



Identificación electroforética de α_2 - macroglobulina en plasma de ovino de pelo (*Ovis aries*) y búfalo (*Bubalus bubalis*).[¶]

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

*Electrophoretic identification of α_2 -macroglobulin in the plasma of tropical hair sheep (*Ovis aries*) and buffalo (*Bubalus bubalis*).*

Daniel I Barrera¹, BSc; Jorge H Giraldo¹, Est MV; Carlos M Duque¹, MVZ; Luis F Arbeláez^{1*}, MD, PhD.

¹Grupo de Investigación en Biomoléculas (GIB), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Km 1 vía Bucaramanga. Pamplona, Colombia.
luifer@unipamplona.edu.co

(Recibido: 24 marzo, 2006; aceptado: 9 agosto, 2007)

Resumen

*A través del presente estudio se analizaron plasmas sanguíneos de seis especies, incluyendo el humano tanto en estado gestante como no gestante, identificándose por primera vez en plasma, la glicoproteína α_2 -Macroglobulina (α_2 -M) de ovino de pelo (*Ovis aries*) y de búfalo (*Bubalus bubalis*). La presencia de esta proteína en el plasma sanguíneo de todas las especies en estudio se demostró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida usando sodio dodecilsulfato como agente denaturante (SDS PAGE) al 7.5% identificándose como bandas de 180 kDa y en forma no denaturante PAGE 5% como bandas de 720 kDa. Estas últimas bandas fueron claramente intercambiables de la forma tetramérica a la forma monomérica en los ensayos electroforéticos. Como controles se usaron la α_2 -M (tetramérica) y la proteína de la zona de gestación (PZP) (dimérica) purificadas a un 98%; así como, las bandas de estas dos proteínas en el plasma humano. El análisis de la secuencia del dominio N-terminal de la (α_2 -M) de ovino de pelo, fue muy similar al de la proteína humana purificada. Tanto la α_2 -M humana como la bovina llegaron a ser activadas a la forma rápida por medio de la reacción con metilamina. Lo anterior demuestra diferencias en la reactividad de las α_2 -M animales con la amina primaria cuando se comparan los resultados con la forma rápida de la α_2 -M humana. Será necesario unificar los métodos de purificación de esta proteína en todas las especies, de tal manera que los dominios sensibles de las α -macroglobulinas (tioéster y región señuelo) tengan el mismo tratamiento y el mismo grado de desnaturalización para todas las preparaciones de α_2 -M.*

Palabras clave: α_2 -macroglobulina, *Bubalus bubalis*, *Ovis aries*, SDS PAGE.

Summary

*Blood plasma from six different non pregnant and pregnant species, including human blood plasma, was analyzed for detection of α_2 -Macroglobulin (α_2 -M). The tropical hair sheep (*Ovis aries*) and the buffalo (*Bubalus bubalis*) were studied for the first time in Colombia. The presence of the α_2 -M in plasma of all*

[¶] Para citar este artículo: Barrera DI, Giraldo JH, Duque CM, Arbeláez LF. Identificación electroforética de α_2 -macroglobulina en plasma de ovino de pelo (*Ovis aries*) y búfalo (*Bubalus bubalis*). Rev Col Cienc Pec 2007; 20:304-311.

* Autor para el envío de la correspondencia y la solicitud de separatas: Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Km 1 vía Bucaramanga. Pamplona, Colombia. E-mai: luifer@unipamplona.edu.co

the species was demonstrated by SDS 7.5% PAGE as bands of 180 kDa as well as by non-denaturing 5% PAGE with bands of 720 kDa. The tetrameric form α_2 -M (tetramérica) and the pregnancy zone protein (PZP) (dimeric) purified at 98%, as well as its corresponding bands from human plasma were used as control. The N-terminal sequence of the band of 180 kDa in Tropical hair sheep plasma was very similar to the purified human α_2 -M. The results indicated the presence of α_2 -M in blood plasma of all the species tested, while the PZP was present only in the pregnant human plasma. Both human and bovine α_2 -M became activated with the fast form by reacting with Methylamine. This Fac. demonstrates the differences in the reactivity of the animal's α_2 -M with primary amine as compared with the human α_2 -M. It could be necessary to unify purification methods into one method for all species, so that the sensitive domain of the α -macroglobulins (thioester and bait region) receives the same treatment and grade of denaturation for all α_2 -M preparation.

Key Words: α_2 -macroglobulin, *Bubalus bubalis*, *Ovis aries*, SDS PAGE.

