

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN .....	7
2.1 Tioles y oxidaciones biológicas.....	7
2.1.1 Especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno .....	7
2.1.2 Tioles biológicos.....	8
2.1.3 Reactividad de tioles con oxidantes.....	9
2.2 Acido sulfénico en proteínas .....	11
2.2.1 Reactividad y estabilidad .....	11
2.2.2 Roles en proteínas .....	12
2.2.3 Detección de ácido sulfénico en proteínas.....	14
2.3 Albúmina sérica humana (HSA).....	16
2.3.1 Generalidades y estructura de la HSA .....	16
2.3.2 Biosíntesis, distribución y degradación de la HSA.....	17
2.3.3 Funciones .....	18
2.3.4 Uso farmacéutico de la HSA .....	21
2.4 Tiol de la HSA.....	21
2.4.1 Heterogeneidad del tiol de la HSA .....	21
2.4.2 Reactividad del tiol de la HSA.....	24
2.4.3 Ácido sulfénico en HSA .....	25
2.4.4 HSA y patología .....	27
2.5 Defensas antioxidantes en el espacio intravascular .....	30
2.6 HSA recombinante .....	33
2.6.1 Sistemas de expresión .....	33
2.6.2 <i>Pichia pastoris</i> .....	33
2.6.3 Propiedades y uso clínico de la HSA recombinante .....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo general .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
4.1 Materiales y soluciones.....	39
4.2 Caracterización de ácido sulfénico en albúmina mediante la reacción con tionitrobenzoato.....	42
4.3 Utilización de tionitrobenzoato para caracterizar a la	
2	
alquilhidroperóxido reductasa E (AhpE) .....	44
4.4 Purificación de isoformas de la HSA por cromatoenfoco y análisis por espectrometría de masa .....	45
4.5 Expresión, purificación y generación de mutantes de HSA recombinante	48
4.6 Procesamiento y análisis de datos.....	52
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53
5.1 Caracterización del ácido sulfénico formado en la albúmina sérica humana mediante la reacción con tionitrobenzoato.....	53
5.1.1 Reacción entre HSA-SOH y TNB .....	53
5.1.2 Naturaleza de la segunda fase de la reacción entre HSA-SOH y TNB ...	58
5.1.3 Estabilidad de HSA-SOH en solución.....	60
5.1.4 Relación entre la segunda fase de la reacción de HSA-SOH con TNB y la inestabilidad de HSA-SOH.....	64
5.1.5 Reacción de HSA-SH y HSA-SOH con peróxido de hidrógeno .....	66
5.1.6 Reactividad con dimedona y arsenito.....	69
5.1.7 Reactividad con ácido úrico y ascorbato .....	69
5.1.8 Reacción con tioles de bajo peso molecular.....	70
5.2 Efecto de la unión de ácidos grasos en las propiedades del tiol y del ácido sulfénico en la HSA.....	77
5.3 Reducción catalítica de peróxido de hidrógeno por AhpE a expensas de .... TNB .....	80
5.4 Purificación de isoformas del tiol de la HSA por cromatoenfoco y análisis por espectrometría de masa .....	84

5.4.1 Análisis de distintas HSA comerciales .....	87
5.4.2 Análisis de muestras de plasma.....	89
5.5 Caracterización de HSA-SX por espectrometría de masa .....	91
5.6 Caracterización de la reacción entre HSA-SH y peróxido de hidrógeno por espectrometría de masa .....	93
5.7 Clonado, expresión, purificación y obtención de mutantes de HSA recombinante en <i>Pichia pastoris</i> .....	95
5.7.1 Clonado del gen de la HSA.....	96
5.7.2 Mutagénesis .....	99
5.7.3 Transformación con pPICZA-HSAwt y expresión.....	99
5.7.4 Purificación .....	101
3	
5.8 Comparación de la reactividad del tiol de la HSA con la de tioles de bajo peso molecular .....	106
5.9 HSA como atrapadora de especies reactivas en el espacio intravascular	107
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	111
7. REFERENCIAS.....	117
8. ANEXO.....	133
9. AGRADECIMIENTOS .....	134