hay aberturas en la filtración, el proceso se vuelve activo bajo el control de receptores específicos (por ejemplo, albondina).[42] Este receptor está presente en algunos compartimentos anatómicos como el sistema nervioso central; como resultado, la albúmina está presente en el líquido cefalorraquídeo. También existe un segundo grupo de receptores expresados en diferentes tejidos que regula la degradación de proteínas. El paso del espacio intravascular entre la albúmina y el líquido intersticial es un proceso continuo, facilitado por el sistema de drenaje linfático que lleva la proteína al torrente sanguíneo.[43]Cuando es necesario, el hígado puede incluso triplicar la producción de HSA. El valor de la presión osmótica coloidal y la osmolalidad del líquido intersticial que rodea a los hepatocitos que regulan la biosíntesis de HSA. Además, la síntesis y degradación están reguladas por otros mecanismos; Las sustancias a nivel hormonal como la insulina, el glucagón y las hormonas tiroideas mantienen los niveles de HSA alrededor de los valores normales.[10,22] Durante las reacciones de fase aguda, la expresión del ARNm hepático que transcribe para albúmina disminuye significativamente. Finalmente, los niveles de síntesis de proteínas pueden verse limitados por una deficiencia de aminoácidos en el cuerpo. El catabolismo de la HSA ocurre a nivel de músculos, endotelio vascular, epidermis, y la cantidad de proteína que se metaboliza diariamente es proporcional a su concentración. Algunas condiciones, como por ejemplo traumatismos y lesiones, reduce drásticamente el nivel plasmático de albúmina. La vida media circulatoria de la HSA 14/20 días.[4]

2.2.5. Propiedades biológicas de HSA

Propiedades oncóticas

La función principal de HSA es la regulación de la presión osmótica. Gracias a su alta concentración plasmática y alto peso molecular, la HSA es responsable de aproximadamente el 80% de la presión oncótica y, por tanto, del volumen intravascular. En consecuencia, los cambios en la presión oncótica son los principales factores responsables de la estimulación de la síntesis de HSA.[1] El gradiente de presión osmótica coloide a través de la membrana capilar es de mayor importancia para determinar el desplazamiento de líquido hacia el intersticio, en lugar del valor plasmático absoluto. Por

lo tanto, La carga negativa de HSA facilita la atracción de moléculas de sodio y, en segundo lugar, agua.[27]

Propiedades antioxidantes

Como se informó anteriormente, la HSA es la principal fuente extracelular de grupos sulfhidrilo reducidos, que pueden actuar como captadores de ROS y RNS y contribuir a convertir la proteína en el principal antioxidante plasmático.[5] La HSA también puede limitar la producción de ROS y RNS uniendo Cu (II) libre, un metal involucrado en su producción. La HSA parece actuar como donante de grupos tiol. Se podrían mencionar otros sitios de unión por su participación en las propiedades antioxidantes de la HSA.[32]Los residuos de Met más expuestos son particularmente susceptibles a la oxidación y podrían proteger a las proteínas de alteraciones extensas que eliminan las ROS. En condiciones de estrés oxidativo, las propiedades de la HSA se alteran, de hecho, la proteína se vuelve más susceptible a la digestión de la tripsina y a una degradación más rápida.[44]

En este sentido, se puede considerar que el aumento de isoformas oxidadas de la albúmina en condiciones patológicas constituye una prueba del concepto de su actividad depuradora. En el plasma de adultos jóvenes sanos, entre el 70% y el 80% del total de HSA contiene el grupo sulfhidrilo libre de Cys34. Aproximadamente entre el 20% y el 30% de la Cys34 forma un disulfuro mixto reversible con tioles de bajo peso molecular, como cisteína, homocisteína, cisteinilglicina o glutatión, que generan albúmina S-tiolada (no mercaptalbúmina1 humana [HNA-1]), siendo la modificación predominante la albúmina S-cisteinilada (HSA-Cys). Una pequeña fracción de Cys34 (2–5%) se oxida a la forma sulfínica (HSA-SO2H) o ácido sulfónico (HSA-SO3H), que también se denominan no mercaptalbúmina 2 humana (HNA-2) y pueden causar una pérdida de función proteica Figura 21 (anexo). La forma de ácido sulfénico (HSA-SOH) es un intermedio central en la formación de especies de albúmina oxidadas y aumenta en condiciones patológicas. La HSA-SOH a menudo se incluye dentro de la fracción HNA-2, Figura 23 (anexo).[5,7,34,45]Si bien los estudios *in vitro* han respaldado durante mucho tiempo el papel antioxidante de la HSA en el plasma, solo recientemente se han informado pruebas de que la oxidación de la albúmina también tiene lugar *in vivo*.[26]

Quelacion y Transporte

La peculiar estructura terciaria y la flexibilidad permiten que la HSA se una y transporte varias moléculas, incluidos fármacos y metabolitos (bilirrubina, ácidos biliares, hormonas, metales, aniones, ácidos grasos de cadena larga, etc.). La HSA es capaz de unir una gama extraordinariamente diversa de moléculas gracias a su carga negativa que facilita la unión electrostática de muchas sustancias. además, la HSA participa en la farmacocinética de muchos fármacos. Hasta ahora, no se ha informado de evidencia de la presencia de ningún receptor de HSA para el mecanismo de administración.[12]

Otras propiedades biológicas.

La HSA influye en la unión de la permeabilidad de la membrana dentro del subendotelio y la matriz intersticial y alterando la permeabilidad de estas capas. Todavía se está investigando la función anticoagulante y antitrombótica de la HSA, que puede estar mediada en parte por la capacidad de la HSA de unirse al NO formando S-nitrosotioles, inhibiendo así la inactivación rápida del NO y permitiendo la prolongación de sus efectos antiagregantes. La HSA también puede regular las propiedades hemodinámicas de la circulación cerebral, así como las acciones neuroprotectoras directas sobre las células neuronales y gliales.[46,47]

Inmunomodulación.

Los estudios *in vitro* mostraron que la actividad de las endotoxinas disminuye en presencia de concentraciones fisiológicas de HSA. En los pacientes cirróticos con hepatitis alcohólica aguda, la disfunción de los neutrófilos se asoció con un mayor riesgo de infección, insuficiencia orgánica y mortalidad. Los estudios *in vitro* sugirieron que esto podría prevenirse con albúmina. Finalmente, se informa que la HSA tiene efectos hemostáticos al unirse al óxido nítrico (NO) en la posición Cys34.[31,37]

2.2.6. Cirrosis hepática.

La cirrosis representa una causa creciente de morbilidad y mortalidad en varios países en desarrollado; de hecho, es la decimocuarta causa de muerte más común en todo el mundo. El nuevo concepto debería ser la prevención y la intervención temprana para estabilizar la progresión de la cirrosis y evitar o retrasar la descompensación clínica y la necesidad de trasplante. Las complicaciones cirróticas son numerosas y, en consecuencia, dificultan la comprensión del proceso patológico y la adecuada estratificación del riesgo. Recientemente se informó que, durante la enfermedad hepática, la estructura de la HSA se modifica en gran medida por la alteración postraduccional que afecta sus funciones no oncóticas.[48]

2.2.7. Enfermedad hepática alcohólica

El alcohol es la sustancia adictiva más aceptada socialmente en todo el mundo; el exceso en su consumo es un sello distintivo de las reuniones sociales que conduce a graves problemas de salud y económicos. El consumo crónico o excesivo de alcohol puede constituir un riesgo para la salud física y mental y puede dañar diferentes órganos (cerebro, hígado, corazón, pulmones, musculatura esquelética y huesos).[2,8]El hígado es el sitio principal del metabolismo del etanol y el principal órgano de los daños inducidos por el alcohol. La alta susceptibilidad del hígado a la toxicidad del alcohol se debe a las altas concentraciones de alcohol en la sangre portal y a los productos metabólicos del metabolismo del etanol.[49] La EHA evoluciona a través de la esteatosis, también conocida como hígado graso, esteatohepatitis y, finalmente, fibrosis y cirrosis Figura 24 (anexo). El papel del estrés oxidativo en casi todas las condiciones clínicas y experimentales de la enfermedad hepática crónica ha sido demostrado por varias evidencias.

2.2.8. Metabolismo del etanol

El etanol es una molécula pequeña y puede difundirse fácilmente a través de las membranas celulares. La absorción y el metabolismo del etanol dependen de diferentes factores, incluidos el sexo, la edad, la etnia y el peso corporal. Una pequeña cantidad de etanol en forma inalterada se elimina directamente por los pulmones, los riñones y el sudor.[44,49]

El principal producto metabólico del metabolismo del etanol es el acetaldehído producido por la enzima alcohol deshidrogenasa. Una segunda oxidación a acetato es catalizada por la acetaldehído deshidrogenasa. Como alcohol deshidrogenasa, la aldehído deshidrogenasa se expresa principalmente en los hepatocitos y la mayor parte de la toxicidad celular directa del etanol afecta a estas células. De hecho, el metabolismo del etanol conduce a la acumulación de ROS, principalmente peróxido de hidrógeno y anión superóxido. Este mecanismo se ve agravado por la hipoxia, la translocación bacteriana y la liberación de citocinas proinflamatorias. [9]

Las ROS se unen rápidamente a los átomos de etanol o hierro para formar metabolitos reactivos como el radical hidroxilo, el óxido ferroso o el radical hidroxietilo, responsables de la peroxidación lipídica de las membranas celulares.[44,49]

El metabolismo del etanol y las ROS conducen a la muerte celular; Se informó evidencia de apoptosis y necrosis en HSA.[8]La exposición crónica al etanol también induce el

agotamiento del glutatión, lo que da como resultado un aumento de la sensibilidad de los hepatocitos al estrés oxidativo. El glutatión reducido, de hecho, actúa como protector de las células contra las ROS, Figura 25 (anexo).[45]

2.2.9. Estrés oxidativo y proteínas.

Las modificaciones oxidativas en las proteínas provocan alteraciones en su estructura y funciones. El resultado final de tales daños es la proteólisis. Existen diferentes niveles de daño inducido por ROS sobre las proteínas.[27] En una primera etapa la proteína y sus propiedades resultan ligeramente modificadas. En una segunda etapa, se induce un despliegue parcial de la proteína. En la tercera etapa, si la proteína dañada no ha sido identificada y degradada en proteasomas, puede formar un agregado con otras moléculas como proteínas, lípidos y azúcares.[9,50,51]

2.2.10. Glosario

HSA : Albúmina de suero Humano

BSA: Albumina de suero bovino

MPTs : Modificaciones Postraduccionales

EHA: Enfermedad Hepática Alcohólica

HPLC-ESI-MS/MS : Cromatografía de alta resolución con ionización electrospray masas tandem

CTRL: Control

CT: Paciente no cirrótico

CH: Paciente cirrótico

MALDI-TOF-MS: espectrómetro de masa con desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo

HPLC-UV: cromatografía líquida alta resolución con detector UV

ROS: especies reactivas de oxigeno

HMA: Mercaptoalbumina

HMA1: No mercaptoalhumina 1

HMA2: mercaptolabumina 2

HPLC: cromatografía liquida de alta resolución

HPLC-MS: cromatografía líquida alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem

HPLC-ESI-micro TOF-MS/MS: Cromatografía de alta resolución con ionización electrospray micro Tiempo de vuelo masas tandem.

ESI-MS/MS : espectrómetro de masas de triple cuádruplo y electrosprays

CNBr: bromuro de cianógeno, producto de péptidos de proteínas

FABMS : espectrometría de masas con bombardeo rápido de átomos

ACLF : insuficiencia hepática aguda sobre crónica

HPLC-IA: cromatografía de intercambio aniónico

TI-MS: espectrómetro de masas con trampa de iones

ESI: Ionización electrospray

HPLC-ESI-CID-MS/MS: Cromatografía de alta resolución con ionización electrospray y disociación inducida de colisión acoplado a un espectrómetro de masas tandem

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

SH: Sulfhidrilo

NO: Óxido nítrico

ROS: Especies reactivas de oxigeno

RNS: especies reactiva de nitrógeno

AF; Ácido graso

AcCN: Acetonitrilo

FA: Acido Fórmico

SA: ácido sinapinico

CHCA: ácido α-ciano-4-hidroxicinámico

DTT: ditiotreitol

TFA: ácido trifluoroacetico

CIMac C4: columna monolítica de 4 carbonos para biomoléculas

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Reactivos

Albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero bovino (BSA), acetonitrilo (AcCN), ácido fórmico (FA), ácido sinapínico (SA), ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), bicarbonato de amonio, ditiotreitol (DTT), yodoacetamida y la tripsina fue proporcionada por Sigma-Aldrich (Milán, Italia). Se usó agua purificada del sistema Milli-RX (Millipore, Milford, MA, EE. UU.) Para preparar tampones y soluciones estándar. Todos los disolventes utilizados para la preparación de las fases móviles se han filtrado a través de membranas de porosidad de 0,22 µm.

3.2.Equipos

Nano cromatógrafo liquido con detector DAD Agilent 1200 (Walbronn, Alemania), cromatógrafo de líquidos Jasco PU-1585 (Jasco Corporation, Tokio, Japón), columna monolítica CIMac C4 Analytical (5,3 mm DI X 5 mm), Cromatógrafo liquido acoplado a Quadrupole-Time of Flight (Q-ToF Micro, Micromass, Manchester, Reino Unido) con una fuente de iones de electropulverización en Z (ESI), columna C18 (Jupiter Phenomenex 5 µm, 300Å, 4,6 mm × 150 mm de DI), cartucho de protección C18 (Phenomenex, 4,0 mm × 3,0 mm de DI), espectrómetro de masas MALDI-TOF-MS se usó un Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.3.Pacientes

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 10 pacientes con EHA inscritos en nuestra Unidad de Hepatología, del Hospital de la Universidad de Bologna-Italia, lugar donde se realizó el presente estudio. También se inscribieron 10 voluntarios sanos como población de referencia

En el momento de la inclusión en el estudio, se extrajeron 9 ml de sangre periférica de la vena braquial y se recogieron en un tubo estéril que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); las muestras se centrifugaron luego a 3000 rpm durante 10 min para obtener muestras de plasma. Se obtuvo el consentimiento informado por parte del Hospital de la Universidad de Bologna-Italia, por escrito tanto de los pacientes como de los controles; el protocolo del estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975.

3.4.Análisis NanoHPLC-MS/MS de HSA

Las muestras de plasma se diluyeron 1: 100 con una mezcla de agua/acetonitrilo (98/2) (v/v) y se filtraron con un filtro de 0,22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

La separación cromatográfica de HSA de otras proteínas plasmáticas se realizó en un sistema nanoHPLC Agilent 1200 (Walbronn, Alemania) utilizando una columna monolítica CIMac C4 Analytical (5,3 mm DI X 5 mm). Fases móviles A [agua/acetonitrilo/ácido fórmico (99/1/0.1) (v/v/v),] y B [acetonitrilo/agua/ácido fórmico (98/2/0.1) (v/v/v)] se utilizaron para desarrollar una gradiente. El gradiente de disolvente se estableció como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de sistema de solventes para NanoHPLC-DAD

Tiempo	% A	%B
0	70	30
10	30	70
11	20	80
12	20	80

El flujo se fijó en 0,8 mL/min y se utilizó una válvula T para dividir parte de la fase móvil directamente en el residuo. La columna se equilibró con la composición de la fase móvil de las condiciones iniciales durante 3 minutos antes de la siguiente inyección. El volumen de inyección fue de 3µl.

El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo en un analizador híbrido Quadrupole-Time of Flight (Q-ToF Micro, Micromass, Manchester, Reino Unido) con una fuente de iones de electropulverización en Z (ESI). La temperatura de la fuente ESI-Q-ToF se fijó en 100 ° C, el voltaje capilar en 3,5 kV y el voltaje del cono en 42 V. El tiempo de exploración se fijó en 2,4s y el tiempo entre exploraciones en 0,1s. El flujo de gas del cono se fijó en 120 L/h y el gas de desolvatación en 500 L/h. Los cromatogramas de masas se registraron en corriente iónica total (TIC), dentro de 1000 m/z y 1700 m/z. El espectro sustraído de la línea base de la HSA (m/z 1084-1534) se deconvolucionó en una escala de masa real utilizando el software basado en entropía máxima (MaxEnt1) suministrado con el software MassLynx. Los parámetros de salida fueron los siguientes: rango de masa 61500-71500 Da y resolución 2Da/canal. Se utilizó el modelo uniforme gaussiano, con 0,5 Da de ancho a media altura.

El porcentaje relativo de abundancia de las isoformas se calculó dividiendo la intensidad de la isoforma, obtenida del espectro deconvolucionado y sustraído de la línea base, por la suma de todas las intensidades de las isoformas y multiplicándolas por 100. Los datos fueron analizados por Excel.

$$\text{Isoforma de abundancia relativa} = \frac{\text{Isoforma de intensidad absoluta}}{\text{Suma de todas las isoformas de intensidad absoluta}} \times 100$$

La repetibilidad y reproducibilidad de HPLC/ESI-MS se había evaluado previamente.

3.5.Purificación HSA HPLC-UV

La muestra de plasma de los pacientes seleccionados se diluyó diez veces con agua, se filtró con un filtro de 0,22 µm y se purificó mediante un enfoque cromatográfico. En detalle, la HSA se purificó a partir de otras proteínas plasmáticas usando un cromatógrafo de líquidos Jasco PU-1585 (Jasco Corporation, Tokio, Japón) equipado con una válvula de inyección Reodyne 7281 (bucle de muestra de 20 µL). La detección se realizó con un detector Jasco UV-1575 (215 nm). La purificación preparativa por cromatografia liquida de HSA se realizó en una columna C18 (Jupiter Phenomenex 5 µm, 300Å, 4,6 mm × 150 mm de DI) ensamblada con un SecurityGuardTM precolumna que consta de un cartucho de protección C18 (Phenomenex, 4,0 mm×3,0 mm de DI) insertado en su soporte de cartucho. Fases móviles A [agua/acetonitrilo/ácido fórmico (99/1/0.1) (v/v/v),] y B [acetonitrilo/agua/ácido fórmico (98/2/0.1) (v/v/v)] se utilizaron para desarrollar un gradiente. Tabla 2

Tabla 2. Gradiente de sistema de solventes para HPLC-UV

Tiempo	**% A**	**%B**
0	75	25
8	30	70
10	20	80
16	20	80

El volumen de inyección fue de 20 µl y el flujo fue de 0,8 ml/min. La columna se equilibró con la composición de la fase móvil de las condiciones de partida durante 5 min antes de

la siguiente inyección. Se realizaron inyecciones repetidas de las muestras de plasma diluidas y se eluyó la HSA de la columna, se recogió y se secó al vacío.