Introducción

La α_2 -Macroglobulina (α_2 -M) es un miembro de la superfamilia de las glicoproteínas tioéster, junto con la proteína de la zona de gestación (PZP) y los componentes del complemento C3, C4 y C5 (37). La α_2 -M humana es típica de esta familia de glicoproteínas, la cual se considera como una proteína inhibidora de los cuatro tipos de proteasas (serino, metalo, carboxil y tiol) (34). La PZP comparte una identidad en aminoácidos del 71% con la α_2 -M y del 24% con el C3; la identidad en secuencia entre el C3 y el C4 es del 29% (9). Las proteínas α_2 -M, PZP, C3 y C4 tienen un tioéster interno, mientras que el C5 no lo tiene (42). Las α -Ms se sintetizan como monómeros de 180 a 200 kDa (27). Estructuralmente, el dímero de las α -Ms se mantiene unido por dos puentes de disulfuro (21, 34), pero constan de una estructura cuaternaria en la forma tetramérica (36). Cada subunidad de α -M contiene un dominio sensitivo a la proteólisis, el cual es llamado señuelo ("bait region"), dominio en el que se presenta la mayor diferencia en la secuencia de las α -Ms humanas y corresponde a los residuos de aminoácidos 666-706 para la α_2 -M, y 666-716 para la PZP (39).

Durante el rompimiento proteolítico de la "región señuelo" el grupo amino de una lisina en la proteasa desestabiliza el tioéster, lo cual permite su atrapamiento por medio de un enlace covalente β -cisteinil- γ -glutamil en cada subunidad (30, 38); sin embargo, la α_2 -M puede atrapar proteínas no proteolíticas que estén presentes durante el evento proteolítico (7).

El tioéster en α_2 -M y PZP se encuentra localizado en el centro de una región altamente conservada que comprende desde los aminoácidos 943 al 969; el enlace covalente se forma entre los aminoácidos Cys⁹⁴⁹ y Glx⁹⁵² en la α_2 -M (40) y entre la Cys⁹⁵² y Glx⁹⁵⁵ en la PZP (12). Estudios *in vitro* han demostrado que este dominio puede ser escindido por aminas primarias, especialmente la metilamina; en la mayoría de las α -Ms esta molécula induce cambios conformacionales similares a los iniciados por el rompimiento del señuelo (41). Una consecuencia adicional de este rompimiento y del subsiguiente cambio conformacional, es la exposición en la superficie de las α -Ms del dominio que reconoce el receptor de la lipoproteína de baja densidad asociado a la α_2 -M (LRP/ α_2 -M), que corresponde al C-terminal de cada subunidad, lo cual conlleva la eliminación de los complejos α -Ms-proteasa en células reticuloendoteliales (10, 13, 44). El C-terminal de la PZP fue aislado y caracterizado, su secuencia determinada y comparada con la del C-terminal de la α_2 -M, con una similitud entre los dos C-terminales de 85%. Varios anticuerpos monoclonales fueron evaluados, y solo en uno se encontró que discriminaba entre estos dos dominios C-terminales (el anticuerpo KF2) (5, 20).

Las α -Ms han sido estudiadas en diferentes especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios (37): en particular, la α_2 -M ha sido aislada y analizada en especies animales como: ratas (14, 15) ratones (2), equinos (29), caninos (31), suinos (32, 43) y conejos (22, 23) y en los últimos años se han realizado estudios en caprinos (24, 25) y otros animales domésticos (28). En el presente estudio se identificó

mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, tanto en forma nativa como desnaturalizada, una banda compatible por migración electroforética con la α_2 -M en plasma proveniente de ovino de pelo o de búfalo, al ser comparados con las α -Ms humanas purificadas y con otros plasmas animales en los cuales previamente había sido aislada y estudiada la α_2 -M.

Materiales y métodos

Reactivos

Las sustancias para las soluciones tampones acetato de sodio, fosfato de sodio, Tris, ácido acético, metanol (Merck KgaA, Darmstadt); los reactivos de electroforesis (BioRad Laboratories, Hercules), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), dimetil sulfóxido (DMSO), cloruro de Zn, glicina (Fluka Chemie, Buchs) y metilamina (MA) (Sigma, St MO), fueron de grado analítico. Las matrices insolubles fueron de flujo rápido (Amersham Biosciences, Upsala).

