



La Albumina humana su utilización en diferentes patologías y su actual desarrollo como medicamento en la Universidad de Pamplona

Arbeláez-Ramírez Luis F, Quijano Parra Alfonso

¹Grupo de Investigación en Química, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Pamplona-Colombia

Resumen

La albumina humana se viene utilizando desde 1945 en diferentes patologías y en los últimos años ha aumentado el número de patologías donde se usa este medicamento, los métodos de purificación a través de todos estos años se han venido mejorando y simplificando, lo que eleva su calidad y permite la reducción de los precios del medicamento.

En la Universidad de Pamplona, se ha realizado el proceso completo, desde la simplificación del método de producción, sin pérdida de calidad, como la producción piloto de la albumina para análisis internacional de calidad. Los resultados obtenidos por métodos de alta fidelidad, demuestran una pureza superior al 99.98%, lo que eleva este producto de la Universidad de Pamplona a nivel internacional como un producto con capacidad competitiva en calidad y precio.

Palabras clave: Albumina, purificación, cromatografía, intercambio iónico, exclusion

Human albumin use in different pathologies and their ongoing development as a medicine at the University of Pamplona

Abstract

Human albumin has been used since 1945 in different diseases and in recent years has increased the number of diseases where this drug is used, methods of purification through all these years have been improving and simplifying, raising quality and reducing drug prices.



At the University of Pamplona, it has made the whole process, from the simplification of the production method, without loss of quality, as well as the pilot production of albumin for international quality analysis. The results obtained by methods of high fidelity, show a purity greater than 99.98%, bringing this product from the University of Pamplona internationally as a product with competitive quality and price.

Keywords: Albumin, purification, chromatography, ion-exchanger, gel-filtration

*Para citar este artículo: Arbeláez-Ramírez LF, Quijano Parra A. La Albumina humana su utilización en diferentes patologías y su actual desarrollo como medicamento en la Universidad de Pamplona.Revista Bistua.2015.13(1):70-80

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Arbeláez-Ramírez LF.Universidad de Pamplona,.Programa Medicina.Facultad de Salud.Grupo de Investigación en Química.email:lui.ferar@hotmail.com

Recibido: Septiembre 28 de 2014 Aceptado: Febrero 12 de 2015

Introducción

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma. Está constituida por 585 aminoácidos (a.a.) con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula y tiene un peso molecular de 67 kDa¹. Es sintetizada en el hígado, órgano que además sintetiza la mayoría de las proteínas plasmáticas, el hígado normalmente, produce de 12 a 15 gramos de albúmina por día y puede aumentar la producción más de 2 gramos por día cuando hay pérdidas mayores de 3,5 gramos por día (Síndrome nefrótico) para prevenir la hipoalbuminemia².

En condiciones normales la concentración de proteínas totales oscila entre 6,2 y 7,9 g/dl, estando la concentración de albúmina entre 3,6 y 5,2 g/dl, cuando esta última es baja, habitualmente se presenta edema³, la albúmina ejerce entre el 75% y 85% de la presión oncótica de la sangre⁴, otras funciones es transportar y almacenar una amplia variedad de sustancias de bajo peso molecular como bilirrubina, cortisol, hormonas sexuales, ácidos grasos libres, oligoelementos y algunos medicamentos⁵⁻⁸. La albúmina humana se obtiene de plasma o suero humano^{9,10}, el método de Cohn ha sido el más utilizado a nivel mundial, en el cual se obtiene la albúmina con una pureza del 95%⁹,

en los últimos años este procedimiento ha sido mejorado, alcanzando una pureza de 99.3%¹¹. La albúmina se utiliza en pacientes con hipovolémia¹²⁻¹³, quemaduras¹⁴, hemorragias severas, sepsis, cualquier condición de shock con hipoalbuminemia¹⁵ pacientes hemodializados con hipotensión que tienen sobrecarga de líquido y que no pueden tolerar soluciones salinas o grandes volúmenes, síndrome nefrótico, hipoalbuminemia por lesión hepática¹⁶⁻¹⁷. La albúmina humana es utilizada en todo tipo de cirrosis y en las complicaciones que las diferentes cirrosis causan, siendo tratadas tanto las cirrosis causadas por el alcohol, como las de otros orígenes¹⁸⁻²⁰. La aplicación de albúmina humana en pacientes con altas complicaciones en algunas de las patologías ya mencionadas incrementa considerablemente la recuperación de los pacientes tratados²¹.

PURIFICACION

La albúmina humana se puede obtener de plasma o placentas humanas. A nivel industrial se prepara por fraccionamiento de mezclas de plasma obtenido de cientos de donantes sanos. Todas las unidades de plasma utilizadas en el proceso son sometidas individualmente a un despistaje serológico para el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB), y



anticuerpos para el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV 1 y 2), el T. cruzi Enfermedad de Chagas y el T. pallidum (Sífilis).