3.6.Análisis MALDI-TOF de HSA purificada

El análisis MALDI-TOF-MS se realizó usando un Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con un láser N2 pulsado que funciona a 337 nm. Los espectros de iones positivos se adquirieron en modo lineal en un rango m/z de 20.000 a 150.000 utilizando un voltaje de aceleración de 25.000V, un voltaje de red de 23.125V y un tiempo de extracción de retardo de 800 ns. El espectro para cada punto se obtuvo promediando el resultado de 1000 disparos láser. La calibración de la masa externa se realizó usando iones de carga simple y doble de albúmina de suero bovino. El análisis se realizó colocando en la placa objetivo 1µL de la muestra mezclada con un volumen igual de la solución de matriz, 30 mg/mL de ácido sinapínico en 1:1 (v/v) AcCN/H2O que contiene 0,1% (v/v) TFA.

3.7.HSA en solución de digestión

La HSA secada al vacío se resuspendió con 40 µl de bicarbonato de amonio 20 mM pH 8,5. Se trató una alícuota de 25 µl con 9 µl de DTT 0,1 M y se incubó a 56ºC durante 30 min. Se añadieron 9 µl de yodoacetamida 55 mM y la muestra se incubó durante 45 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 9µL de tripsina 1 mg/mL y la muestra se incubó a 37 °C durante la noche. Las reacciones se detuvieron añadiendo 1 µl de ácido fórmico al 5%.

3.8.Análisis MALDI-TOF de digestión tríptica de HSA

El análisis se realizó en reflector, modo de detección positiva en un rango a m/z de 500 a 5000 usando un voltaje de aceleración de 20,000V, un voltaje de red de 16,000V y un tiempo de retardo de extracción de 200ns. El espectro de cada punto se obtuvo promediando los resultados de 1000 disparos láser. Los espectros de digestión de HSA se calibraron internamente en péptidos de tripsina suficientemente abundantes en los espectros. Se utilizó como matriz 10mg/ml de ácido R-ciano-4-hidroxicinámico en AcCN/H2O 1:1 (v/v) que contenía TFA al 0,1% (v/v). El análisis se realizó colocando 1 µl de la muestra mezclada con un volumen igual de la solución de matriz sobre la placa objetivo.

3.9.Análisis NanoHPLC-ESI-Q-TOF de digestión tríptica de HSA

El análisis de péptidos ASH se llevó a cabo utilizando un Nano-HPLC Agilent 1100 Series (Walbronn, Alemania). Los análisis se realizaron en una columna C18 (150 mm x

75 μm; 3,5 μm). Las fases móviles A [agua: acetonitrilo: AF (99:1:0,1) (v/v)] y B [acetonitrilo: agua: AF (98:2:0,1) (v/v)] se utilizaron para desarrollar un gradiente. El gradiente de disolvente se estableció como sigue: 10%-55% B, 70 min; 55%-90% de B, 1 min; 90% de B, 5 min; 90%-5% de B, 1min. El sistema estaba equipado con un muestreador automático y el volumen de inyección era de 10μL. La columna se equilibró con la composición de la fase móvil de las condiciones de partida durante 10 minutos antes de la siguiente inyección. El análisis de espectrometría de masas se realizó en el Q-ToF (Micromass, Manchester, Reino Unido) con una fuente de iones nano-Z-spray. La temperatura de la fuente ESI-QToF se fijó en 110°C, la tensión capilar en 3,5 kV y la tensión del cono en 40 V.

Se analizaron los iones peptídicos dentro del rango de masas de exploración de estudio a m/z 400-1700 para la fragmentación posterior. Se seleccionaron iones cargados 2+, 3+ y 4+ que superaban un umbral de abundancia (valor TIC de 10 cuentas/seg) para los análisis MS/MS. Se seleccionaron 4 iones de un solo examen de exploración para su posterior fragmentación. El escaneo volvió al modo de estudio de masas cuando la intensidad de los iones cayó por debajo de 3cuentas/seg o después de 8seg. El tiempo de exploración fue de 2 segundos para el ión original y de 1 segundo para los iones MS/ MS. La energía de colisión se seleccionó utilizando el reconocimiento del estado de carga.

Los espectros de iones de fragmentos obtenidos de los análisis nanoHPLC-ESI-MS/MS se procesaron utilizando Mascot Distiller (Matrix Science, Londres, Reino Unido), un programa de software que reduce los datos sin procesar de MS a listas de picos de alta calidad para búsquedas en bases de datos. Los datos de NanoHPLC-MS/MS se analizaron buscando en la base de datos SWISSPROT humana (www.uniprot.org).

La HSA es una de las proteínas humanas más investigadas, sin embargo, sus diferentes y múltiples funciones han atraído y siguen atrayendo el interés de los investigadores.[33]

Como se informó anteriormente, debido a su alta concentración intravascular y su fuerte carga neta negativa, La HSA juega un papel fundamental en la modulación de la distribución de líquidos entre los compartimentos corporales. Además de su capacidad oncótica, la HSA tiene otras propiedades biológicas, como actividades antioxidantes y depuradoras, unión y transporte de muchas sustancias endógenas y exógenas y regulación de la función endotelial. Estas propiedades no oncóticas se ven fuertemente afectadas por la modificación postraduccional de HSA que altera la estructura de la proteína.[6,27]

La HSA ya se considera un valioso biomarcador en muchas enfermedades crónicas, como el cáncer, la enfermedad hepática, la artritis reumatoide, la isquemia y la obesidad posmenopáusica.[14] En los últimos años, el interés del investigador se centra en la caracterización de las alteraciones estructurales y funcionales de la HSA, particularmente las que afectan a la Cys34, considerada como uno de los biomarcadores más prometedores e innovadores en diferentes escenarios clínicos.[9,52]

Como informaron Naldi et al, la estructura de la HSA se ve afectada por el aumento del estrés oxidativo. En particular, el plasma de un sujeto sano se trató con hidroperóxido de terc-butilo (t-BuOOH) y los cambios estructurales en la HSA fueron monitoreados por análisis LC-MS.[33,53] El porcentaje de HSA oxidado aumentó proporcionalmente a la concentración de peróxido. Además, se detectó un incremento general de isoformas cisteiniladas, a expensas de la isoforma con la Cys34 libre. Este resultado estuvo de acuerdo con un trabajo anterior que informó una mayor formación de puentes disulfuro después de la exposición a un factor de estrés oxidativo.[50]

El estrés oxidativo se ha detectado en la mayoría de las condiciones clínicas y experimentales de la enfermedad hepática crónica y, en la enfermedad hepática alcohólica (EHA). Un factor que juega un papel central en muchas vías de daño inducido por alcohol es la generación excesiva de ROS, que puede dañar o causar la degradación completa (es decir, peroxidación) de moléculas complejas esenciales en las células, incluidos lípidos, proteínas y ADN.[34,54] En particular, la presencia de ROS puede inducir daños estructurales irreversibles y alterar las actividades de las proteínas. Específicamente, los radicales que contienen oxígeno reaccionan con proteínas dando lugar a moléculas

oxidadas, degradadas y reticuladas, siendo la cisteína, metionina, triptófano, tirosina e histidina los residuos más propensos a la oxidación. En particular, la oxidación induce la conversión de metionina en sulfóxido de metionina o derivados de sulfona.[9] En general, la oxidación de aminoácidos en las cadenas de polipéptidos de proteínas a menudo reduce o modifica la función, conformación y estabilidad de las proteínas.[2]

El presente trabajo fue investigar cómo el fuerte estrés oxidativo característico de la EHA afecta la integridad estructural de la HSA. Para ello analizamos la HSA de plasma de una población de paciente alcohólico con diagnóstico de cirrosis con el fin de evaluar el tipo y la entidad de la MPTs que afecta a la HSA.[35]

4.1. Separación cromatográfica HSA de otras proteínas plasmáticas

Durante las últimas décadas, la aparición de la espectrometría de masas y la proteómica ha contribuido en gran medida al desarrollo de métodos analíticos sensibles y específicos dedicados a la cuantificación de proteínas MPTs en fluidos biológicos con el enfoque de downstreams y de upstreams. Recientemente, Naldi et al.[33] Informaron sobre una metodología validada basada en análisis de espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida para la identificación y cuantificación relativa de isoformas de HSA derivadas de varios MPTs.[55]

La separación cromatográfica propuesta de HSA de otras proteínas plasmáticas se modificó aquí para obtener análisis más rápidos. En particular, la columna cromatográfica C4 tradicional (2,0 mm DI x 150 mm) se reemplazó por una columna monolítica C4 de dimensiones reducidas (5,3 mm DI x 5 mm).[56]

Los soportes monolíticos consisten en una unidad de una sola pieza que contiene flujo a través de los poros. Como consecuencia, la transferencia de masa es mucho más rápida debido al flujo convectivo que se convierte en un mecanismo de transporte predominante. La baja resistencia hidráulica es la característica más ventajosa de las columnas monolíticas en comparación con las columnas de lecho empacado convencionales.[57] Esta característica permite una eficiencia de separación sin afectar el flujo y una capacidad de unión dinámica. La columna utilizada en este trabajo está basada en el copolímero macroporoso de metacrilato de glicidilo y dimetacrilato de etileno (GMA-EDMA), derivatizado con cadenas de alquilo C4. Los soportes monolíticos están destinados principalmente a separaciones rápidas, eficientes y reproducibles de biomoléculas como proteínas grandes, ADN plasmídico y partículas virales.[50]

Dado que el alto flujo adoptado para el análisis (0,8 mL/min) no era compatible con la

ionización por electropulverización, se colocó una válvula en T después de la columna analítica para dividir parte del flujo directamente al residuo. Adoptando el gradiente descrito en la sección experimental fue así posible lograr la resolución de HSA de otras proteínas plasmáticas en menos de 12 minutos sin comprometer la sensibilidad y selectividad del análisis. En la Figura 1, se puede apreciar el cromatograma de HSA a un tiempo de 14.35min con una columna C4 tradicional, pero en la Figura 2, se aprecia un cromatograma que muestra la HSA, eluyendo a los 6,3 min, separada de otras proteínas plasmáticas, con la columna monolítica CIMac C4.

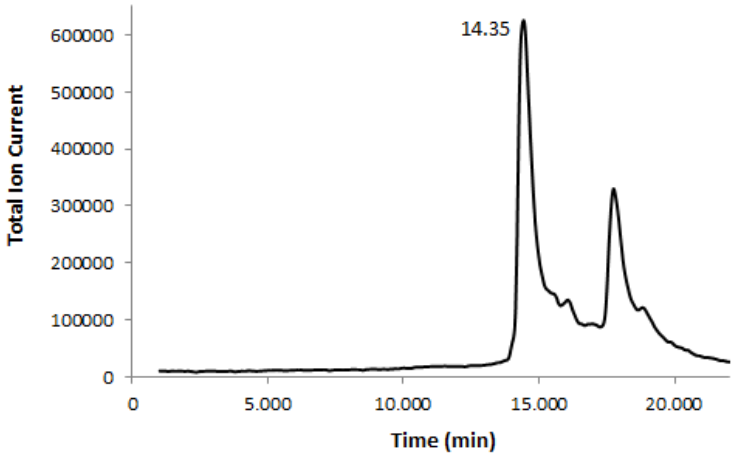


Figura 1. Cromatograma de la separación de HSA de otras proteínas plasmáticas obtenidas por HPLC, mediante una columna C4 tradicional.

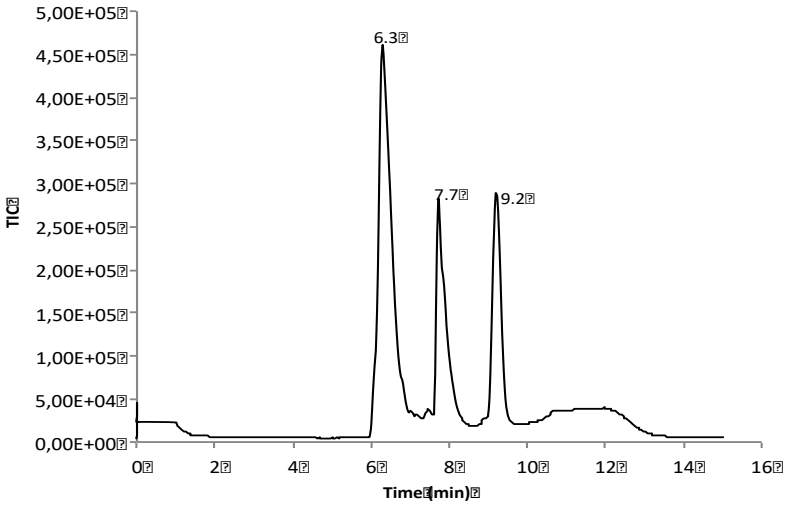


Figura 2. Cromatograma de la separación de HSA de otras proteínas plasmáticas obtenidas por HPLC, mediante una columna monolítica CIMac C4

4.2.Identificación de isoformas de HSA

El análisis de espectrometría de masas demostró ser esencial porque las modificaciones estructurales que afectan a HSA tienen efectos mínimos sobre el comportamiento cromatográfico de diferentes isoformas para que no se separen. La NanoHPLC-MS/MS de barrido completo permite la detección simultánea y la determinación de la masa molecular de las diferentes isoformas. Los espectros de masas con carga múltiple adquiridos en el pico eluyendo a los 6,3 min e identificados como HSA se muestran en la Figura 2. El espectro de masas ESI muestra una distribución de iones desde $[M^{+}66H]$ 66^{+} a $[M^{+}31H]$ 31^{+}. El espectro de masas ESI deconvolucionado de HSA, obtenido usando el software MaxEnt 1.0 y reportado en la Figura 3, exhibe la presencia de carga múltiple de varias isoformas de HSA; estos se identificaron sobre la base de su peso molecular. La abundancia relativa de cada isoforma identificada por HSA se derivó y se transformó en una cantidad porcentual relativa.

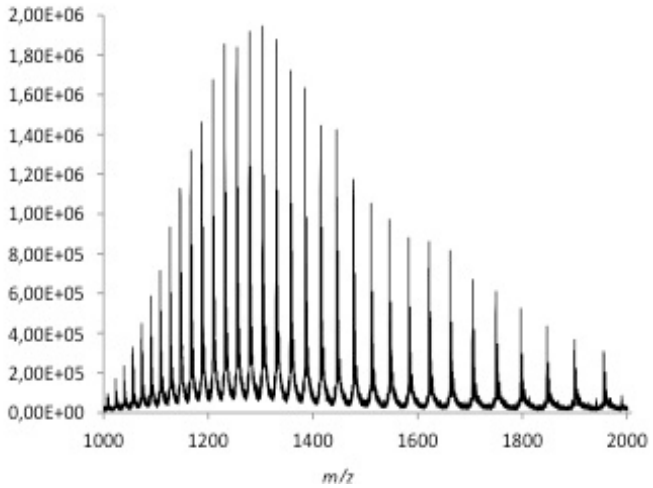


Figura 3. Espectros de masas con carga múltiple adquiridos en el pico eluyendo a los 6,3 min e identificados como HSA.

Las isoformas de HSA más abundantes detectadas en el plasma analizado de voluntarios de control sanos fueron identificadas previamente por Naldi et al. (72) y en este estudio se acaban de informar. En la Figura 4, se muestra el espectro de masas desconvolucionado de HSA. En la Figura 5-3a, la señal más intensa se atribuyó a la isoforma HSA nativa no modificada (valores m/z para $[M^{+}H]^{+}$de 66.439). El segundo pico, en términos de intensidad, fue el de los valores m/z para $[M^{+}H]^{+}$ de 66.559 correspondientes a la isoforma de HSA cisteinilada. La HSA glucosilada también se identificó y corresponde al pico con los valores m/z para $[M^{+}H]^{+}$ de 66.600, que mostró una masa aumentada de 161Da. La

isoforma con valor m/z correspondiente a 66.469 se atribuyó a HSA con la Cys34 oxidada a ácido sulfínico, resultado previamente confirmado por análisis LC-ESI-MS/MS. La forma con valores m/z para $[M^+H]^+$ de 66.720 se atribuyó a HSA tanto cisteinilada como glicada. También se identificó ASH con una dihidroalanina (HSA-dha) que reemplaza a la Cys264 (m/z 66.405). Más allá de estas formas, se identificaron formas truncadas; en particular, la forma N-terminal truncada (-DA) se detectó en la forma nativa (m/z para $[M^+H]^+$ de 66,255) y en la forma cisteinilada valor m/z para $[M^+H]^+$ de 66,372).

Analizando plasma de pacientes alcohólicos con diagnóstico de cirrosis, se detectaron nuevas señales. Como se puede observar en la Figura 5-3b, se detectaron las señales correspondientes a un aumento de masa igual a 96 y 216 Da en comparación con la forma nativa de la proteína. La identificación de estas isoformas basada en la diferencia de masa fue un desafío ya que estos incrementos de masa pueden atribuirse a diferentes grados de oxidación (+16Da) en varios residuos aminoácidos. Por esta razón, se realizó una digestión tríptica de HSA seguida de un análisis LC-MS/MS para identificar la nueva identidad de isoformas de HSA.