Toma de muestras y obtención de plasmas

Las muestras de sangre (4.5 ml) se tomaron empleando tubos de vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ) con anticoagulante citrato de sodio 0.105 M, por punción de la vena yugular de las siguientes especies: equino, bovino, caprino, ovino de pelo y bufalino, tanto en estado no gestante, como en el último tercio de la gestación; la sangre se mantuvo refrigerada hasta su centrifugación a 8.050 g/4 °C/ 10 min (Universal 32R Hettich, Bäch). A los plasmas obtenidos, se les añadió PMSF disuelto en DMSO, a una concentración final de 1mM, con el fin de inhibir la actividad de las serinoproteasas; los plasmas fueron almacenados a -80 °C hasta su uso. El plasma normal humano almacenado a -80 °C fue analizado previamente y catalogado libre de antígenos de hepatitis, VIH, enfermedad de Chagas, y otras enfermedades infecciosas, de acuerdo con el protocolo del banco de sangre del Hospital Erasmo Meoz (Cúcuta, Norte de Santander, Colombia).

Purificación de las α -Macroglobulinas humanas

La PZP fue purificada a un 98% empleando el método de Arbeláez y Stigbrand (5). Para la purificación de la α_2 -M, se tomaron 250 ml de

plasma normal humano, al cual previamente se le retiró el plasminógeno por cromatografía de afinidad en sefarsosa-lisina, de acuerdo con el método de Deutch y Mertz (11); posteriormente, el plasma fue dializado contra agua potable durante 24 horas en una membrana de celulosa regenerada, MWCO 12-14 kDa (Fisher Scientific, Pittsburgh) y centrifugado a 8.050 g/10 min/18 °C, con el fin de retirar el precipitado de euglobinas. Posteriormente, 200 ml de este plasma fueron utilizados para la purificación de α_2 -M por cromatografía de afinidad en Sefarsosa-Zn (19), en un cromatógrafo BioLogic LP (BioRad Laboratories, Hercules), a través de una columna de 2.5 x 13 cm, empacada con 45 ml de matriz. La proteína fue eluída con tampón (acetato 0.01M, NaCl 0.15M, pH = 5.0); se colectaron fracciones de 8 ml. Las concentraciones de PZP y α_2 -M fueron determinadas por absorción a $\lambda = 280_{nm}$, usando como coeficiente de extinción $(\epsilon^{1\%})_{1cm} = 8.2$ para la PZP (35) y 8.9 para la α_2 -M (16); las proteínas fueron concentradas aproximadamente a 4.16 μ g/ μ L en una célula de ultrafiltración Amicon (Millipore, Bedford), utilizando membranas de celulosa regenerada.

Activación de α_2 -M y plasmas normales con metilamina

A 10 mg de α_2 -M humana purificada se le añadió MA hasta una concentración final de 0.1M y se incubó a temperatura ambiente/2 h; el exceso de MA se dializó contra agua desionizada durante una hora (tres cambios) y contra PBS (Na_2HPO_4 0.1M, NaCl 0.15M, pH = 7.3)/3 h (cuatro cambios), en una membrana de celulosa regenerada MWCO de 12-14 kDa; la α_2 -M activada fue almacenada a -80 °C. Los plasmas de animales no gestantes fueron tratados con MA, con el fin de activar la α_2 -M posiblemente presente; asumiendo que en el plasma podrían existir diversas sustancias que inhiben la formación del complejo α_2 -M-MA, la concentración final de MA fue de 0.2M y se dejó reaccionar por dos horas a temperatura ambiente sin diálisis. Los plasmas activados con MA fueron almacenados a -80 °C.

Análisis electroforético

Todos los plasmas animales fueron descongelados en baño de María a 37 °C y diluidos 1:5 (vol/vol)

con PBS; posteriormente, al igual que las proteínas purificadas, se mezclaron con tampón de prueba nativo o desnaturizante en una relación 1:1 (vol/vol) (26). Las pruebas de desnaturalización no fueron sometidas a ebullición para evitar el rompimiento del dominio tioéster (18, 38), pero en su lugar se incubaron a temperatura ambiente/1 h. Posteriormente, los plasmas de animales no gestantes y del último tercio de gestación fueron analizados en geles SDS PAGE al 7.5% y en geles nativos al 5%, utilizando como control las proteínas purificadas y el plasma humano. La α_2 -M-MA y los plasmas normales-MA sólo fueron analizados en forma nativa. El corrido electroforético se hizo a 20 mA constantes a temperatura ambiente/35 min; en el caso particular de los geles nativos, una vez salió del gel el frente de corrida, se permitió la migración durante 15 minutos adicionales para aumentar la diferencia en la migración de las formas “rápida” y “lenta” de la α_2 -M. Finalmente, las proteínas fueron teñidas con azul brillante de Coomassie R.