La albúmina humana siempre ha sido purificada por el método de Cohn et al⁹. Desde 1945, durante los cincuenta años siguientes, este método ofreció una pureza del 95%, lo cual era totalmente aceptable para la sociedad de ese entonces, en la actualidad no es aceptado por las sociedades, debido a las probabilidades de contaminación que puede ofrecer ese 5% de impurezas⁹. Motivo por el cual varios grupos a nivel internacional han continuado trabajando para eliminar ese 5% de impurezas y disminuir al máximo los contaminantes.

Desde el año de 1998 el grupo del Dr. Tanaka et al.¹⁰ en Brasil alcanzó una pureza del 99.3% totalmente aceptada para la sociedad actual, los costos de esta alta pureza se pagan en métodos más costosos y complicados con relación a los de Cohn et al. el gran problema del nuevo método es el complicado manejo en la purificación, ya que utiliza cromatografía de intercambio iónico y de exclusión en cuatro columnas en series en cada una de las cromatografías, en este caso se puede hablar de una purificación al

100%, divididos entre 99.3 de monomero de albumina y 0.7% en polimeros de la misma albumina¹⁰, ya que en los analisis de secuencia de proteínas, no se encontro ninguna secuencia diferente a la albumina, los analisis demostraron que tampoco habian trazas de DNA, RNA, no se encontraron cantidades ni siquiera a niveles de nanogramos¹⁰⁻¹¹, este sofisticado metodo de alta pureza eleva los costos de produccion que finalmente los va a pagar el consumidor.

En la Universidad de Pamplona desde hace 10 años se ha venido desarrollando un nuevo método que combina el de Cohn y Tanaka⁹⁻¹⁰ y se ha logrado purificar la albúmina con una alta pureza (99%) reduciendo los pasos de la purificación por cromatografía de intercambio iónico y exclusión a una columna para cada método, lo cual no solo simplifica el método de forma contundente sino que lo hace más viable económicamente, más competente sobre todo en países en vía de desarrollo como el nuestro, donde las clínicas y hospitales tienen una economía reducida para suministrar componentes altamente purificados a sus pacientes como es el caso de la albúmina y los factores de coagulación VIII, IX y XI para las hemofalias A, B y C respectivamente, todos estos, costosos a nivel internacional.



74

Este nuevo método ha sido soportado económicamente tanto por empresas privadas como por instituciones públicas, lo cuál ha facilitado el éxito de este proyecto, haciendo posible su posterior producción que abre al mercado nacional una enorme posibilidad de utilizar la albúmina humana en las patologías que lo requieren en nuestros hospitales y clínicas a nivel nacional, en el caso de la medicina veterinaria y la investigación, la misma producción se puede hacer con la albumina bovina.

Todos los métodos explicados anteriormente consisten en someter el plasma humano a un proceso de fraccionamiento con etanol frío a diferentes concentraciones y variaciones de temperatura, fuerza iónica y pH para obtener diferentes precipitados o pastas. La fracción I, contiene factor VIII y fibrinógeno, la fracción II, inmunoglobulinas, las fracciones III y IV contienen otras proteínas y factores de la coagulación y la fracción V albúmina, la cual siempre se encuentra en el sobrenadante, el producto se somete a pasteurización, calentándolo a 60°C por 10 horas en presencia de capilato de sodio²², no obstante el fraccionamiento con etanol es de probada actividad viricida y bactericida, siendo la pasteurización obligada que garantiza aún más la seguridad transfusional del producto.

Otros productos de interés farmacológico pueden ser producidos de las diferentes fracciones en la purificación de la albumina, los mas importantes son el factor VIII, IX y XI, para la población que sufre de hemofílias A, B, C respectivamente y el fibrinógeno para uso investigativo.

NIVELES DE ALBUMINA

En el suero o plasma la albumina representa el 50% de las proteínas (36-52 g / L) en un estado normal, por lo común, los niveles de albúmina en el suero son bajos en pacientes con enfermedad crónica del hígado, donde la producción diaria de albumina normalmente es de 9-12 g, la deficiencia de albúmina y otras proteínas reflejan únicamente la severidad de la enfermedad hepática. La vida media de la albúmina es de 16 horas. Se requiere de 48 horas luego de su administración para alcanzar el equilibrio entre los compartimientos intravascular e intersticial, la albúmina cuenta con alrededor del 75 al 85% de la capacidad intravascular osmótica lo que significa que 1 g de albúmina es hidratado por 18 ml de agua, entre el 20-30%, de la albumina se produce en los hepatocitos, en casos particulares la producción de albumina se puede aumentar en un 200-300% La albumina intravascular es de 40 g / L (120 g), extravascular 160 g (intesticio, musculo y piel)²³.



Otras condiciones patológicas que alteran la síntesis hepática o influyen en su distribución son, hipotiroidismo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad hepática, malabsorción / esteatorrea, enfermedad pancreática, enteropatía perdedora de proteínas, síndrome nefrótico, semi-inanición (albúmina se desplaza del espacio extravascular al intravascular) e hipermetabolismo.