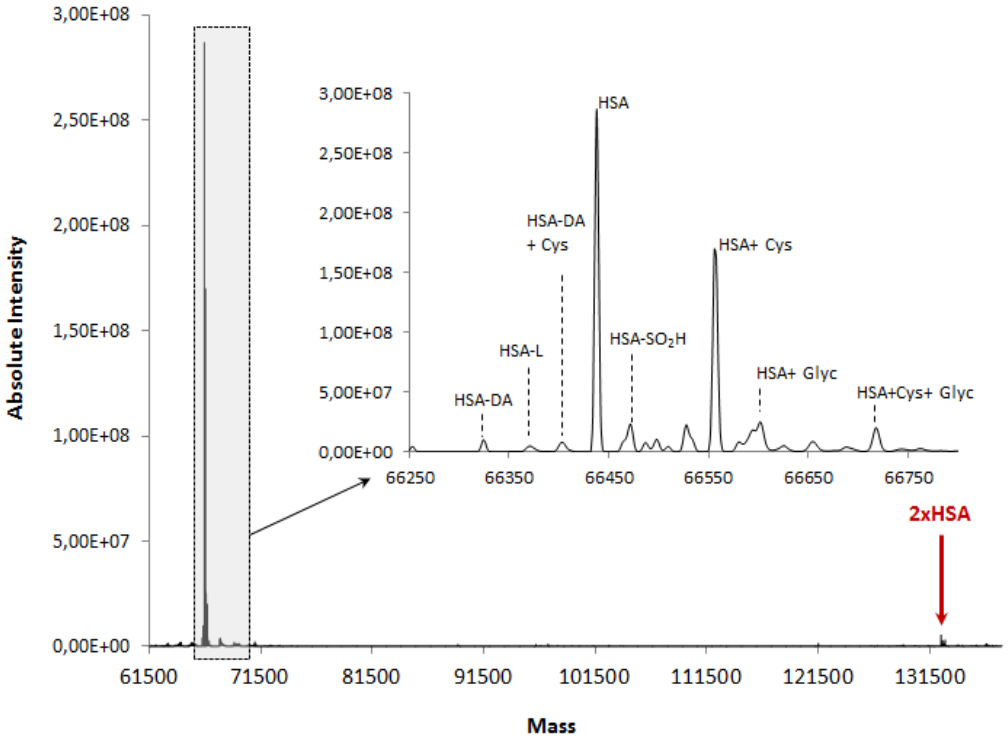


Figura 4. Espectro de masas desconvolucionado de HSA.

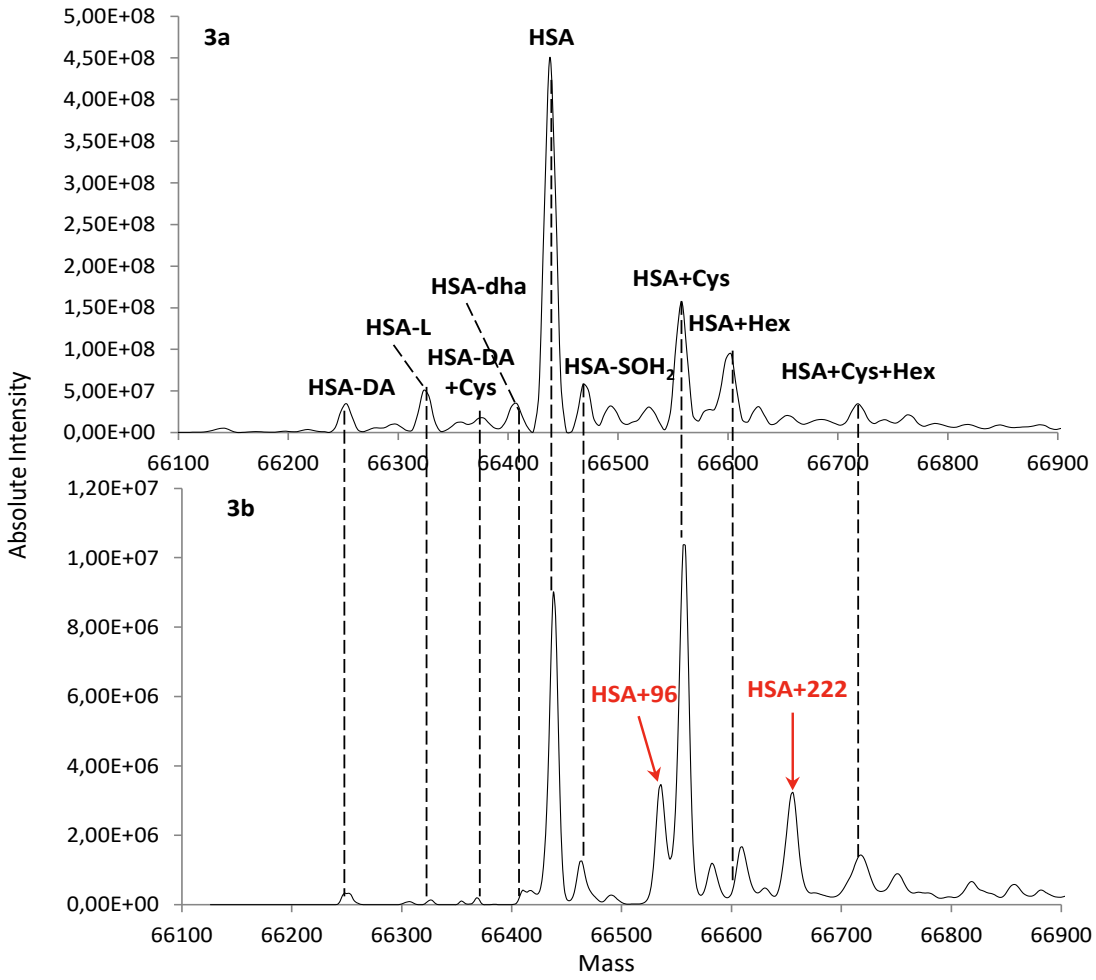


Figura 5. Las MPTs de HSA mediante NanoHPLC-ESI-MS/MS (Q-ToF Micro, Micromass). (3a) Isoformas identificado en HSA de su forma nativa, (3b) Isoformas de HSA en pacientes alcoholicos.

4.3.Identificacion de isoformas oxidadas por HSA

4.3.1. Purificación de HSA

El plasma es una muestra muy compleja que contiene varias proteínas; incluso si HSA es la más abundante de estas proteínas, su purificación se realizó antes de la digestión tríptica. Este paso fue necesario para simplificar la mezcla de péptidos trípticos y aumentar la posibilidad de detectar aquellos péptidos portadores de los MPTs.

La purificación de HSA a partir de otras proteínas plasmáticas se logró mediante un enfoque cromatográfico de fase inversa en una fase estacionaria CIMac C4. En este sistema cromatográfico, la HSA mostró un tiempo de retención de 4 min. En la Figura 6 se muestra un cromatograma de este. La proteína se recogió en el intervalo de tiempo

indicado en el intervalo de tiempo evidenciado en la Figura 6; Se ensamblaron alícuotas de diferentes análisis y se secaron al vacío.

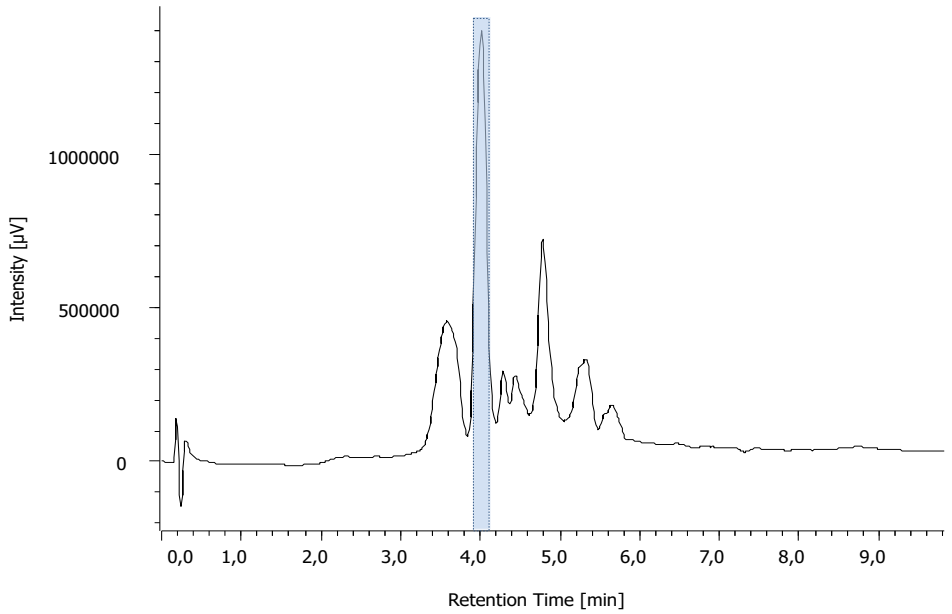


Figura 6.Cromatograma de HSA purificado con la columna CIMac C4 mediante HPLC-UV

4.3.2. Análisis MALDI-TOF de la HSA purificada

La eficacia de la purificación se evaluó mediante análisis MALDI-TOF. En detalle, se resuspendió el sedimento de HSA con una pequeña cantidad de urea para facilitar el replegamiento de la proteína y se diluyó con una mezcla adecuada de agua/acetonitrilo/TFA. La cristalización se logró con ácido sinapínico, la matriz de elección para la ionización de proteínas con la técnica MALDI. Los análisis espectrométricos se realizaron en modo lineal positivo. Se empleó la modalidad lineal para aumentar la sensibilidad de la detección.

Como se indica en la Figura 7, las señales más abundantes pueden atribuirse al diferente estado de carga de la proteína de albúmina, lo que indica que se realizó una buena purificación.

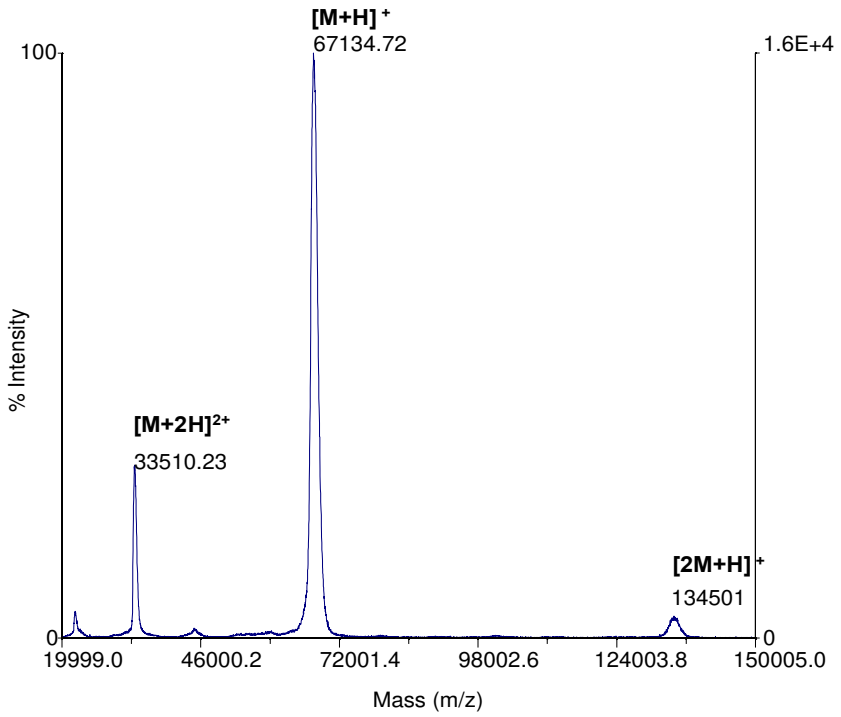


Figura 7. Espectro de HSA purificado mediante Espectrometría MALDI-TOF

4.3.3. Digestión tríptica de HSA purificada y análisis MALDI-TOF.

La proteína purificada se digirió durante la noche con tripsina. Los límites de disulfuro se redujeron previamente con DTT y se alquilaron con yodoacetamida. La digestión se controló en primer lugar mediante análisis MALDI-TOF, comprobando tanto la desaparición de la proteína intacta (datos no mostrados) como el perfil peptídico, Figura 8. Los análisis de péptidos se realizaron en modo reflector positivo y los espectros se calibraron externamente con una mezcla estándar comercial. La modalidad reflector permitió una buena precisión en la determinación de la masa de péptidos pero para la determinación de su secuencia se realizó un análisis más preciso con un enfoque NanoHPLC-ESI-MS/MS. Así mismo se muestra en la Figura 9, los espectros de plasma de HSA diluido en agua y ultrafiltrados que evalúa la especificidad de detección.

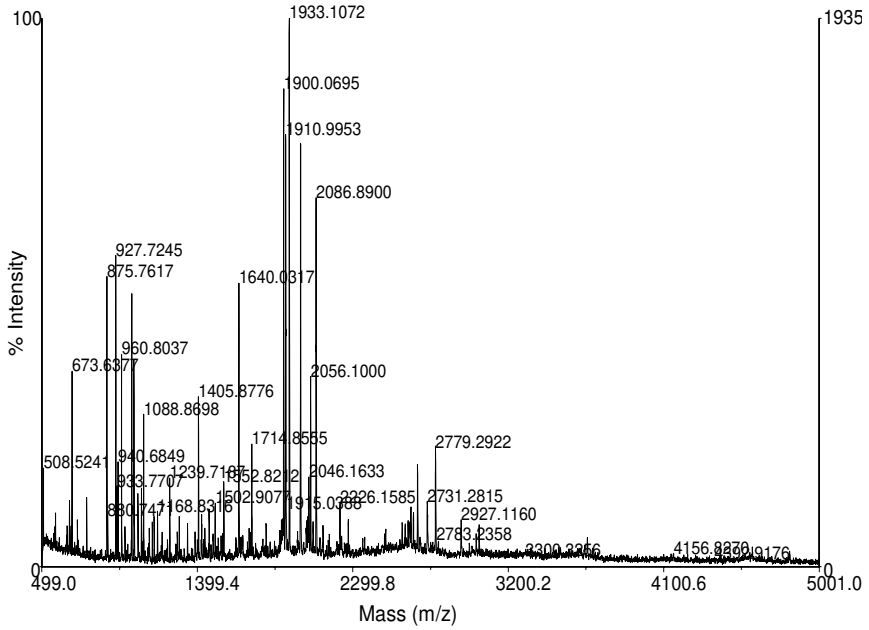


Figura 8. Espectro que evidencia la ausencia de HSA mediante Espectrometría MALDI-TOF

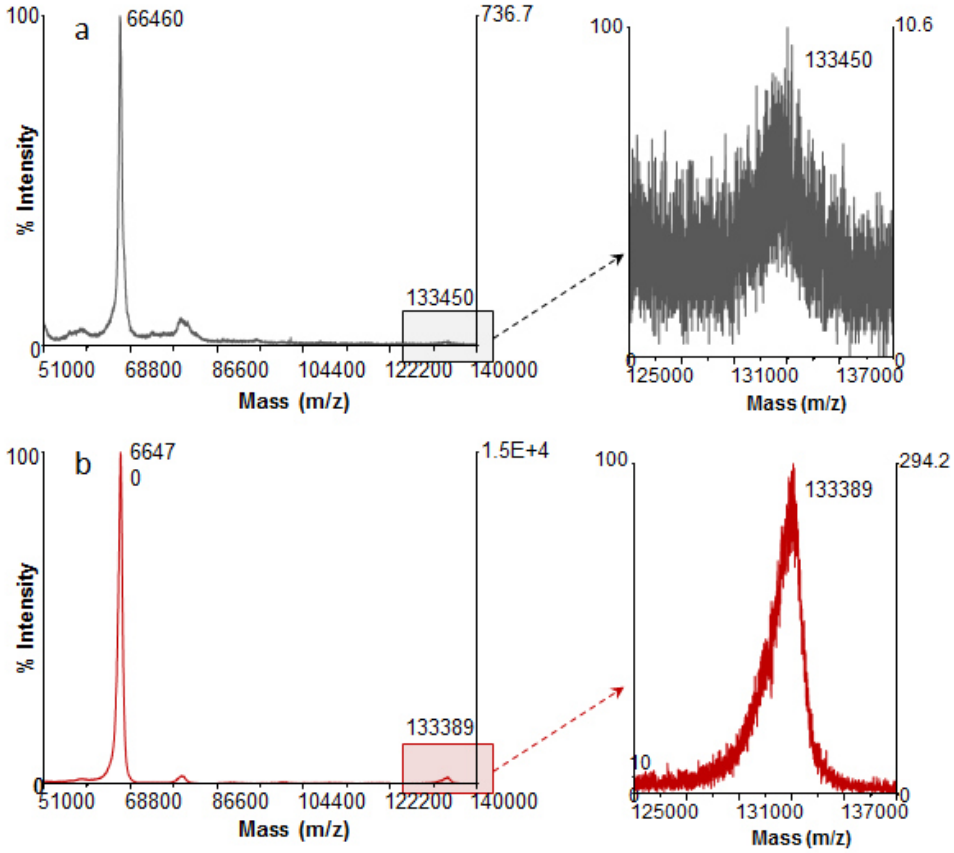


Figura 9. Espectros de masas obtenidos con Espectrometría MALDI-TOF en a) plasma simplemente diluido con agua y b) plasma ultrafiltrado.