Secuenciamiento de proteínas

El estudio incluyó el análisis de la secuencia de la α_2 -M humana purificada (véase Figura 1, carriles 1 y 4) y la α_2 -M presente en el plasma de ovino de pelo. La proteína fue electrotransferida a una membrana PVDF (BioRad Laboratorios, Hercules) en una solución de 25 mM Tris con glicina 192 mM y metanol al 20%, pH = 8.3. Las muestras fueron transferidas durante 3 h. Las bandas transferidas fueron visualizadas mediante la incubación con amido black al 0.1%/2 min. Las membranas fueron desteñidas con una solución que contenía 55% de agua, 35% de metanol y 10% de ácido acético. El secuenciamiento fue realizado en la Universidad de Aarhus (Aarhus-Dinamarca) empleando el método de degradación de Edman.

Resultados

Electroforesis de plasmas animales SDS PAGE 7.5%

Los plasmas provenientes de animales no gestantes o gestantes (bovino, equino y caprino) y de humano (véase Figura 1A, carriles 2 a 9), presentaron una banda con un perfil igual al patrón de α_2 -M y PZP humanas purificadas (véase Figura 1A, carriles 1 y 10), sin importar que la muestra

hubiere sido tomada en animales no gestantes o en animales en el último tercio de la gestación; el mismo caso se presentó en los plasmas de bufalino y ovino de pelo (véase Figura 1B, carriles 4-7). Es de resaltar, que en el caso del plasma humano y equino en el último tercio de la gestación, la intensidad de la banda de interés incrementó ligeramente (véase Figura 1A, carriles 2, 3, 6 y 7), al compararse la banda de 180 kDa entre el plasma no gestacional y gestacional.

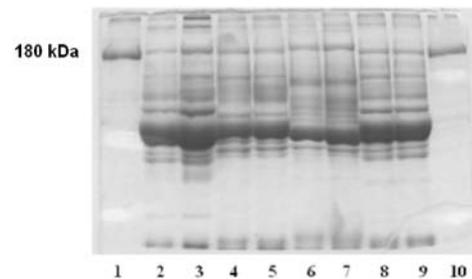


Figura 1A. SDS PAGE 7.5% de plasmas de animales normales (N) y en el último tercio de la gestación (G). Carril 1, α_2 -M humana purificada; carril 2, plasma humano N; carril 3, plasma humano G; carril 4, plasma bovino N; carril 5, plasma bovino G; carril 6, plasma equino N; carril 7, plasma equino G; carril 8, plasma caprino N; carril 9, plasma caprino G; y carril 10, PZP humana purificada.

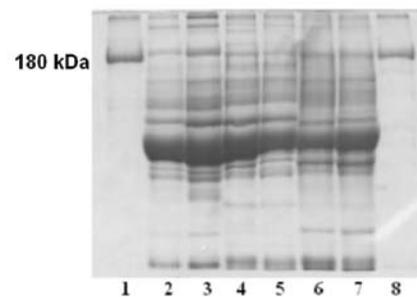


Figura 1B. SDS PAGE 7.5% de plasmas de animales normales (N) y en el último tercio de la gestación (G). Carril 1, α_2 -M humana purificada; carril 2, plasma humano N; carril 3, plasma humano G; carril 4, plasma ovino de pelo N; carril 5, plasma ovino de pelo G; carril 6, plasma bufalino N; carril 7, plasma bufalino G; y carril 8, PZP humana purificada.

Electroforesis nativa PAGE 5% de plasmas animales

Los plasmas humano, bovino, equino, caprino, ovino de pelo y bufalino (véanse Figuras 2A y 2B), presentaron la banda típica mostrada por la α_2 -M purificada y la forma tetramérica de la PZP; la migración de estas bandas no se ve afectada en los animales en el último tercio de la gestación. En las figuras 3A y 3B, se observa el comportamiento de los plasmas normales tratados con MA, utilizando como control la forma rápida de la α_2 -M humana purificada; el tratamiento con MA en los diferentes

plasmas solo modificó la migración de la banda de α_2 -M en el plasma humano en un 100% al compararse con la forma rápida de esta proteína utilizada como patrón (véase Figura 3A, carriles 1 y 10) y la α_2 -M del plasma bovino parcialmente cuando se compara con el plasma sin tratamiento (véanse Figuras 3A carriles 1-5, y 3B, carriles 1-3). En el caso de los otros plasmas animales, el tratamiento con la amina primaria no modificó la migración de la banda de interés (véanse Figuras 3A, carriles 4-9 y 3B, carriles 4-7).

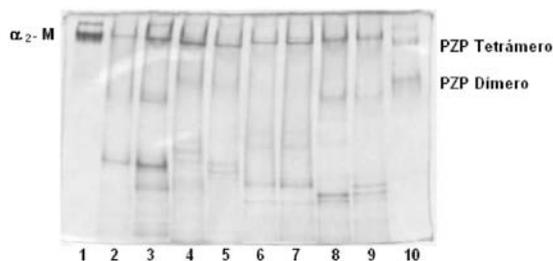


Figura 2A. PAGE al 5% nativo de plasmas de animales normales (N) y en el último tercio de la gestación (G). Carril 1, α_2 -M humana purificada; carril 2, plasma humano N; carril 3, plasma humano G; carril 4, plasma bovino N; carril 5, plasma bovino G; carril 6, plasma equino N; carril 7, plasma equino G; carril 8, plasma caprino N; carril 9, plasma caprino G; y carril 10, PZP humana purificada.

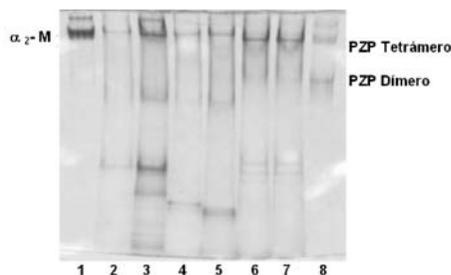


Figura 2B. PAGE al 5% nativo de plasmas de animales normales (N) y en el último tercio de la gestación (G). Carril 1, α_2 -M humana purificada; carril 2, plasma humano G; carril 3, plasma humano G; carril 4, plasma ovino de pelo N; carril 5, plasma ovino de pelo G; carril 6, plasma bufalino N; carril 7, plasma bufalino G; y carril 8, PZP humana purificada.

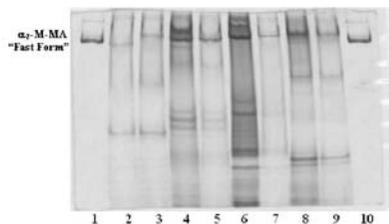


Figura 3A. PAGE al 5% nativo de plasmas normales (N) y plasmas tratados con MA. Carril 1 y 10, α_2 -M-MA purificada; carril 2, plasma humano-MA; carril 3, plasma humano N; carril 4, plasma bovino-MA; carril 5, plasma bovino N; carril 6, plasma equino-MA; carril 7, plasma equino N; carril 8, plasma caprino-MA; y carril 9, plasma caprino N.

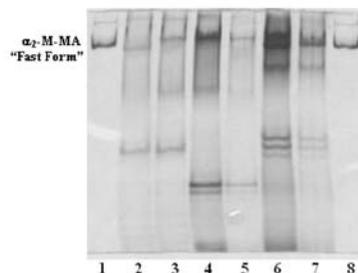


Figura 3B. PAGE al 5% nativo de plasmas normales (N) y plasmas tratados con MA. Carril 1, y 8, α_2 -M-MA purificada; carril 2, plasma humano-MA; carril 3, plasma humano N; carril 4, plasma ovino de pelo-MA; carril 5, plasma ovino de pelo N; carril 6, plasma bufalino-MA; y carril 7, plasma bufalino N.

Secuenciamiento de proteínas

El resultado de la secuenciación del N-terminal de la α_2 -M humana purificada fue el siguiente: Ser-Val-Ser-Gly-Lys; y los resultados para la α_2 -M presente en el plasma de ovino de pelo fueron: Ser-Val-Val-Gly-Lys.

Discusión

Electroforesis de plasmas animales SDS PAGE 7.5%

Todos los plasmas animales, incluyendo el ovino de pelo y bufalino que no han sido estudiados anteriormente, presentaron bandas que migraron al mismo nivel electroforético que la α_2 -M y la PZP humanas purificadas y utilizadas en este estudio como marcadores (controles). De igual manera, las bandas identificadas en el plasma humano como α_2 -M y PZP (45), están en un claro alineamiento electroforético con las bandas de las α -Ms purificadas y con las bandas correspondientes a las α -Ms en las demás especies a las cuales se les ha determinado la presencia de α_2 -M en el plasma y en las nuevas especies a incluir: ovino de pelo y bufalino.