La mezcla de péptidos se separó cromatográficamente con un enfoque de fase inversa. Para mejorar la sensibilidad de la detección, se realizó un análisis a nano escala en un HPLC que opera a nano-flujos (0.5 µL/min) interconectado con una fuente de iones de Nano-electrospray; con este enfoque, la concentración de la muestra se mantiene alta incluso con una pequeña cantidad de proteína, además logrando mostrar la secuencia de la HSA y la ubicación de la formación del puente de disulfuro entre dos Cys34. Figura 10

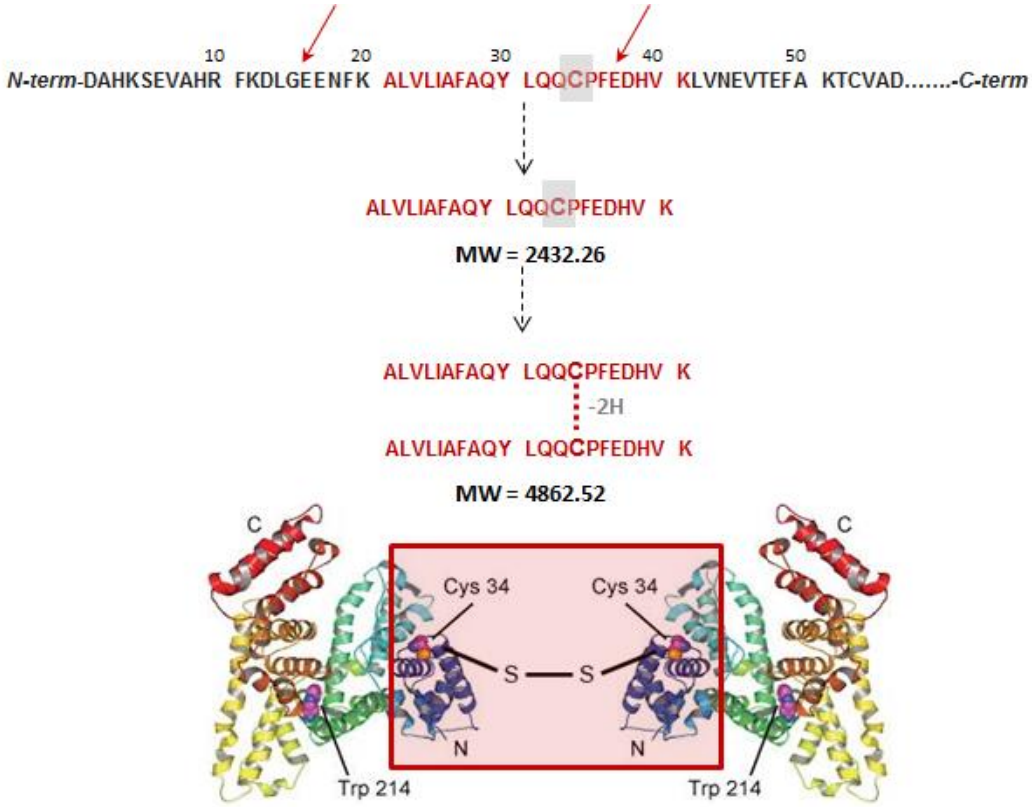


Figura 10. Secuencia de aminoácidos de HSA; Abajo: formación de puente disulfuro entre dos Cys 34

La purificación de proteínas contribuyó a simplificar la muestra, sin embargo, la separación cromatográfica de todos los péptidos sigue siendo un desafío. Sin embargo, el software MassLynx puede seleccionar las señales con mayor intensidad al nivel del cuadrupolo y fragmentarlas en la celda de colisión. A continuación, el TOF analiza los fragmentos basándose en sus valores m/z. Todos los datos de un análisis son elaborados por el software Matrixscience y enviados al servidor Mascot para la identificación de proteínas. Tabla 3.

Tabla 3. Valores relacionados con la masa molecular y la abundancia porcentual de las isoformas de HSA.

MS MEDIDO	ISOFORMA	% ABUNDANCIA
66244	HSA-DA	2,31 ± 0,52
66334	HSA-L	2,09 ± 0,82
66322	HSA + Cys-DA	1,29 ± 0,92
66562	HSA	59,83 ± 1,27
66538	HSA + SO2H	9,13 ± 1,82
66498	HSA + Cys	14,89 ± 0,43
66681	HSA + Glyc	9,30 ± 1,46
66810	HSA + Cys + Glyc	2,62 ± 0,01

Esta metodología se utilizó para investigar las modificaciones postraduccionales que afectan a la HSA purificada del plasma de un sujeto de control y del plasma de tres pacientes con EHA con diagnóstico de cirrosis. En la Tabla 4 se informan los resultados de identificación en Mascot. En particular, la puntuación de identificación de proteínas, el número de péptidos identificados (coincidencias) y la cobertura de proteínas se informan para la muestra analizada. Como se puede observar, la mayor parte de la muestra, excepto el paciente EHA1, presenta una puntuación excelente, un número similar de péptidos identificados y una cobertura media de la secuencia proteica atestiguada en torno al 50%. Figura 11

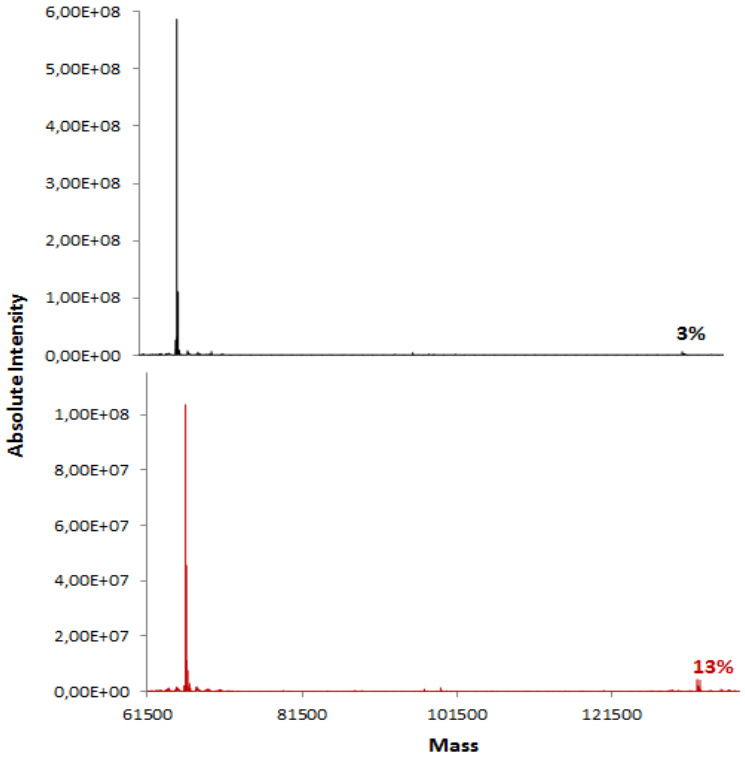


Figura 11. Espectro de masas desconvolucionado del análisis de plasma de un control sano (negro) en comparación con el de un paciente EHA (rojo).

Tabla 4. Resultados de identificación de proteínas obtenidos después del envío de datos al servidor MASCOT.

MUESTRAS	SCORE	MACTHES	% COVERAGE
CTRL	1435	35	53
EHA 1	1600	61	66
EHA 2	1460	42	51
EHA 3	1560	45	51

Junto con estos resultados, se informó la secuencia de cada péptido identificado junto con su puntuación y la ubicación de cada MPTs en la proteína. En las Tablas 5,6,7 y 8, se informan los péptidos identificados por HSA de cada muestra analizada.

Tabla 5. Lista de péptidos de HSA identificados en el sujeto de control (CTRL) de la base de datos MASCOT.

Peptide	Mass Observed	Mass Expect.	Mass Calc.	Score	Sequence
35 – 44	613.8673	1225.7201	1225.5979	74	R.FKDLGEENFK.A
45 – 65	830.8605	2489.5598	2489.2777	88	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L
66 – 75	575.3810	1148.7475	1148.6077	55	K.LVNEVTEFAK.T
76 – 88	749.8900	1497.7655	1497.5712	54	K.TCVADESAENCDK.S
76 – 88	749.9030	1497.7914	1497.5712	46	K.TCVADESAENCDK.S
76 – 88	749.9117	1497.8087	1497.5712	8	K.TCVADESAENCDK.S
106 – 117	717.8199	1433.6253	1433.5261	64	R.ETYGE**M**ADCCAK.Q
118 – 130	572.3269	1713.9589	1713.7893	23	K.QEPERNECFLQHK.D
170 – 183	872.0945	1742.1744	1741.8868	74	R.HPYFYAPELLFFAK.R
265 – 286	862.4524	2584.3355	2584.1105	59	K.VHTECCHGDLLECADDRADLAK.Y
287 – 298	722.4016	1442.7887	1442.6347	68	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	814.4013	1626.7880	1627.6229	19	K.YICENQDSISSK.L +
311 – 337	992.2239	2973.6500	2973.3372	120	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D
311 – 337	997.6293	2989.8661	2989.3321	129	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + Oxidation (M)
342 – 360	767.5580	2299.6523	2299.0983	76	K.NYAEAKDVFLG**M**FLYEYAR.R
348 – 360	812.5493	1623.0841	1622.7803	73	K.DVFLGMFLYEYAR.R
361 – 372	489.9982	1466.9727	1466.8358	80	R.RHPDYSVVLLLR.L
362 – 372	656.4573	1310.9000	1310.7347	52	R.HPDYSVVLLLR.L
384 – 396	518.2689	1551.7849	1551.5905	37	K.CCAAADPHECYAK.V
397 – 413	682.4657	2044.3752	2044.0881	59	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
397 – 413	1023.2033	2044.3920	2044.0881	71	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
414 – 426	829.4796	1656.9446	1656.7453	86	K.QNCELFEQLGEYK.F
414 – 434	867.2211	2598.6415	2598.2900	118	K.QNCELFEQLGEYKFQNALLVR.Y
427 – 434	480.8441	959.6737	959.5552	42	K.FQNALLVR.Y
438 – 452	820.6042	1639.1938	1638.9305	97	K.KVPQVSTPTLVEVSR.N
439 – 452	756.5639	1511.1132	1510.8355	67	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
453 – 460	482.8535	963.6924	963.5237	11	R.NLG**K**VGSK.C + Hex (K)
469 – 490	892.3095	2673.9066	2673.3077	99	K.R**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	840.1376	2517.3910	2517.2066	110	R.**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	1259.7416	2517.4686	2517.2066	44	R.**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	845.6172	2533.8297	2533.2015	114	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + Oxidation (M)
470 – 496	1058.7734	3173.2984	3172.5355	160	R.**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR.V
509 – 524	956.0474	1910.0803	1909.9244	75	R.RPCFSALEVDETYVPK.E
550 – 558	500.8953	999.7761	999.5964	38	K.QTALVELVK.H
570 – 581	671.8914	1341.7682	1341.6275	78	K.AV**M**DDFAAFVEK.C

Tabla 6. Lista de péptidos identificados de HSA obtenida para EHA 1 de la base de datos de MASCOT

Peptide	Mass Observed	Mass Expect.	Mass Calc.	Score	Sequence
162 – 168	464.2443	926.4741	926.4861	27	K.YLYEIAR.R
98 – 105	467.2520	932.4895	932.5113	49	K.LCTVATLR.E
427 – 434	480.7784	959.5422	959.5552	44	K.FQNALLVR.Y
453 – 460	482.6453	963.2761	963.5237	9	R.NLGKVGSK.C + Hex (K)
550 – 558	500.7982	999.5819	999.5964	36	K.QTALVELVK.H
89 – 97	509.2660	1016.5174	1016.5291	52	K.SLHTLFGDK.L
234 – 242	510.2837	1018.5529	1018.5712	20	R.AFKAWAVAR.L
161 – 168	528.2913	1054.5680	1054.5811	33	K.KYLYEIAR.R
549 – 558	564.8477	1127.6809	1127.6914	76	K.KQTALVELVK.H
500 – 508	569.7366	1137.4587	1137.4907	62	K.CCTESLVNR.R
500 – 508	569.7422	1137.4699	1137.4907	36	K.CCTESLVNR.R
598 – 609	571.3468	1140.6791	1140.6866	81	K.KLVAASQAALGL.-
66 – 75	575.2943	1148.5740	1148.6077	3	K.LVNEVTEFAK.T
66 – 75	575.2946	1148.5747	1148.6077	55	K.LVNEVTEFAK.T
66 – 75	575.3004	1148.5862	1148.6077	65	K.LVNEVTEFAK.T
35 – 44	613.8013	1225.5881	1225.5979	55	R.FKDLGEENFK.A
570 – 581	671.8432	1341.6718	1341.6275	65	K.AV**M**DDFAAFVEK.C
570 – 581	679.8383	1357.6620	1357.6224	75	K.AVMDDFAAFVEK.C + Oxidation (M)
187 – 198	686.2660	1370.5175	1370.5595	71	K.AAFTECCQAADK.A
199 – 210	699.9068	1397.7991	1397.7700	13	K.AACLLPKLDELR.D
199 – 210	466.9460	1397.8162	1397.7700	21	K.AACLLPKLDELR.D
106 – 117	717.7474	1433.4802	1433.5261	56	R.ETYGE**M**ADCCAK.Q
287 – 298	722.2972	1442.5799	1442.6347	73	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	722.3101	1442.6055	1442.6347	16	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	722.3116	1442.6087	1442.6347	11	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	722.3196	1442.6246	1442.6347	7	K.YICENQDSISSK.L
106 – 117	725.7415	1449.4685	1449.5210	62	R.ETYGEMADCCAK.Q + Oxidation (M)
361 – 372	489.9640	1466.8703	1466.8358	28	R.RHPDYSVVLLLR.L
76 – 88	749.7636	1497.5127	1497.5712	20	K.TCVADESAENCDK.S
76 – 88	749.7647	1497.5148	1497.5712	15	K.TCVADESAENCDK.S
76 – 88	749.7657	1497.5169	1497.5712	95	K.TCVADESAENCDK.S
439 – 452	756.4126	1510.8107	1510.8355	60	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
384 – 396	768.2584	1534.5023	1533.5170	68	K.CCAAADPHECYAK.V + 2 Trioxidation (C)
299 – 310	516.2563	1545.7471	1545.7894	48	K.LKECCEKPLLEK.S
384 – 396	518.1806	1551.5199	1551.5905	9	K.CCAAADPHECYAK.V
348 – 360	820.4415	1638.8684	1638.7752	49	K.DVFLGMFLYEYAR.R + Oxidation (M)
438 – 452	820.4603	1638.9060	1638.9305	59	K.KVPQVSTPTLVEVSR.N
250 – 264	550.9932	1649.9577	1649.8876	31	K.AEFAEVSKLVTDLTK.V
250 – 264	825.9870	1649.9595	1649.8876	121	K.AEFAEVSKLVTDLTK.V
414 – 426	829.3961	1656.7776	1656.7453	92	K.QNCELFEQLGEYK.F
185 – 198	554.8961	1661.6665	1661.7178	48	R.YKAAFTECCQAADK.A
287 – 300	562.2747	1683.8022	1683.8138	24	K.YICENQDSISSKLK.E

287	– 300	562.2747	1683.8022	1683.8138	24	K.YICENQDSISSKLK.E
250	– 264	907.0251	1812.0356	1811.9404	12	K.AEFAEVSKLVTDLTK.V + Hex (K)
169	– 183	633.6142	1897.8208	1897.9879	71	R.RHPYFYAPELLFFAK.R
89	– 105	644.7014	1931.0823	1931.0299	87	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E
89	– 105	966.5610	1931.1074	1931.0299	86	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E
123	– 138	666.3072	1995.8999	1995.9221	31	R.NECFLQHKDDNPNLPR.L
435	– 452	678.0376	2031.0908	2031.1364	24	R.YTKKVPQVSTPTLVEVSR.N
397	– 413	682.3874	2044.1403	2044.0881	66	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
397	– 413	1023.0926	2044.1706	2044.0881	17	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
265	– 281	696.2703	2085.7892	2085.8303	88	K.VHTECCHGDLLECADDR.A
265	– 281	696.2763	2085.8070	2085.8303	47	K.VHTECCHGDLLECADDR.A
45	– 65	830.5496	2488.6270	2489.2777	79	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L
470	– 490	839.8554	2516.5443	2517.2066	101	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470	– 490	845.1784	2532.5133	2533.2015	102	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + Oxidation (M)
469	– 490	891.8645	2672.5716	2673.3077	122	K.RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
469	– 490	897.4805	2689.4196	2689.3026	94	K.RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + Oxidation (M)
311	– 337	991.7900	2972.3483	2973.3372	28	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D
311	– 337	992.1756	2973.5051	2973.3372	128	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D
311	– 337	997.4952	2989.4637	2989.3321	122	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D + Oxidation (M)
45	– 75	1207.4287	3619.2643	3619.8749	19	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAK.T

Tabla 7. Lista de péptidos de HSA identificados para EHA 2 de la base de datos MASCOT.

Peptide	Mass Observed	Mass Expect.	Mass Calc.		Score	Sequence
45 – 65	830.9608	2489.8607	2489.2777	0.5830 0	69	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L
66 – 75	575.2019	1148.3892	1148.6077	-0.2185 0	62	K.LVNEVTEFAK.T
66 – 75	575.2798	1148.5449	1148.6077	-0.0628 0	0	K.LVNEVTEFAK.T
89 – 97	509.1743	1016.3340	1016.5291	-0.1951 0	47	K.SLHTLFGDK.L
89 – 105	644.5836	1930.7291	1931.0299	-0.3008 1	56	K.SLHTLFGDKLCTVATLR.E
106 – 117	717.5888	1433.1630	1433.5261	-0.3632 0	50	R.ETYGE**M**ADCCAK.Q
139 – 160	883.9730	2648.8971	2649.2567	-0.3596 0	74	R.LVRPEVDV**M**CTAFHDNEETFLK.K
162 – 168	464.1604	926.3062	926.4861	-0.1799 0	24	K.YLYEIAR.R
170 – 183	872.1437	1742.2728	1741.8868	0.3860 0	78	R.HPYFYAPELLFFAK.R
187 – 198	686.1145	1370.2145	1370.5595	-0.3450 0	83	K.AAFTECCQAADK.A
250 – 264	605.0512	1812.1317	1811.9404	0.1913 1	7	K.AEFAEVS**K**LVTDLTK.V + **Hex (K)**
250 – 264	907.0977	1812.1808	1811.9404	0.2404 1	48	K.AEFAEVS**K**LVTDLTK.V + **Hex (K)**
287 – 298	722.1348	1442.2551	1442.6347	-0.3797 0	68	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	722.1547	1442.2949	1442.6347	-0.3398 0	53	K.YICENQDSISSK.L
287 – 298	722.1903	1442.3660	1442.6347	-0.2687 0	14	K.YICENQDSISSK.L
311 – 337	992.3231	2973.9474	2973.3372	0.6103 0	115	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D
311 – 337	997.6184	2989.8335	2989.3321	0.5014 0	139	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**
311 – 337	997.6698	2989.9876	2989.3321	0.6555 0	69	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**
311 – 337	1043.0105	3126.0097	3126.3533	-0.3436 0	70	K.SH**C**IAEVE**N**DEMPADLPSLAADFVESK.D + **Trioxidation (C)**; **Hex (N)**
311 – 337	1048.2976	3141.8710	3142.3482	-0.4772 0	59	K.SH**C**IAEVE**N**DE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**; **Trioxidation (C)**; **Hex (N)**
348 – 360	812.5744	1623.1343	1622.7803	0.3541 0	51	K.DVFLGMFLYEYAR.R
348 – 360	820.5760	1639.1373	1638.7752	0.3621 0	75	K.DVFLG**M**FLYEYAR.R + **Oxidation (M)**
361 – 372	489.8136	1466.4188	1466.8358	-0.4169 1	52	R.RHPDYSVVLLLR.L
362 – 372	656.2757	1310.5368	1310.7347	-0.1978 0	62	R.HPDYSVVLLLR.L
384 – 396	518.0655	1551.1746	1551.5905	-0.4158 0	35	K.CCAAADPHECYAK.V
397 – 413	682.0375	2043.0908	2044.0881	-0.9973 0	62	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
397 – 413	1022.5668	2043.1190	2044.0881	-0.9690 0	72	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
414 – 426	829.1672	1656.3199	1656.7453	-0.4255 0	83	K.QNCELFEQLGEYK.F
414 – 434	867.2734	2598.7984	2598.2900	0.5084 1	108	K.QNCELFEQLGEYKFQNALLVR.Y
427 – 434	480.6950	959.3755	959.5552	-0.1797 0	47	K.FQNALLVR.Y
438 – 452	820.3328	1638.6511	1638.9305	-0.2794 1	64	K.KVPQVSTPTLVEVSR.N
439 – 452	756.3391	1510.6637	1510.8355	-0.1719 0	118	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
453 – 460	482.8806	963.7467	963.5237	0.2230 1	11	R.NLGKVGS**K**.C + **Hex (K)**
470 – 490	840.1998	2517.5775	2517.2066	0.3710 0	114	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	845.5885	2533.7436	2533.2015	0.5422 0	126	R.**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + **Oxidation (M)**
470 – 490	845.6105	2533.8097	2533.2015	0.6082 0	88	R.**M**PCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + **Oxidation (M)**
470 – 490	890.9353	2669.7842	2670.2227	-0.4385 0	63	R.MPCAEDYLSVVL**N**QL**C**VLHEK.T + **Trioxidation (C)**; **Hex (N)**
470 – 490	896.2690	2685.7853	2686.2176	-0.4323 0	65	R.**M**PCAEDYLSVVLNQL**C**VLHEK.T + Oxidation (M); Trioxidation (C); Hex (N)
549 – 558	564.7494	1127.4842	1127.6914	-0.2071 1	60	K.KQTALVELVK.H
550 – 558	500.7084	999.4022	999.5964	-0.1942 0	50	K.QTALVELVK.H
570 – 581	671.7159	1341.4172	1341.6275	-0.2103 0	75	K.AVMDDFAAFVEK.C

Tabla 8. Lista de péptidos de HSA identificados para EHA 3 de la base de datos MASCOT.