La estructura de las α -Ms humanas ha sido bien determinada; la α_2 -M es un tetrámero, mientras que la PZP es un dímero (33). La estructura primaria de estas dos proteínas es muy similar en cantidad de residuos de aminoácidos por monómero: la α_2 -M tiene 1451 aminoácidos (40) y la PZP tiene 1456 aminoácidos (12), hecho que fortalece el postulado de que la banda de 180 kDa identificada en el

plasma de las cinco especies animales es la banda de las α -Ms en estas especies, lo que consolida la evidencia que dichas bandas en el ovino de pelo y en el bufalino, especies a los cuales nunca antes se les había estudiado estas proteínas. Lo anterior se confirma con la determinación del dominio N-terminal de la banda de 180 kDa de ovino de pelo, ya que al comparar los dos resultados de las secuencias se observa que solo hay un aminoácido diferente en la tercera posición; además, la presencia de contaminaciones es menor de 0.1%, teniendo en cuenta que la sensibilidad del método es \geq al 0.1% y solo se encontró una secuencia en dicha banda. Si bien, las bandas de las α -Ms obtenidas del plasma en estas cinco especies animales no habían sido señaladas en un perfil plasmático, en algunos animales se han purificado α -Ms en forma de tetrámero y dímero, que en geles reducidos y desnaturizantes forman monómeros de 180 kDa (37), lo cual se demuestra con los resultados obtenidos en las figuras 1A y 1B. Este hecho es también confirmado en la electroforesis del perfil plasmático humano en este estudio.

Electroforesis de plasmas animales PAGE 5% nativa

En los geles nativos se pudo apreciar una banda que migró al mismo al nivel electroforético de la α_2 -M y la PZP tetramérica, tanto en el plasma humano como en las especies animales en estudio. La posibilidad de que la banda de 180 kDa mencionada en la electroforesis en condiciones de desnaturización corresponda a la PZP dimérica (21, 33) se puede descartar en las especies bovina, equina, caprina y bufalina, ya que estas no presentaron ninguna banda que migrara al mismo nivel electroforético de la PZP dimérica nativa, pero sí presentaron la banda típica de 720 kDa correspondiente a la α_2 -M (17). El hecho de que estas bandas puedan ser interconvertibles entre unidades de 180 kDa y 720 kDa, indica claramente que se trató de la α_2 -M, lo cual se confirmó al determinar la secuencia del dominio N-terminal de la banda de 180 kDa del ovino de pelo, al compararla con la secuencia del extremo N-terminal de la proteína humana purificada. La posibilidad que se trate de la PZP tetramérica causada por la formación de complejos con proteinasas (6) también se puede descartar, ya que dichos complejos pasan

a tener altos y bien definidos pesos moleculares de 270, 360, 540 kDa, con una clara tendencia a hacer desaparecer la banda de 180 kDa para formar los complejos de alto peso molecular (3, 4). Además, debe descartarse la posibilidad que sean tetrámeros de la PZP formados por desnaturización de la prueba por múltiples descongelamientos (33), ya que la prueba no fue sometida a dicho manejo y en el plasma, que es su medio normal, no se han aislado o determinado mayores cantidades de esta forma de PZP (5); por lo tanto, se puede deducir que en los plasmas de animales no gestacionales o del último tercio de la gestación, se demostró la presencia de una proteína constitutiva que no es afectada por la gestación con características de migración electroforética igual a la α_2 -M en forma nativa y desnaturizada.

Los resultados obtenidos de la activación con MA de la α_2 -M presente en los plasmas no gestacionales, demuestran que existen diferencias en la activación entre el plasma humano y el de los animales en este estudio. La activación de la α_2 -M en el plasma humano se llevó a cabo en un 100%; sin embargo, la banda correspondiente a la α_2 -M del plasma bovino tratado con MA no se activó a la forma rápida en su totalidad, mientras que la banda en estudio en el resto de animales no mostró cambios conformacionales identificables, que condujeran a una migración rápida en la electroforesis nativa.

Pueden existir varias razones por las cuales la activación en los animales sea diferente: al parecer, existe una sustancia que inhibe la reacción del tioéster con la amina primaria aquí utilizada (MA). Cambios muy pequeños en la región alrededor del tioéster de la α_2 -M de los animales no permite los mismos cambios estructurales que sufre la α_2 -M humana ya que de hecho se ha demostrado en ciertas especies animales por ejemplo en caninos y equinos (1, 8), diferentes formas de migración electroforética de la α_2 -M, las cuales son intermedias entre α_2 -M-MA humana y complejos de α_2 -M-proteína.