Peptide	Mass Observed	Mass Expect.	Mass Calc.		Score	Sequence
45 – 65	830.9560	2489.8461	2489.2777	0	85	K.ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK.L
66 – 75	575.2669	1148.5192	1148.6077	0	47	K.LVNEVTEFAK.T
66 – 75	575.2749	1148.5353	1148.6077	0	48	K.LVNEVTEFAK.T
98 – 105	467.2345	932.4544	932.5113	0	43	K.LCTVATLR.E
106 – 117	717.7181	1433.4216	1433.5261	0	51	R.ETYGE**M**ADCCAK.Q
139 – 160	884.0031	2648.9876	2649.2567	0	59	R.LVRPEVDV**M**CTAFHDNEETFLK.K
162 – 168	464.2204	926.4262	926.4861	0	32	K.YLYEIAR.R
170 – 183	872.1067	1742.1988	1741.8868	0	88	R.HPYFYAPELLFFAK.R
187 – 198	686.2365	1370.4584	1370.5595	0	72	K.AAFTECCQAADK.A
250 – 264	907.1698	1812.3250	1811.9404	1	48	K.AEFAEVSKLVTDLTK.V + Hex (K)
250 – 264	605.1184	1812.3334	1811.9404	1	51	K.AEFAEVSKLVTDLTK.V + Hex (K)
287 – 298	722.2652	1442.5159	1442.6347	0	77	K.YICENQDSISSK.L
311 – 337	992.0394	2973.0965	2973.3372	0	120	K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D
311 – 337	997.6134	2989.8185	2989.3321	0	61	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**
311 – 337	997.6598	2989.9576	2989.3321	0	125	K.SHCIAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**
311 – 337	999.6491	2995.9255	2996.2725	0	23	K.SH**C**IAEVENDE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Oxidation (M)**; **SulfurDioxide (C)**
311 – 337	1048.2118	3141.6136	3142.3482	0	59	K.SH**C**IAEVE**N**DE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Hex (N)**; **Oxidation (M)**; **Trioxidation (C)**
311 – 337	1048.3402	3141.9988	3142.3482	0	70	K.SHCIAEVE**N**DE**M**PADLPSLAADFVESK.D + **Hex (N)**; **Oxidation (M)**; **Trioxidation (C)**
348 – 360	812.5874	1623.1602	1622.7803	0	78	K.DVFLGMFLYEYAR.R
348 – 360	820.5323	1639.0501	1638.7752	0	74	K.DVFLG**M**FLYEYAR.R + **Oxidation (M)**
362 – 372	656.3261	1310.6377	1310.7347	0	84	R.HPDYSVVLLLR.L
362 – 372	656.3478	1310.6809	1310.7347	0	60	R.HPDYSVVLLLR.L
384 – 396	518.1593	1551.4560	1551.5905	0	42	K.CCAAADPHECYAK.V
384 – 396	776.7451	1551.4756	1551.5905	0	35	K.CCAAADPHECYAK.V
397 – 413	682.2937	2043.8593	2044.0881	0	63	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
397 – 413	1022.9528	2043.8910	2044.0881	0	60	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
397 – 413	682.3736	2044.0988	2044.0881	0	49	K.VFDEFKPLVEEPQNLIK.Q
414 – 426	829.3351	1656.6557	1656.7453	0	93	K.QNCELFEQLGEYK.F
414 – 434	867.0067	2597.9983	2598.2900	1	117	K.QNCELFEQLGEYKFQNALLVR.Y
427 – 434	480.7505	959.4865	959.5552	0	45	K.FQNALLVR.Y
438 – 452	820.4194	1638.8243	1638.9305	1	77	K.KVPQVSTPTLVEVSR.N
439 – 452	756.3763	1510.7380	1510.8355	0	60	K.VPQVSTPTLVEVSR.N
470 – 490	840.2596	2517.7570	2517.2066	0	109	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	840.2669	2517.7790	2517.2066	0	99	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T
470 – 490	845.5989	2533.7750	2533.2015	0	115	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK.T + **Oxidation (M)**
470 – 490	890.9410	2669.8010	2670.2227	0	61	R.MPCAEDYLSVVL**N**QLCVLHEK.T + **Hex (N)**; **Trioxidation (C)**
470 – 490	896.2763	2685.8070	2686.2176	0	61	R.MP**C**AEDYLSVVL**N**QLCVLHEK.T + **Hex (N)**; **Oxidation (M)**; **Trioxidation (C)**
470 – 496	1058.7709	3173.2909	3172.5355	1	16	R.MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR.V
470 – 496	1109.4459	3325.3159	3325.5516	1	27	R.MPCAEDYLSVVL**N**QLCVLHEKTPVSDR.V + **Hex (N)**; **Trioxidation (C)**
509 – 524	955.8898	1909.7650	1909.9244	0	74	R.RPCFSALEVDETYVPK.E

549 – 558	564.8180	1127.6215	1127.6914	1	35	K.KQTALVELVK.H
550 – 558	500.7718	999.5290	999.5964	0	38	K.QTALVELVK.H
570 – 581	671.7537	1341.4929	1341.6275	0	63	K.AVMDDFAAFVEK.C
570 – 581	671.7561	1341.4976	1341.6275	0	75	K.AVMDDFAAFVEK.C
570 – 581	679.7710	1357.5274	1357.6224	0	77	K.AV**M**DDFAAFVEK.C + **Oxidation (M)**

4.3.4. Oxidación de metionina

Junto con la Cys34, los aminoácidos más sensibles a la oxidación en esta proteína son los seis residuos de metionina (Met87 y Met123 en el dominio I; Met298 y Met329 en el dominio II; Met446 y Met548 en el dominio III).[44] En particular, los residuos de Met y Cys representan del 40 al 80% de la actividad antioxidante total de la HSA. En la Tabla 8 se informa el patrón de oxidación para cada metionina. Como se esperaba en la muestra del sujeto de control, el número de metionina oxidada es menor que en los sujetos con EHA. En la elevada condición de estrés oxidativo que afecta a los pacientes con EHA, de hecho, los residuos de metionina actuaron como grupos antioxidantes evitando la oxidación de otros residuos de proteínas.[12]

Tabla 9. Perfil de oxidación de Metionina

METIONINA	CTRL	EHA 1	EHA 2	EHA 3
111	No	Si	No	No
147	n.d	n.d	No	No
322	Si	Si	Si	Si
353	No	Si	Si	Si
470	Si	Si	Si	Si
572	No	Si	Si	Si
Met SUM	2	5	4	4

Tabla 10. Residuos de cisteína oxidada identificados en pacientes con EHA. La puntuación y el rango se refieren al péptido que contiene el residuo indicado.

RESIDUOS CISTEINA	SCORE	RANK
313	70	1
384	68	1
385	68	1
485	65	1
501	34	1
511	34	1
582	13	1
585	13	1

Cada oxidación de metionina consiste en un incremento de masa de 16 Da, por lo tanto, seis metionina oxidada podrían determinar un incremento de 96 Da explicando la señal en el espectro deconvolucionado a +96 Da. Sin embargo, los análisis permitieron la detección de solo cinco metioninas oxidadas pero, considerando la complejidad de la muestra y la cobertura del 50% de la proteína, podemos especular que hay otras metioninas oxidadas presentes pero no detectadas.

4.3.5. Oxidación de cisteína

Como se informó en la sección de introducción, la HSA contiene 35 residuos de Cys que forman 17 puentes disulfuro, con el único residuo de Cys reducido ubicado en la posición 34, la cisteína ubicada en una región hidrófoba en el dominio I.[55] La Cys34 representa la mayor fracción de tiol libre en el plasma humano y, sorprendentemente, está completamente conservada en la albúmina de suero de mamífero. En un trabajo anterior la Cys34 se encontró libre, cisteinilada y oxidada irreversiblemente a ácido sulfínico.[6,32,47] La oxidación de la cisteína 34 afecta, obviamente, las propiedades antioxidantes de la HSA. En el presente trabajo focalizamos el análisis sobre la caracterización del estado oxidativo de otros residuos de cisteína que forman los puentes

disulfuro. Los 17 puentes disulfuro contribuyen significativamente a la estabilidad de HSA y dejan en claro su larga vida biológica. Curiosamente, los análisis realizados mostraron que, en las condiciones de estrés oxidativo, como la del paciente con EHA, incluso los puentes disulfuro pueden romperse y el grupo sulfidrilico libre de la cisteína puede oxidarse irreversiblemente a ácido sulfónico. Los residuos de cisteína oxidada junto con su puntuación de identificación y rango se muestran en la Tabla 10. Como se informa en las pautas de Mascot, en el rango 1 una puntuación > 40 indica homología y > 45 indica identidad.

La oxidación de un residuo de cisteína implica un incremento de masa de 48 Da, por lo que la señal a +96 Da podría explicarse con la oxidación de dos residuos de cisteína. En cuanto a la señal a +216 Da, puede derivar de la combinación de una cisteinilación de cisteína (probablemente al nivel de Cys34) combinada con una doble trioxidación (+96 Da) en uno de los otros residuos de Cys encontrados oxidados.

No es posible concluir la identificación unívoca de las isoformas desconocidas en +96 y +216 Da, sin embargo, los análisis mostraron que estas isoformas son el producto de una oxidación marcada en residuos de cisteína y/o metionina.

4.4.Caracterización de HSA en una población de EHA

Dado que el objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de las condiciones drásticas de estrés oxidativo sobre la integridad estructural de la HSA, se aplicó el método Nano LC-MS/MS para la caracterización de isoformas de la HSA para el cribado preliminar de una población de 10 pacientes con EHA. Los resultados se compararon con los obtenidos de los análisis de plasma de una población de 10 voluntarios sanos.

El porcentaje de abundancia relativa de las isoformas se calculó dividiendo la intensidad de la isoforma obtenida del espectro deconvolucionado y sustraído de la línea de base por la suma de todas las intensidades de las isoformas y multiplicándolas por 100. Los datos se analizaron con Excel y se informa la abundancia relativa de las isoformas junto con la desviación estándar en la Tabla 10.

A partir de los datos obtenidos, se evidencia de inmediato un cambio drástico en la estructura de las HSA. En primer lugar, el porcentaje relativo de albúmina sérica nativa sin modificar se reduce drásticamente. Comparando este resultado con los obtenidos por Domenicali et al.[33,38,53] en un estudio sobre la caracterización de HSA en pacientes afectos de cirrosis, se puede observar que en el caso de la cirrosis la cantidad relativa de HSA nativa disminuyó de 7-9% mientras que en los pacientes con EHA la disminución

se atestiguó alrededor del 22%. Este efecto puede atribuirse a las condiciones de estrés oxidativo que conducen tanto a la formación de nuevos puentes disulfuro con residuos de cisteínas libres como a la oxidación de residuos de cisteína y metionina HSA. Esta hipótesis está respaldada por el fuerte aumento de las isoformas cisteiniladas y oxidadas como se indica en la última columna de la Tabla 11.

Tabla 11. La abundancia relativa de isoformas para sujetos sanos como para pacientes con EHA.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES HSA	CONTROL VOLUNTARIOS		PACIENTES EHA		% INCREMENTO Y DISMINUCION
	% ABUNDANCIA RELATIVA	%RSD	ABUNDANCIA RELATIVA	%RSD	
HSA-DA	1,15	0,42	2,31	1,28	+100,8
HSA-L	1,19	1,15	1,78	1,64	-6,8
HSA+Cys-DA	0,71	0,18	1,42	1,20	+100
HSA (DHA)	1,68	0,27	2,31	1,12	+37,5
HSA	61,96	4,84	35,71	5,90	-42,4
HSA+SO_2H	5,36	1,31	4,58	1,85	-14,2
HSA+96	0,00	5,19	8,30	4,40	+830
HSA+Cys	19,84	1,10	28,14	5,19	+41,8
HSA+Glyc	5,51	0,62	4,04	1,92	-26,7
HSA+216	0,00	0,42	6,99	4,31	+699

CAPÍTULO V. DISCUSIONES

En el presente estudio se realizó la identificación de las alteraciones estructurales y funcionales de la molécula de HSA, además de los cambios postraduccionales, en pacientes con EHA, mediante el uso de una técnica de espectrometría de masas avanzada, se identificaron y caracterizaron productos oxidativos más relevantes en HSA. Así, el análisis global de la integridad estructural y funcional de la albúmina, realizado en una serie de pacientes con EHA, nos abre la posibilidad de desentrañar la relevancia clínica y pronóstica de la alteración en la molécula de HSA que se produce durante la enfermedad hepática crónica avanzada.[20,52]

En este estudio, los cambios estructurales postraduccionales de la albúmina en pacientes alcohólicos, que se encuentran bajo stress oxidativo, fueron evaluados por NanoHPLC-ESI-MS/MS y MALDI-TOF. Esta técnica proteómica proporciona un espectro de moléculas de alta resolución, discriminando entre isoformas cuyas moléculas de peso difiere en unos pocos daltons. Además, este enfoque permite la determinación simultánea de todos los cambios que ocurren en la molécula, lo que es de particular relevancia en el caso de HSA circulante que se caracteriza por una alta microheterogeneidad. La fiabilidad de esta técnica ha sido demostrada en este estudio y otros estudios previos. [17].Además, la identificación de isoformas de HSA por digestión de proteínas plasmáticas seguida de Nano HPLC-ESI-QTOF y MALDI-TOF, que realizamos en el presente estudio, confirmó la naturaleza de las alteraciones estructurales de HSA identificadas, proporcionando así evidencia de su validez.[11]

En particular, se modificó la separación cromatográfica con el fin de reducir el tiempo de análisis manteniendo una buena selectividad. La columna cromatográfica de sílice C4 tradicional se reemplazó por una columna monolítica C4 de dimensiones reducidas. Los soportes monolíticos están destinados principalmente a separaciones rápidas, eficientes y reproducibles de biomoléculas como proteínas grandes, ADN plasmídico y partículas virales. La optimización de una elución en gradiente fue posible logrando una buena resolución de HSA de otras proteínas plasmáticas en menos de 12 minutos sin comprometer la sensibilidad y selectividad del análisis

Esta técnica tiene importantes ventajas sobre las utilizadas en estudios previos de pacientes con EHA y cirrosis, cuando solo se abordan las alteraciones estructurales en el sitio de Cys34.[63] La aplicación de HPLC-ESI-MS/MS nos permitió identificar y

cuantificar la proporción relativa tanto de la HSA nativa sin modificar como de las diferentes isoformas moleculares de HSA que resultan de cambios estructurales postraduccionales que no solo ocurren en el residuo Cys34, sino también en los otros sitios de la molécula. Además, el rendimiento más alto de HPLC-ESI-MS/MS permite imaginar su uso en el entorno de laboratorio clínico.[52]

A pesar de estos beneficios adicionales, algunas limitaciones de esta técnica merecen comentarlos. En primer lugar, con el fin de investigar todas las posibles alteraciones postraduccionales de la albúmina, centramos nuestra atención en el rango de masas de 65.800-67.100Da. Este rango está alrededor del peso molecular de HSA nativo esperado (66,439Da) e incluye isoformas de HSA bien caracterizadas, truncadas y oxidadas, que representan casi todas las HSA circulantes. Aunque no pudimos excluir la existencia de isoformas de HSA adicionales con peso molecular fuera de este rango de masa, no debería constituir una cantidad significativa.[64] En segundo lugar, en el rango de masa que analizamos, se observaron algunos picos que representan isoformas no tipificadas además de las ocho isoformas bien caracterizadas. Estos picos se excluyeron del análisis porque estaban escasamente representados tanto en los controles como en los pacientes con EHA. Finalmente, HPLC-ESI-MS/MS no permite, en la actualidad, evaluar la concentración plasmática de las isoformas de HSA. Sin embargo, esto no impide evaluar el efecto de su abundancia relativa sobre las variables evaluadas en este estudio.[53]

El primer hallazgo importante del presente estudio es que la estructura molecular de la HSA está muy alterada en pacientes con EHA. De hecho, el alcance de muchos cambios moleculares postraduccionales, que también pueden detectarse a un nivel fisiológico bajo en sujetos sanos, aumentó significativamente en los pacientes EHA.[52] La cisteinilación fue la alteración más frecuente, que puede ocurrir sola o en combinación con otros cambios moleculares, incluido el truncamiento de la porción N-terminal y la glicosilación.[40] En un entorno prooxidante, a medida que se desarrolla en el plasma de pacientes con EHA avanzada, la cisteína circulante se oxida a disulfuro de cisteína, que interactúa con el grupo sulfhidrilo libre en el sitio de la albúmina Cys34 que experimenta un intercambio de disulfuro. Como resultado de esta oxidación reversible, se forma una proteína cisteinilada. Debido a que la Cys34 reducida representa la gran mayoría de los grupos sulfhidrilo libres en plasma totales, se puede esperar un deterioro significativo del sistema antioxidante circulante en el caso de oxidación extensa. Es probable que esto empeore en paralelo con la gravedad conllevando a cirrosis.[65]

La HSA sulfinilada, resultante de la oxidación irreversible del residuo de Cys34, también aumentó en los pacientes, a pesar de la diferencia con los controles sanos no alcanzó la significación estadística. Esto puede parecer en desacuerdo con estudios previos que muestran una elevación significativa de HNA2 en la cirrosis.[15,36] Por tanto, la oxidación irreversible de HSA podría considerarse un evento tardío en el curso de la cirrosis.