Por lo tanto, se hace necesario la purificación de la α_2 -M con un mismo método en estas especies incluyendo las nuevas especies identificadas como poseedoras de la α_2 -M en plasma: ovino de

pelo y bufalino, ya que de esta manera se obtiene α_2 -M tratada de una forma idéntica, lo que garantiza condiciones similares en cuanto a integridad de los dominios sensibles de la α_2 -M: Tioéster y señuelo. De igual forma, la α_2 -M purificada facilitará estudios de esta proteína en diferentes especies, permitiendo deducir diferencias estructurales y funcionales de la α_2 -M humana y las de los animales.

Referencias

- Andersson M, Jonsson U, Olsson A. A slow form of alpha-2-macroglobulin in diseased and healthy dogs. *J Comp Pathol* 2002; 127: 37-44.
- Anonick PK, Vetter WH, Gonias SL. Kinetics of the reaction of streptokinase-plasmin complex with purified human and mouse α_2 -macroglobulin. *Biochem J* 1989; 264:745-752.
- Arbeláez LF, Bergman U, Tuuttila A, Shanbhang VP, Stigbrand T. Interaction of matrix metalloproteinases-2 and-9 with pregnancy zone protein and alpha 2-macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 1997; 347:62-68.
- Arbeláez LF, Jensen PEH, Stigbrand T. Proteinases from the fibrinolytic and coagulation system: analyses of binding to pregnancy zone protein, a pregnancy-associated plasma proteinase inhibitor. *Fibrinolysis* 1995; 9:41-47.
- Arbeláez LF, Stigbrand T. Purification of pregnancy zone protein and its receptor binding domain from human plasma. *Prot Exp Pur* 1997; 10:301-308.
- Christensen U, Simonsen M, Harrit N, Sottrup-Jensen L. Pregnancy zone protein, a proteinase-binding macroglobulin. interactions with proteinases and methylamine. *Biochemistry* 1989; 28:9324-9331.
- Chu CT, Pizzo SV. Alpha 2-macroglobulin, complement, and biologic defence, antigens, growth factors, microbial proteinases and, receptor ligation. *Lab Invest* 1994; 71:792-812.
- Cote N, Trout DR, Hayes AM. Evaluation of plasma alpha 2-macroglobulin and interactions with tumour necrosis alpha in horses with endotoxemic signs. *Can J Vet Res* 1996; 60:150-157.
- De Bruijn MH, Fey GH. Human complement component c3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:708-712.
- Debanne MT, Reoczi E, Dolovich J. Serum proteinase inhibitors in the blood clearance of subtilisin a. *Br J Exp Pathol* 1973; 54: 571-582.
- Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 1970; 170:1095-1096.
- Devriendt K, Van den Berghe H, Cassiman J-J, Marynen P. Primary structure of pregnancy zone protein. Molecular cloning of a full-length pzp cDNA clone by the polymerase chain reaction. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1088:95-103.
- Enghild JJ, Thøgersen IB, Roche PA, Pizzo SV. a conserved region in alpha-macroglobulin participates in binding to the mammalian alpha2-macroglobulin receptor. *Biochem* 1989; 28:1406-1412.
- Gauthier F, Mouray H. Rat α_2 acute-phase macroglobulin. *Biochem J* 1976; 159:661-665.
- Gordon H. The α macroglobulins of rat serum. *Biochem J* 1976; 159:643-650.
- Hall PK, Roberts RC. physical and chemical properties of human plasma α_2 -macroglobulin. *Biochem J* 1978; 173:27-38.
- Harpel PC. Studies on human plasma alpha 2-macroglobulin-enzyme interactions. *J Exp Med* 1977; 138:508-521.
- Howard JB, Vermeulen M, Swenson RP. Methylamine reaction and denaturation-dependent fragmentation of complement 3. *J Biol Chem* 1980; 255:3820-3823.
- Imber MJ Y Pizzo SV. Clearance and binding of two electrophoretic "fast" forms of human α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 1981; 256:8134-8139.
- Jensen PE, Arbeláez LF, Vithaldas PS, Stigbrand T. Preparation and characterization of a c-terminal fragment of pregnancy zone protein corresponding to the receptor-binding peptide from human alpha2-macroglobulin. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1293:254-258.
- Jensen PEH, Sottrup-Jensen. Primary structure of human α_2 -macroglobulin. complete disulfide bridge assignment and localization of two interchain bridges in the dimeric proteinase binding unit. *J Biol Chem* 1986; 261:15863-15869.
- Kaplan J, Nielsen M. Analysis of macrophage surface receptors I. *J Biol Chem* 1979; 254:7323-7328.
- Kaplan J, Nielsen M. Analysis of macrophage surface receptors II. *J Biol Chem* 1979; 254:7329-7335.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Lars Sottrup-Jensen por la determinación del dominio N-terminal de la α_2 -M humana y de ovino de pelo en el departamento de Biología molecular y estructural de la Universidad de Aarhus (Aarhus, Dinamarca); además, agradecen la donación del plasma humano al Hospital Erasmo Meoz de Cúcuta, Colombia.

24. Khan S, Khan F. Uric acid mediates photodynamic inactivation of caprine α_2 -macroglobulin. *Free Radic Res* 2001; 34:113-122.
25. Khan S, Khan F. Oxidized caprine alpha2- macroglobulin: damaged but not completely dysfunctional. *Biochem Biophys Acta* 2004; 1674:139-148.
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
27. Lundwall A, Malmheden I, Stålenheim G, Sjöquist. Isolation of component c4 of human complement and its polypeptide chains. *Eur J Biochem* 1981; 117:141-146.
28. Métayer S, Dacheux F, Dacheux J-L, Gatti J-L. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol of Reprod* 2002; 66:1219-1229.
29. Pritchett TJ, Paulson JC. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 1989; 264:9850-9858.
30. Roberts RC. Alpha2-macroglobulin. *Rev Hematol* 1986; 2:124-129.
31. Ruaux CG, Lee RP, Atwell RB. Detection and measurement of canine alpha-macroglobulins by enzyme immuno-assay. *Res Vet Sci* 1999; 66:185-190.
32. Ryan-Poirier KA, Kawaoka Y. α_2 -Macroglobulin is the major neutralizing inhibitor of influenza virus a in pig serum. *Virology* 1993; 193:974-976.
33. Sand O, Folkersen J, Westergaard JG, Sottrup-Jensen L. Characterization of human pregnancy zone protein. *J Biol Chem* 1985; 260:15723-15735.
34. Sottrup-Jensen L. α -Macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 1989; 264:11539-11542.
35. Sottrup-Jensen L, Folkersen J, Kristensen T, Tack BF. Partial primary structure of human pregnancy zone protein: extensive sequence homology with human α_2 -macroglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:7353-7357.
36. Sottrup-Jensen L, Hansen HF, Pedersen HS, Kristensen L. Localization of epsilon-lysyl-gamma-glutamyl cross-links in five alpha2-macroglobulin-proteinase complex. *Nature of the high molecular weight cross-linked products. J Biol Chem* 1990; 265:17727-17737.
37. Sottrup-Jensen L. In: Putman FW, editor. *The plasma proteins*. Orlando: Academic Press; 1987. p191-291.
38. Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Magnusson S. Thiolester in α_2 -macroglobulin cleaved during proteinase complex formation. *FEBS Lett* 1980; 121:275-279.
39. Sottrup-Jensen L, Sand O, Kristensen L, Fey GH. The α -macroglobulin bait region. *J Biol Chem* 1989; 264:15781-15787.
40. Sottrup-Jensen L, Stepanik TM, Kristensen T, Wierzbicki DM, Jones CM, *et al*. Primary structure of human alpha2-macroglobulin. *J Biol Chem* 1984; 259:8318-8327.
41. Swenson RP, Howard JB. Characterization of alkylamine-sensitive site in alpha2-macroglobulin. *Prot Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4313-4316.
42. Tack BF, Harrison RA, Janatova J, Thomas ML, Prahl JW. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:5764-5768.
43. Uchino T, Sakura Y, Nishigai M, Takahashi T, Arakawa H, *et al*. Isolation and characterization of a novel serine proteinase complexed with α_2 -macroglobulin from porcine gastric mucosa. *J Biol Chem* 1993; 268:527-533.
44. van Dijk MC, Ziere GJ, Boers W, Linthorst C, Bijsterboch MK, *et al*. Recognition of chylomicron remnants and beta-migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver alpha2-macroglobulin recognition site. *Biochem J* 1991; 279:863-870.
45. von Shoultz B, Stigbrand T. Purification of the "Pregnacy Zone" protein. *Acta Obstet Gynec Scand* 1973; 52:51-57.