La HSA glicosilada también aumentó significativamente en los pacientes, pero esto se debió a que los pacientes podrían tener diabetes Mellitus según. Es bien sabido que la hiperglucemia sostenida produce una glicosilación no enzimática de varias proteínas circulantes, incluida la HSA. Este proceso afecta tanto a la estructura como a la función de la molécula, afectando la capacidad de unión y desintoxicación de la HSA. Como ejemplo, la capacidad de unir bilirrubina de HSA glicosilada se reduce hasta en un 50%. El hallazgo de que HSA1-GLYC se correlacionó inversamente con los marcadores de gravedad de la enfermedad difiere con respecto a lo que encontramos con la mayoría de las isoformas de HSA y sugiere que la diabetes, más que la progresión de la cirrosis por EHA, favorece este defecto.[66]

Entre las alteraciones estructurales reveladas por los espectros de masas, la cisteinilación fue la más frecuente. Se encontró que esta alteración ocurre sola o en combinación con otros cambios moleculares, entre los que se encuentran el truncamiento de la porción N-terminal de la molécula y la glicosilación del ambiente prooxidante, que se desarrolla en el plasma de pacientes con EHA. De hecho, en este escenario, la cisteína circulante se oxida a disulfuro de cisteína, que interactúa con el grupo sulfhidrilo libre en el sitio Cys34 de la albúmina que experimenta un intercambio de disulfuro como resultado de esta oxidación reversible. Dado que la Cys34 reducida representa la gran mayoría de los grupos sulfhidrilo libres del plasma total, se puede esperar un deterioro significativo del sistema antioxidante circulante en el caso de una oxidación extensa.[54] Confirmando estos resultados, encontramos una correlación positiva significativa entre todas las isoformas de HSA cisteiniladas y la gravedad de la EHA. El estrés oxidativo es un sello distintivo de la enfermedad hepática crónica y su extensión es análoga a la gravedad conllevando a una cirrosis alcohólica, siendo uno de los mecanismos que conducen a la muerte celular y la insuficiencia orgánica en pacientes con cirrosis avanzada. También se encontraron mayores modificaciones oxidativas a la molécula de HSA que involucran el residuo Cys34, este fue el caso de la sulfinilación (HSA-SO2H), una oxidación irreversible del grupo tiol libre en la molécula de albúmina. Esta isoformas de albúmina es parte de la

fracción no mercaptalbúmina-2 (HNA2), cuya cantidad se encontró previamente al correlacionar con la gravedad de la EHA y predecir la mortalidad de los pacientes. En el presente estudio, aunque ligeramente aumentado, la cantidad relativa de la isoforma HSA-SO2H no se vio afectada significativamente por la presencia de cirrosis alcohólica.[9] Por lo tanto, la cisteinilación de la molécula de HSA depende de la concentración. La digestión tríptica de las muestras de plasma que fueron analizadas en HPLC-ESI-MS/MS mostró que cada isoforma de HSA resultó de la formación de un enlace disulfuro entre dos residuos de Cys34 ubicados en dos moléculas de HSA diferentes Figura 10.[65] Confirmando este resultado, la isoforma de HSA dimérica más abundante que encontramos en muestras de plasma tanto de controles sanos como de pacientes EHA fueron aquellas caracterizadas por un residuo de Cys34 libre en su forma monomérica.[67,68] También se descubrió que la glicosilación de la molécula de HSA contribuye significativamente a la microheterogeneidad de HSA circulante tanto en pacientes como en controles. La glicosilación de proteínas es una alteración común promovida por el estrés glucémico. Esta alteración afecta tanto a la estructura como a la función de la molécula de HSA, deteriorando su capacidad de unión y desintoxicación. La aparición de glicosilación de proteínas en pacientes EHA y cirróticos puede ser esperado ya que aproximadamente un tercio de estos pacientes sufren de diabetes mellitus. De hecho, encontramos que todas las isoformas de HSA glicosiladas (HSA+ GLYC; HSA+CYS+GLYC) aumentaron significativamente en pacientes EHA con respecto a controles sanos.[36,40] Finalmente, también se encontraron isoformas truncadas N- y C-terminales en muestras de plasma de pacientes EHA y controles sanos. La porción N-terminal de la molécula de HSA es provista de una molécula de actividad antioxidante indirecta es capaz de quelar iones metálicos, contribuyendo así a la reducción de especies reactivas al unirse a metales libres Cu (I/II) y Fe (II), que son potentes potenciadores de la producción de radicales libres. Por el contrario, se atribuyó al truncamiento de la parte C-terminal de la molécula una estabilidad de la proteína deteriorada que conduce a un acortamiento de la vida media circulante de la HSA. Si bien se encontró un aumento significativo de la isoforma N-terminal truncada y cisteinilada (HSA-DA+CYS) en pacientes EHA con respecto a los controles sanos, la abundancia relativa de isoforma HSA se caracteriza solo por el truncamiento de la C- o N- terminal, los residuos de aminoácidos no difirieron entre los dos grupos, siendo también ligeramente más bajos en los pacientes que en los controles.[22,38,47] Otro hallazgo del presente estudio es la

asociación existente entre isoformas específicas de HSA y características clínicas de la cirrosis, independientemente de la gravedad de la enfermedad. Las isoformas de HSA monoméricas y diméricas que se encuentran asociadas a estas complicaciones se caracterizaron principalmente por una oxidación reversible o irreversible del residuo Cys34, lo que subraya la relevancia del estrés oxidativo sistémico en la patogenia del evento que conduce a la descompensación aguda de la enfermedad.[13,20] Por otro lado, también es razonable plantear la hipótesis de que el entorno prooxidante y proinflamatorio que se produce durante estas complicaciones, caracterizado por un aumento de la actividad proteasa, y una tormenta de citocinas proinflamatorias y radicales libres, puede favorecer las múltiples alteraciones estructurales a la molécula HSA demostrada en el presente estudio.[16]

El presente estudio no pudo determinar los mecanismos exactos subyacentes a estas asociaciones. Sin embargo, es razonable plantear la hipótesis de que el estado prooxidante e inflamatorio que ocurre durante estas complicaciones, caracterizado por una mayor actividad proteasa, liberación de citocinas proinflamatorias y generación de radicales libres, puede favorecer las múltiples alteraciones de la HSA demostradas por este estudio. Dada la sorprendente extensión de los daños moleculares de la HSA observados en pacientes con EHA, resulta bastante claro que la cantidad de HSA "sana" estructural conservada es mucho menor que la concentración sérica real de albúmina. Debido a que las isoformas de HSA alteradas aumentan en paralelo con la progresión de la EHA, significa que, en pacientes con una enfermedad avanzada, las actividades antioxidantes, depuradoras y de unión de la albúmina se reducen drásticamente. Por lo tanto, no es sorprendente que la isoforma HSA1CYS-DA fuera un fuerte predictor de supervivencia a un año según las Naldi et al.[17,57] Curiosamente, la proporción residual de la HSA nativa sin modificar, que no se asoció con ninguna complicación específica, pero refleja todas las anomalías moleculares que ocurren, también fue un predictor de supervivencia, mucho mejor que la concentración sérica total de albúmina, un pronóstico establecido factor en pacientes con EHA. Cabe señalar que el poder pronóstico de la concentración de albúmina sérica se ha evaluado habitualmente durante períodos más prolongados que el seguimiento de 1 año en diversas investigaciones Dominicale et al. [17,33] Por lo tanto, al menos en el contexto clínico evaluado en el presente estudio, la evaluación de la isoforma HSA nativa proporcionaría un valor pronóstico incremental sobre la concentración total de albúmina.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se reveló que el estrés oxidativo severo, como se desarrolla en pacientes con EHA, está asociado a cambios profundos en la microheterogeneidad circulante de la HSA. Tal resultado se logró al innovador método analítico desarrollado, a saber, la resolución cromatográfica de HSA a partir de otra proteína plasmática acoplada a los análisis espectrométricos de masas, que permitió la determinación rápida y reproducible de la abundancia relativa de isoformas HSA en muestras de plasma de pacientes EHA.

Esta investigación nos ha permitido comprender mejor qué sucede con la albúmina sérica humana en el caso de la EHA. Además de una disminución significativa en la producción de albúmina, que se usa comúnmente en la clínica para estimar la gravedad de la enfermedad, se ha demostrado que los cambios estructurales en la proteína ya aumentan a nivel de monómero. Algunas de estas modificaciones, como la oxidación y la cisteinilación, involucran a Cys34 al modificar el grupo sulfhidrilo que confiere gran parte de su poder antioxidante a la proteína y que representa un sitio de unión para numerosas moléculas, incluidos algunos fármacos. También el truncamiento del extremo N terminal, capaz de unir algunos iones divalentes como el cobre y el hierro evitando la reacción de Fenton involucrada en la formación de radicales libres, afecta el potencial antioxidante de la proteína. Los cambios estructurales también se ven agravados por la participación de un pequeño porcentaje de albúmina en la formación del dímero. Dado que aquí se ha demostrado que la formación del dímero ocurre precisamente al nivel de la cisteína 34, también en este caso se ven comprometidas las propiedades biológicas de la proteína, excepto las del regulador oncótico.

En este estudio las anomalías estructurales descritas anteriormente, se encontró que la cantidad residual de la isoforma HSA nativa sin cambios se redujo significativamente en pacientes con EHA. Dado que la cantidad de HSA nativa residual está profundamente influenciada por el amplio espectro de alteraciones estructurales que ocurren en pacientes EHA que presentan características clínicas diferentes, no es sorprendente que la HSA nativa surgiera como un mejor predictor de supervivencia a 1 año que la concentración de albúmina sérica total que era un marcador pronóstico establecido y ampliamente aceptado en el campo de la enfermedad hepática crónica. Desde este punto de vista,

mientras que la concentración de albúmina sérica total solo refleja la capacidad funcional residual del hígado, la HSA nativa incluye información sobre la función hepática y el estado redox sistémico que permite predecir mejor el pronóstico a medio plazo.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertholf RL. Proteins and albumin. Lab Med. 2014;45(1):e25–41.

2. Sun L, Yin H, Liu M, Xu G, Zhou X, Ge P, et al. Impaired albumin function: a novel potential indicator for liver function damage? Ann Med [Internet]. 2019;51(7–8):333–44. http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2019.1693056

3. Lepedda AJ, Zinellu A, Nieddu G, De Muro P, Carru C, Spirito R, et al. Human serum albumin Cys34 oxidative modifications following infiltration in the carotid atherosclerotic plaque. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014.

4. Tufoni M, Baldassarre M, Zaccherini G, Antognoli A, Caraceni P. Hemodynamic and Systemic Effects of Albumin in Patients with Advanced Liver Disease. 2020;

5. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Redox albuminomics: Oxidized albumin in human diseases. Antioxidants Redox Signal. 2012;17(11):1515–27.

6. Anraku M, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet]. 2013;1830(12):5465–72.http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.036

7. Bruschi M, Candiano G, Santucci L, Ghiggeri GM. Oxidized albumin. the long way of a protein of uncertain function. Biochim Biophys Acta - Gen Subj http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.017.

8. Spinella R, Sawhney R, Jalan R. Albumin in chronic liver disease : structure , functions and therapeutic implications. Hepatol Int. 2015;

9. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidattiv/e/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. Mass Spectrom Rev. 2005;24(1):55–99.

10. Omenn GS, Lane L, Overall CM, Corrales FJ, Schwenk JM, Paik Y-K, et al. Proteome : 2019 Metrics from the HUPO Human Proteome Project. J Proteome Res. 2019;18(12):4098–107.

11. Amoresano A, Andolfo A, Siciliano RA, Cozzolino R, Minchiotti L, Galliano M, et al. Analysis of human serum albumin variants by mass spectrometric procedures. Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol. 1998;1384(1):79–92.

12. Oettl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. [Internet]. 1st ed. Vol. 474, Methods in enzymology. Elsevier Inc.; 2010. 181–195. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(10)74011-8

13. Ohn T, Anderson P. The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules. Vol. 1, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2010. p. 486–93.

14. Osaki F, Goto T, Lee SH, Oe T. Predicted multiple selected reaction monitoring to screen activated drug-mediated modifications on human serum albumin. Anal Biochem. 2014;449(1):59–67.

15. Kleinova M, Belgacem O, Pock K, Rizzi A, Buchacher A, Allmaier G. Characterization of cysteinylation of pharmaceutical-grade human serum albumin by electrospray ionization mass spectrometry and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19(20):2965–73.

16. Miyamura S, Imafuku T, Anraku M, Taguchi K, Yamasaki K, Tominaga Y, et al. Comparison of Posttranslational Modification and the Functional Impairment of Human Serum Albumin in Commercial Preparations. J Pharm Sci [Internet]. 2016;105(3):1043–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2015.12.015

17. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, Giannone FA, Bossi M, Montomoli J, et al. Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. J Pharm Biomed Anal. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.048

18. Wang S, Liu S, He J, David H. Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle Abstract. Heal Sci J. 2020;14(2):1–8. http://www.hsj.gr/

19. Otagiri M, Chuang VTG. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. Biol Pharm Bull. 2009;32(4):527–34.

20. Aggarwal S, Banerjee SK, Talukdar NC, Yadav AK. Post-translational Modification Crosstalk and Hotspots in Sirtuin Interactors Implicated in Cardiovascular Diseases. Front Genet. 2020;11(April):1–15.

21. Abedini A, Gupta R, Marek P, Meng F, Raleigh DP, Taskent H, et al. Role of Posttranslational Modifications in Amyloid Formation. In: Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies. John Wiley and Sons; 2010. p. 131–44.

22. Brook S, Biology S. Role of Posttranslational. :131–44.

23. Biosyst M, Salzano AM, Renzone G, Scaloni A. Molecular BioSystems Human serum albumin modifications associated with reductive radical stress w. 2011;889–98.

24. Bruschi M, Candiano G, Santucci L, Ghiggeri GM. Oxidized albumin. the long way of a protein of uncertain function. Biochim Biophys Acta - Gen Subj .http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.017

25. Altomare A, Baron G, Brioschi M, Longoni M, Butti R, Valvassori E, et al. N-acetyl-cysteine regenerates albumin cys34 by a thiol-disulfide breaking mechanism: An explanation of its extracellular antioxidant activity. Antioxidants. 2020;9(5):1–16.

26. Cara G Di, Militello V, Sancataldo G, Vetri V, Fodera V, Leone M. Oxidation Enhances Human Serum Albumin Thermal Stability and Changes the Routes of Amyloid Fibril Formation. 2014;9(1).

27. Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. Mol Aspects Med [Internet]. 2012;33(3):209–90. http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002

28. Grigoryan H, Li H. Cys34 adducts of reactive oxygen species in human serum albumin. Chem Res. 2012;25(8):1633. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx300096a

29. Grigoryan H, Schiffman C, Gunter MJ, Naccarati A, Polidoro S, Dagnino S, et al. CYS34 adductomics links colorectal cancer with the gut microbiota and redox biology. Cancer Res. 2019;79(23):6024–31.

30. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Tooth D, Sadler PJ. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. FEBS J. 2005;272(2):353–62.

31. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. PLoS One. 2014;9(1).

32. Grigoryan H, Li H, Iavarone AT, Williams ER, Rappaport SM. Cys34 adducts of reactive oxygen species in human serum albumin. Chem Res Toxicol. 2012;25(8):1633–42.

33. Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, Bartolini M, Caraceni P. Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis. J Pharm Biomed Anal.2017;144:138–53. .http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.023

34. Spanidis Y, Priftis A, Stagos D, Stravodimos GA, Leonidas DD, Spandidos DA, et al. Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race. Exp Ther Med. 2017;13(5):2382–90.

35. Paramasivan S, Adav SS, Ngan SFC, Dalan R, Leow MKS, Ho HH, et al. Serum albumin cysteine trioxidation is a potential oxidative stress biomarker of type 2 diabetes mellitus. Sci Rep. 2020;10(1):1–12.http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-62341-z

36. Gillery P, Jaisson S. Usefulness of non-enzymatic post-translational modification derived products (PTMDPs) as biomarkers of chronic diseases. J Proteomics. 2013;92:228–38.

37. Li H, Grigoryan H, Funk WE, Lu SS, Rose S, Williams ER, et al. Profiling Cys34 adducts of human serum albumin by fixed-step selected reaction monitoring. Mol Cell Proteomics. 2011;10(3):M110.004606.

38. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, Naldi M, Mastroroberto M, Biselli M, et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: Clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. Hepatology. 2014;60(6):1851–60.

39. Carlsson H, Rappaport SM, Törnqvist M. Protein adductomics: Methodologies for untargeted screening of adducts to serum albumin and hemoglobin in human blood samples. High-Throughput. 2019;8(1).

40. Nagumo K, Tanaka MM, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, et al. Post-translational Modification Crosstalk and Hotspots in Sirtuin Interactors Implicated in Cardiovascular Diseases. J Pharm Sci [Internet]. 2019;83(1):1–10. Available from: https://doi.org/10.1007/s10337-019-03796-9

41. Beck JL, Ambahera S, Yong SR, Sheil MM, De Jersey J, Ralph SF. Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry. Anal Biochem. 2004;325(2):326–36.

42. Leblanc Y, Bihoreau N, Chevreux G. Characterization of Human Serum Albumin isoforms by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2018;1095:87–93. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.014

43. Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, Pedersen AO. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. EurJBiochem. 1990;189(0014-2956 SB-IM):343–9.

44. Wu D, Ph D, Cederbaum AI, Ph D. Oxidative Stress and Alcoholic Liver Disease.

45. Das SK, Vasudevan DM. Monitoring oxidative stress in patients with non-alcoholic and alcoholic liver diseases. Indian J Clin Biochem. 2005;20(2):24–8.

46. Nilsen J, Trabjerg E, Grevys A, Azevedo C, Brennan SO, Stensland M, et al. An intact C-terminal end of albumin is required for its long half-life in humans. Commun Biol .2020;3(1):1–11. http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-0903-7.

47. Virág D, Dalmadi-Kiss B, Vékey K, Drahos L, Klebovich I, Antal I, et al. Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. Chromatographia 2020;83(1):1–10. https://doi.org/10.1007/s10337-019-03796-9

48. Jalan R, Bernardi M. Effective albumin concentration and cirrhosis mortality: From concept to reality. J Hepatol. 2013;59(5):918–20: http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.001

49. Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, et al. The role of kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. Free Radic Biol Med. 2001;31(12):1544–9.

50. Nitroxides S, Mri P, Dobrynin S, Kutseikin S, Morozov D, Krumkacheva O, et al. An intact C-terminal end of albumin is required for its long half-life in humans. Eur J Mass Spectrom. 2013;3(1):326–36: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-62341-z

51. Rosa LC De, Nieto HMN. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. 2008;(1):156–63.

52. Mnatsakanyan R, Shema G, Basik M, Batist G, Borchers CH, Sickmann A, et al. Detecting post-translational modification signatures as potential biomarkers in clinical mass spectrometry. Expert Rev Proteomics. 2018;15(6):515–35. https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1483340

53. Naldi M, Giannone FA, Baldassarre M, Domenicali M, Caraceni P, Bernardi M, et al. A fast and validated mass spectrometry method for the evaluation of human serum albumin structural modifications in the clinical field. Eur J Mass Spectrom. 2013;19(6):491–6.

54. Watanabe H, Imafuku T, Otagiri M, Maruyama T. Clinical Implications Associated With the Posttranslational Modification–Induced Functional Impairment of Albumin in Oxidative Stress–Related Diseases. J Pharm Sci .2017;106(9):2195–203.http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.002

55. Klont F, Bras L, Wolters JC, Ongay S, Bischoff R, Halmos GB, et al. Assessment of Sample Preparation Bias in Mass Spectrometry-Based Proteomics. Anal Chem. 2018;90(8):5405–13.

56. Ding C, Jiang J, Wei J, Liu W, Zhang W, Liu M, et al. A fast workflow for identification and quantification of proteomes. Mol Cell Proteomics. 2013;12(8):2370–80.

57. Naldi M, Giannone F a., Baldassarre M, Domenicali M, Caraceni P, Bernardi M, et al. A fast and validated mass spectrometry method for the evaluation of human serum albumin structural modifications in the clinical field. Eur J Mass Spectrom. 2013;19(6):491–6.

58. Castellanos MM, Colina CM. Molecular Dynamics Simulations of Human Serum Albumin and Role of Disul fi de Bonds. 2013;

59. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP / GADD153 in endoplasmic reticulum stress. 2004;381–9.

60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44–84.

61. Anraku M, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(12):5465–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23644037

62. Fanali G, Di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. Mol Aspects Med. 2012;33(3):209–90. http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002

63. Damsten M, Commandeur J, Fidder a, Hulst A, Touw D, Noort D, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection of covalent binding of acetaminophen to human serum albumin. Drug Metab Dispos. 2007;35(8):1408–17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510247

64. Wang WQ, Jensen ON, Møller IM, Hebelstrup KH, Rogowska-Wrzesinska A. Evaluation of sample preparation methods for mass spectrometry-based proteomic

analysis of barley leaves. Plant Methods. 2018;14(1):1–13. https://doi.org/10.1186/s13007-018-0341-4.

65. Bunk DM, Welch MJ. Electrospray ionization mass spectrometry for the quantitation of albumin in human serum. J.Am.Soc.Mass Spectrom. 1997;8(12):1247–54.

66. Schwenk JM, Omenn GS, Sun Z, Campbell DS, Baker MS, Overall CM, et al. Nanoproteomics enables proteoform-resolved analysis of low-abundance proteins in human serum. Nat Commun. 2020;25(1):1–12. http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17643-1

67. Dobrynin S, Kutseikin S, Morozov D, Krumkacheva O, Spitsyna A, Gatilov Y, et al. Human serum albumin labelled with sterically-hindered nitroxides as potential MRI contrast agents. Molecules. 2020;25(7):5–9.

68. Tiambeng TN, Roberts DS, Brown KA, Zhu Y, Chen B, Wu Z, et al. Nanoproteomics enables proteoform resolved analysis of low abundance proteins in human serum. Nat Commun. 2020;11(1):1–12. http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17643-1

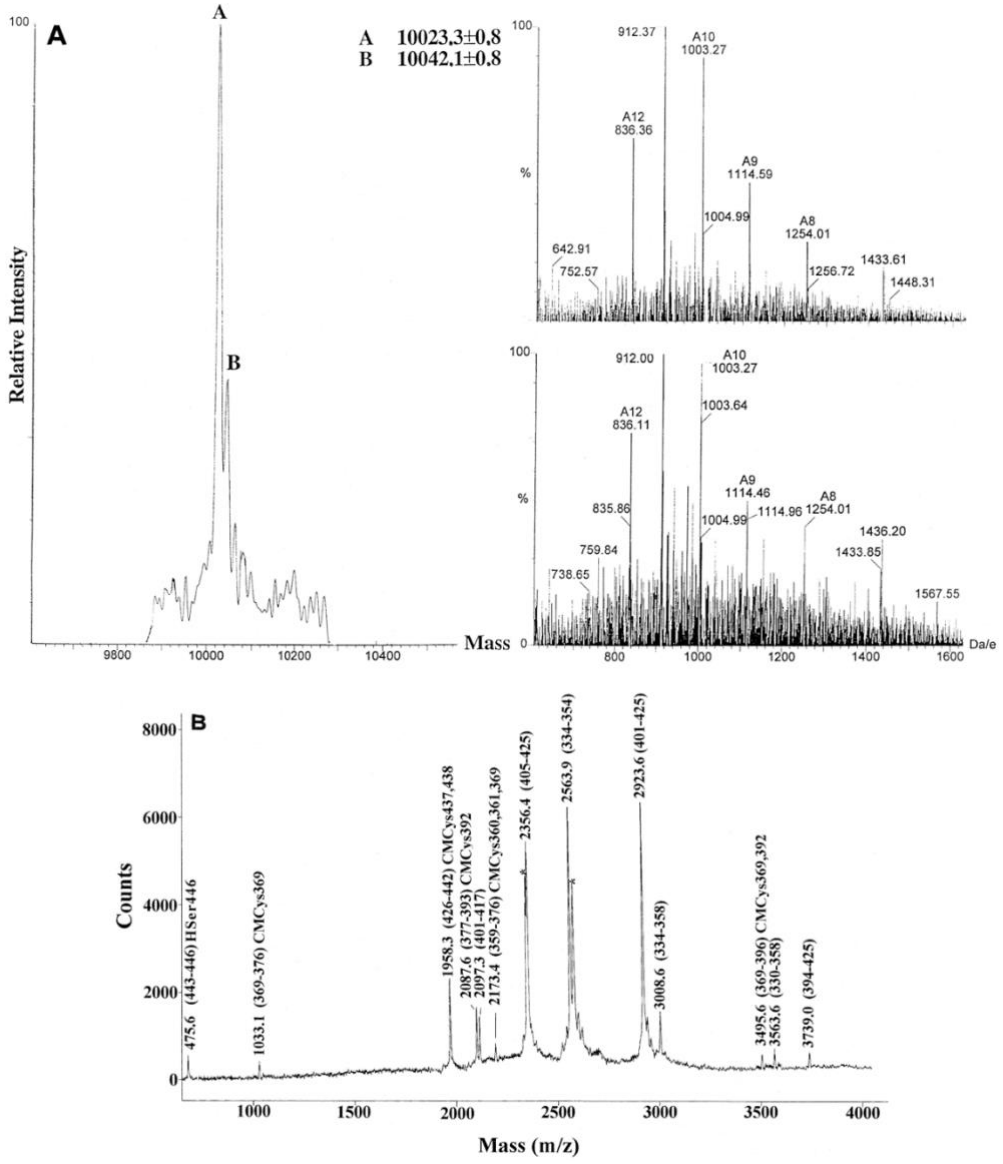


Figura 12. (A) Espectro de masas por electropulverización de CBr1 de HSA normal. (B) Espectro de EM-MALDI del péptido CBr5 de HSA normal subdigerido con endoproteinasa Glu-C.[11]

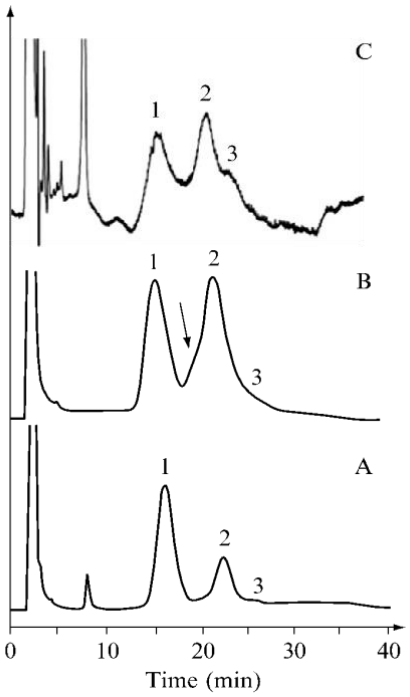


Figura 13. Análisis cromatográfico de HSA plasmática de (a) pacientes de control; (b) Pacientes cirróticos; (c) paciente con ACLF.[12]

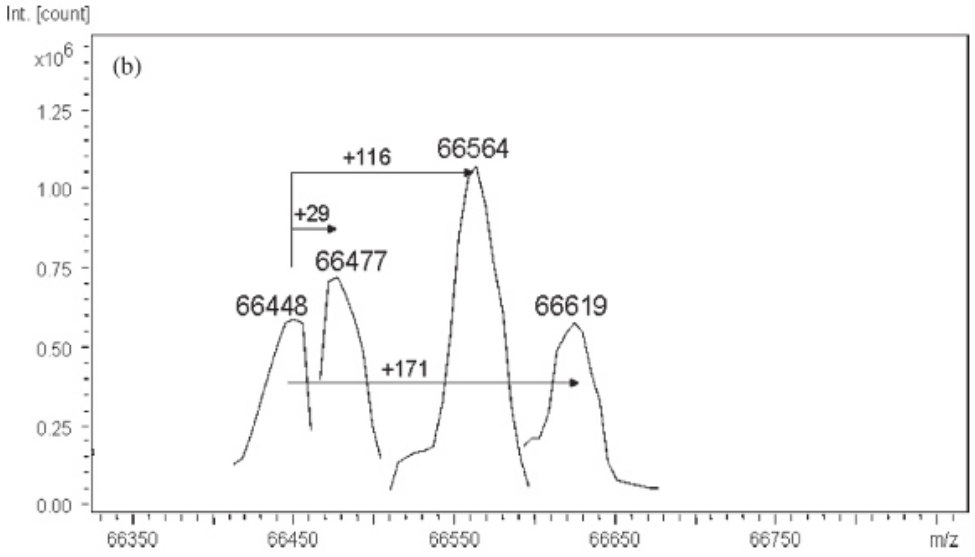


Figura 14. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra A.[12]

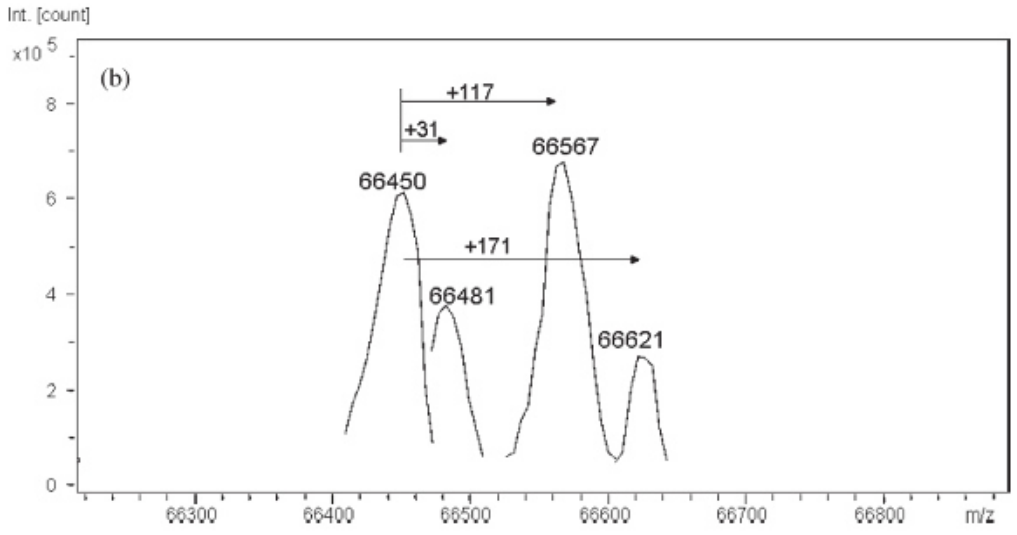


Figura 15. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra B.[12]

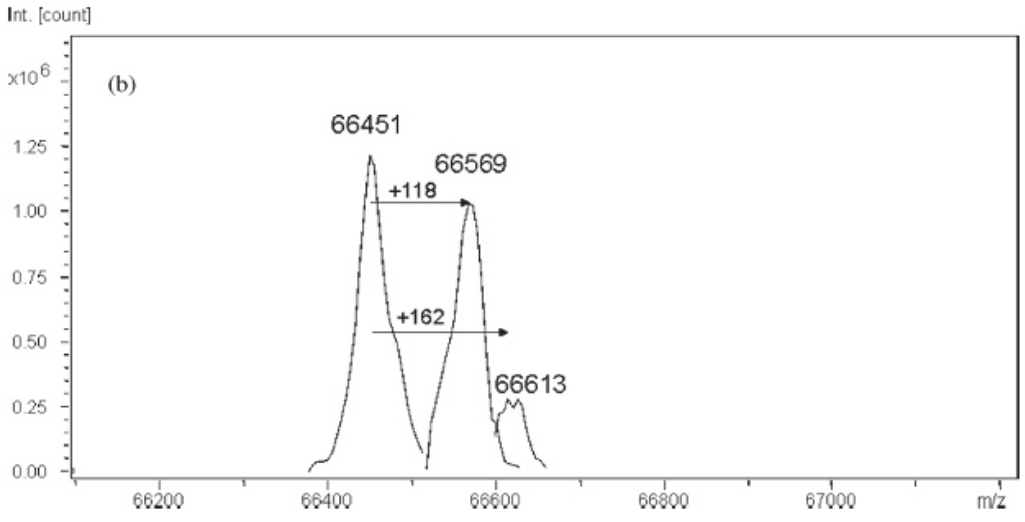


Figura 16. Espectro deconvolucionado de iones moleculares de la muestra C. [12]

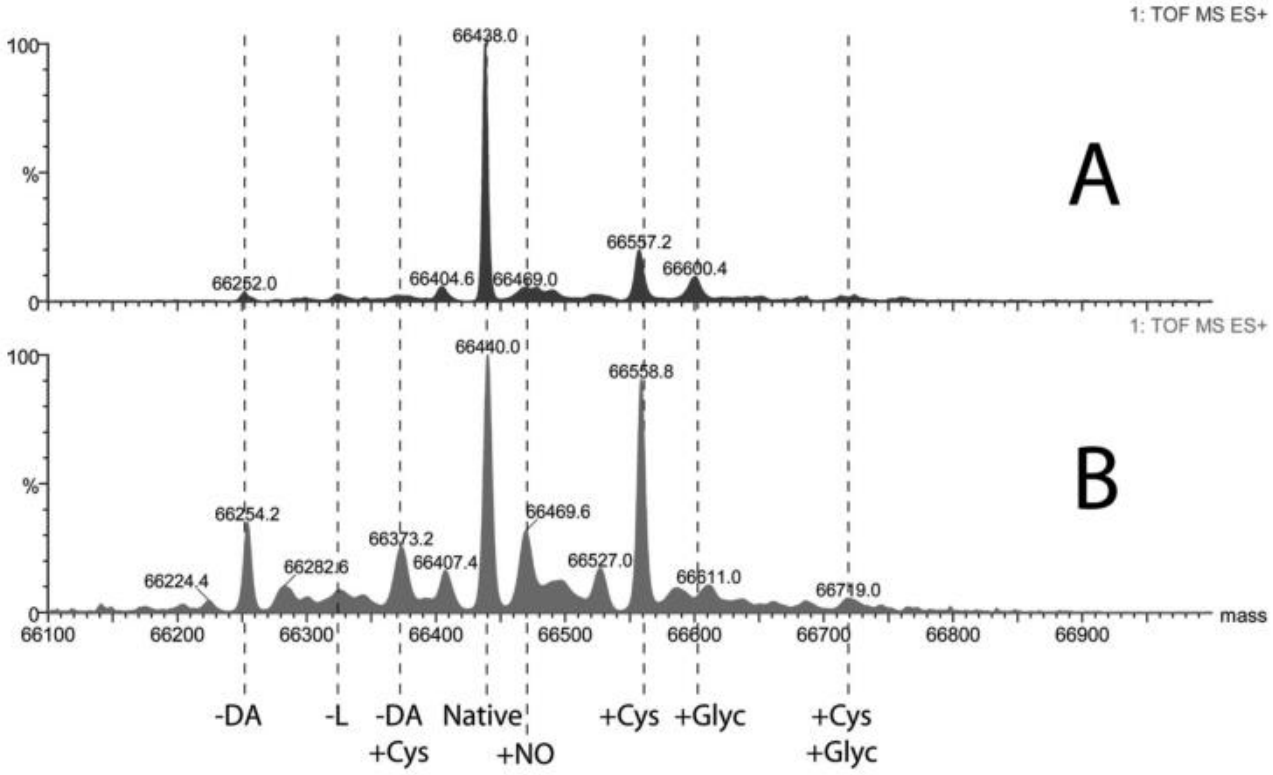


Figura 17. Espectros deconvolucionados de HSA de A) sujetos sanos y B) preparación comercial. [17]

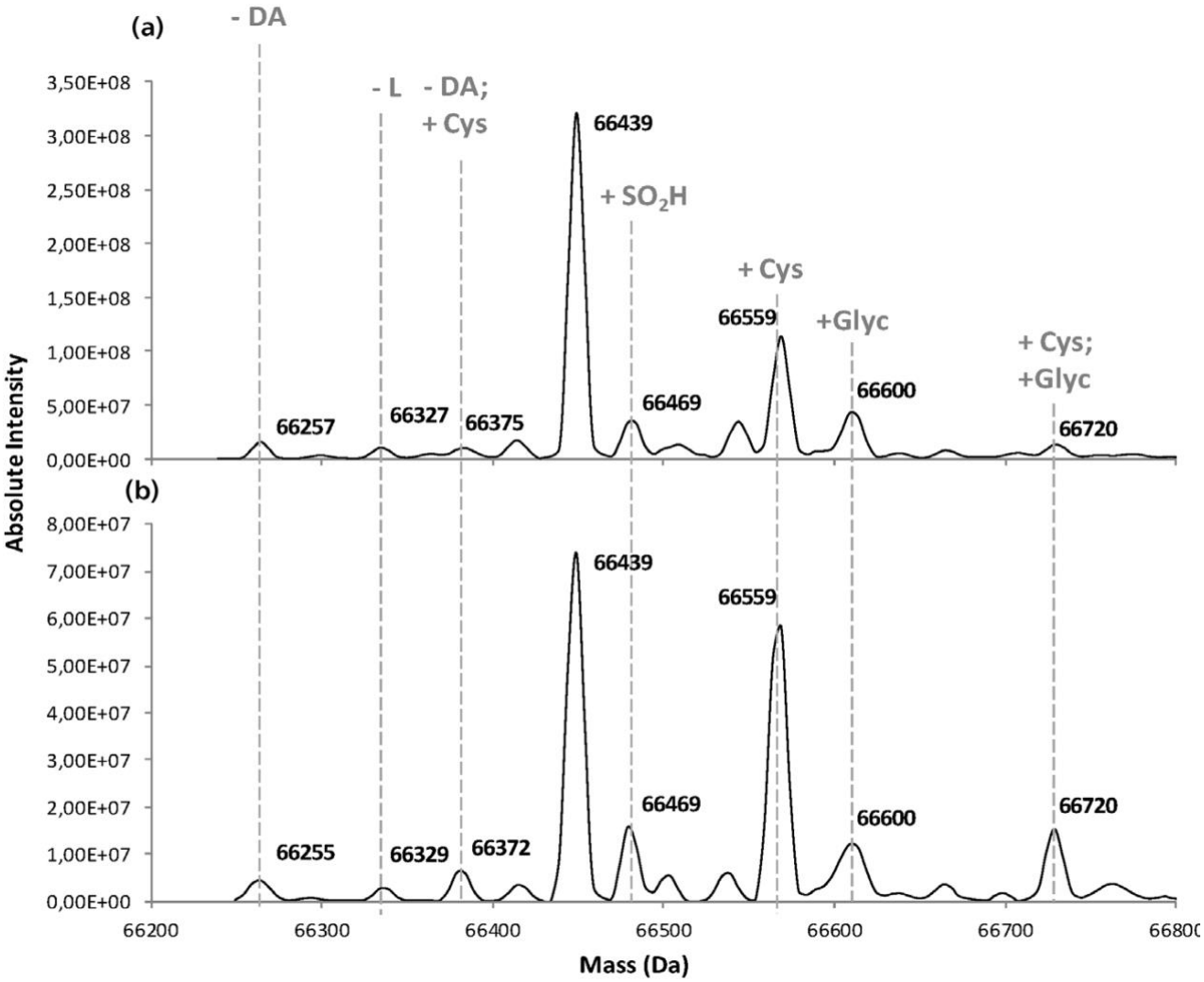


Figura 18. Espectro de ESI-MS deconvolucionado de HSA por (a) pacientes con TC y (b) pacientes con HC.[30]

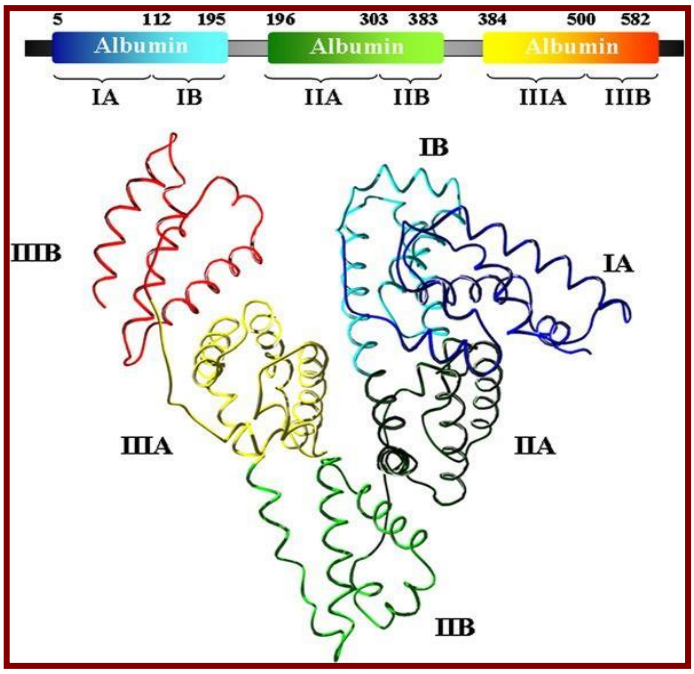


Figura 19. Organización de dominio modular de HSA[65]

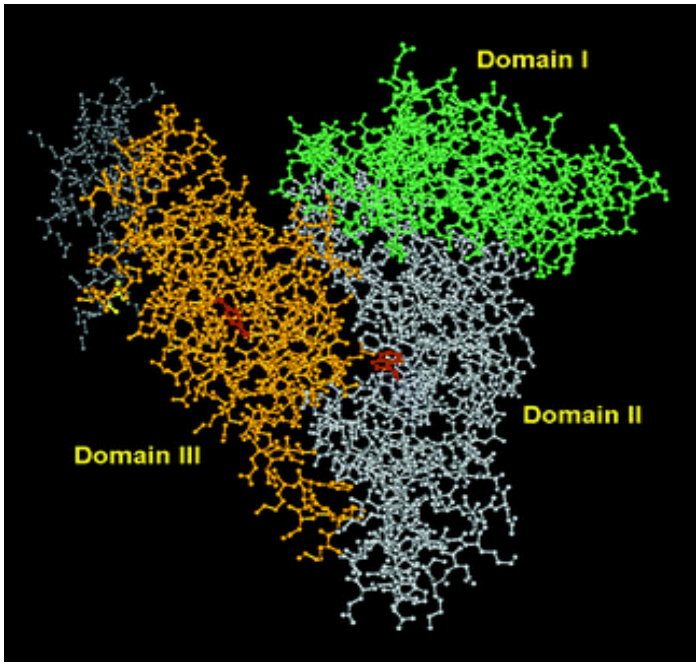


Figura 20. Estructura 3D de la albúmina humana, donde se visualiza tres dominios representativos.[65, 67]

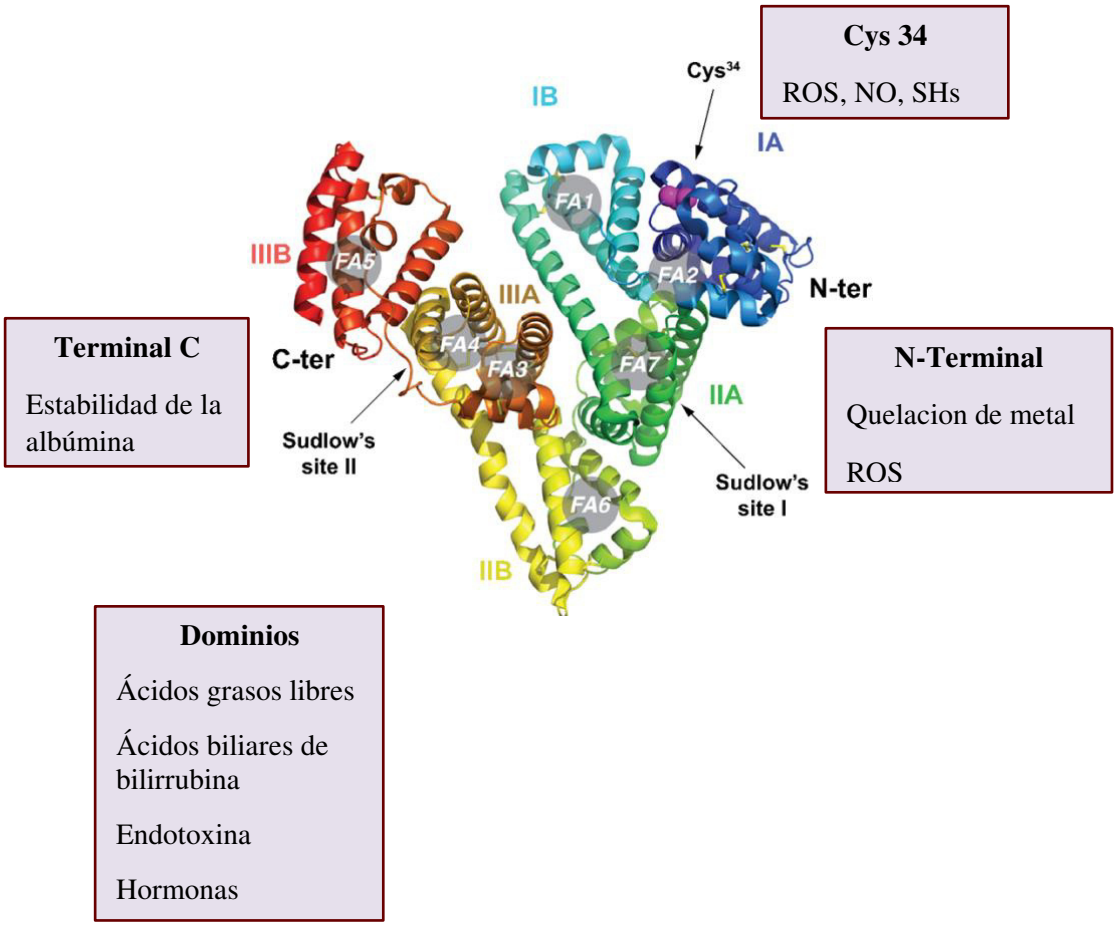


Figura 21. Diagrama representativo que muestra los principales dominios de unión de la molécula y sus funciones. [65,68]

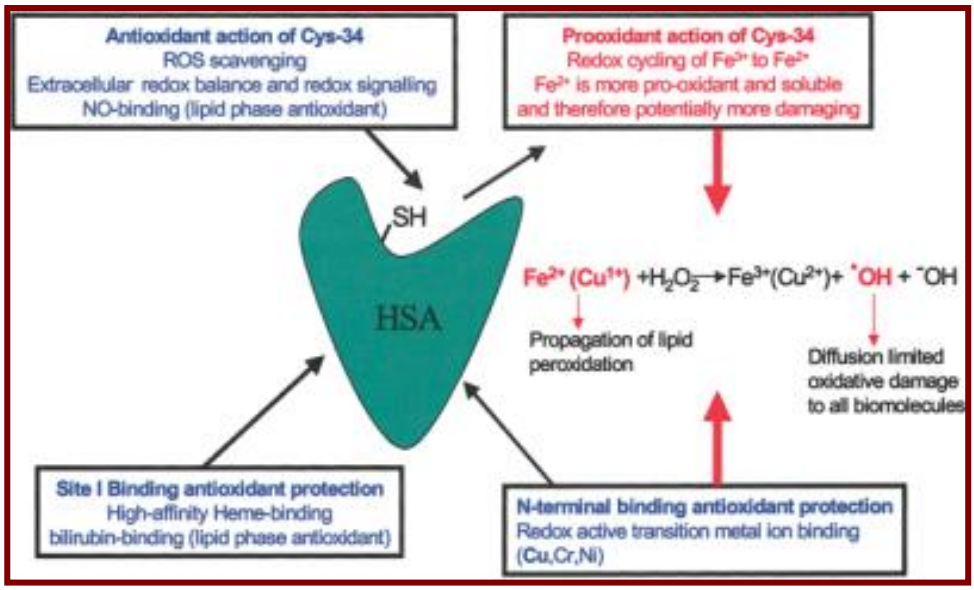


Figura 22. Propiedades antioxidantes y pro-oxidantes de la albúmina.[61]

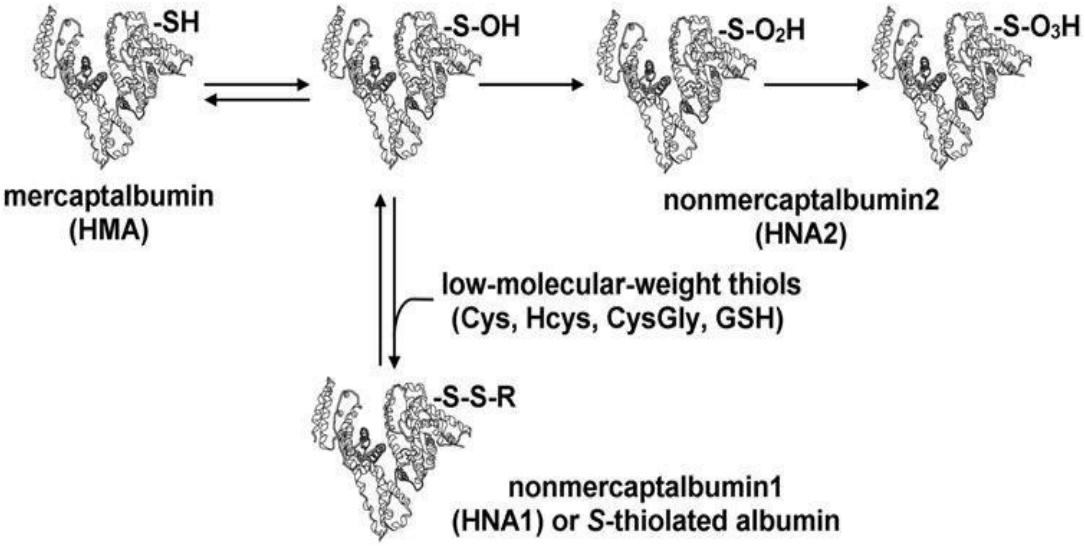


Figura 23. Principales modificaciones oxidativas del tiol de la albúmina Cys34. [57]

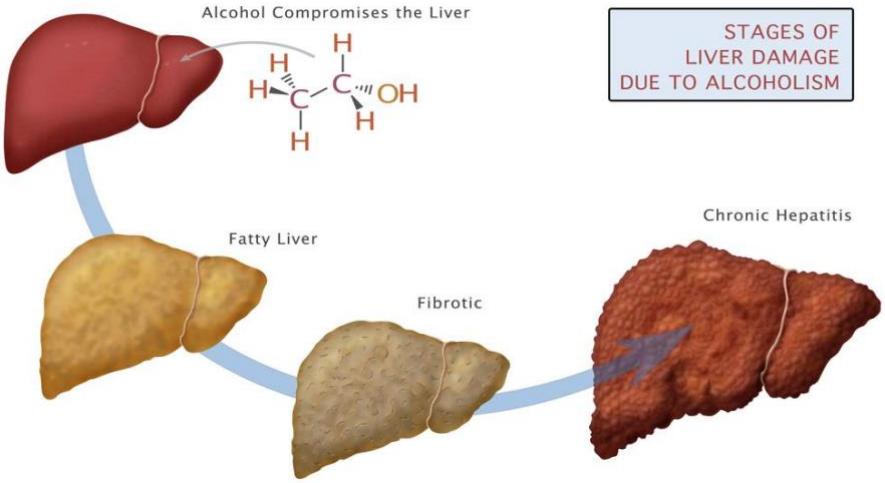


Figura 24. Fases hepáticas durante el consumo crónico de alcohol.[42]

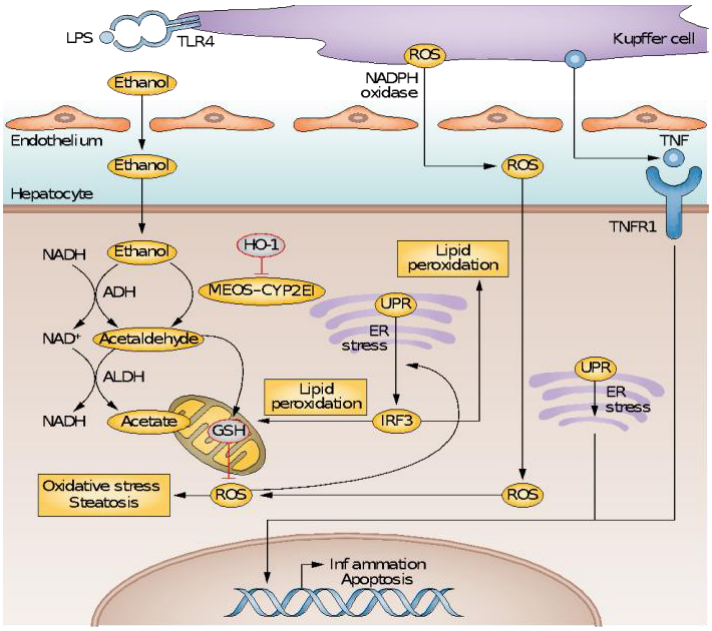


Figura 25. Metabolismo del etanol y lesión celular. [61,64]