PATOLOGIAS DONDE SE USA LA ALBUMINA

La albúmina se utiliza en pacientes hipovolémicos como resultado de quemaduras¹⁵, en hemorragias severas, sepsis, cualquier condición de shock con hipoalbuminemia¹² (<2,5 g / dl) pacientes hemodializados con hipotensión que tienen sobrecarga de líquido y que no pueden tolerar soluciones salinas o grandes volúmenes. Síndrome nefrótico, hipoalbuminemia por lesión hepática, kernicterus, recambio de plasma (plasmaféresis) y pancreatitis necrotizante¹². La cantidad de solución de albúmina que se debe administrar dependerá de las condiciones clínicas del paciente y su respuesta al tratamiento. Por ejemplo en shock hipovolémico agudo en adultos, se aplican 25 gramos de albúmina humana al inicio; Si a los 15-30 minutos no hay respuesta, la dosis se repite, las dosis siguientes serán determinadas por las condiciones del paciente, pero no se debe administrar más de 250 gramos

⁷⁵ de albúmina en 48 horas, en los niños 600 mg / Kg.

En líneas generales, se sugiere una tasa de infusión de 1 a 2 ml / min. con las soluciones de albúmina al 5% y 1ml / min para las soluciones al 20% y 25%. La velocidad de infusión puede aumentarse en el tratamiento del shock severo. La solución de albúmina producida a nivel internacional es ajustada a un pH fisiológico (6,7-7,3), no contiene preservativos es esterilizada durante el proceso de filtración y se encuentra disponible en tres presentaciones: solución al 5%, 20% y 25%. La solución al 5% es isosmótica con el plasma y puede ser usada como expansor de la volemia. Las soluciones al 20% y 25% tienen concentraciones 4 y 5 veces mayores que la del plasma. Por lo tanto, cuando se administran intravenosamente, por cada volumen de solución se incrementa la volemia en 3,5 veces en un lapso de 15 minutos. Ello es debido al paso de líquido del espacio intersticial al intravascular pudiendo ocasionar sobrecarga circulatoria e incrementando la deshidratación intersticial. Por este motivo se recomienda que en casos de deshidratación se debe infundir al mismo tiempo que soluciones salina normal o ringer lactato. Dado que un gramo de albúmina se une a 18 ml de agua, por lo que por cada 100 ml de albúmina al 20%



se deben infundir unos 360 ml de solución salina normal.

Calculo de dosis

Dosis (g) = (2.5 g / dL – albúmina actual) x (kg x 0.8)
(2,5 - 2,0) x (70 x 0.8) (0.5) x 56 = 28 gr.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la Universidad de Pamplona de la Albumina como producto, son considerables al comparar este producto con los que se venden a nivel internacional.

Con la proteína purificada como se indicó antes, se enviaron tres muestras al Centro Biológico Molecular Severo Ochoa en Madrid España, para su análisis en cuando a secuencias en las muestras, como se demuestra en la figura 1, todos los péptidos encontrados, fueron identificados con secuencias todas ellas pertenecientes a la de la albumina fig. 1, esto demuestra la alta pureza de la solución proteica, ya que este método puede determinar nanogramos y ni siquiera a este nivel se encontró secuencia alguna diferente a la albumina.

Antes del envío de estas muestras, la pureza de la solución fue confirmada

⁷⁶ en los laboratorios de biomoléculas de la Universidad de Pamplona, por electroforesis denaturante.

Como se puede apreciar en la figura 2, desteñido con color de Coomassie azul, el carril 3, es la albumina purificada de acuerdo al método de la Universidad de Pamplona, ninguna banda adicional se aprecia como contaminante. Como el límite de detección del teñido de coomassie es microgramos, se hace indispensable utilizar métodos más sensibles que detectan cantidades mínimas como nanogramos, tal y como se demuestra en la figura 3, ninguna otra banda está presente en dicha tinción, se aplicaron 5.000 ng de proteína y como se dijo antes este método detecta 1 nanogramo lo que implica una pureza superior al 99.98% para esta preparación.

La presentación sugerida por nuestra Institución para ser presentada al Invima será de un volumen de 50 ml al 20 %, viales con un contenido proteico de 10 g, como se muestra en la figura 4.

Discusion / Conclusiones

Se demostró por varios métodos sofisticados e independientes que la pureza de la Albumina humana

producida en la Universidad de Pamplona, es de un alto grado, que corresponde a las exigencias de las sociedades modernas, compitiendo no solo en la calidad del producto, sino también en los actuales precios internacionales del mismo, ya que el método al ser simplificado baja los costos de la producción actual.

Se hace necesario el envío del producto al Invima, para su análisis totalmente independiente por estas entidades de control de fármacos y por otras empresas internacionales que constante los resultados aquí presentados, sobre el alto grado de pureza donde no se encontraron contaminantes en una prueba de 5.000 ng en métodos con sensibilidad de detección de 1 ng, lo que equivale a una pureza del 99.98%, siendo las impurezas menores a 0.02%.

77

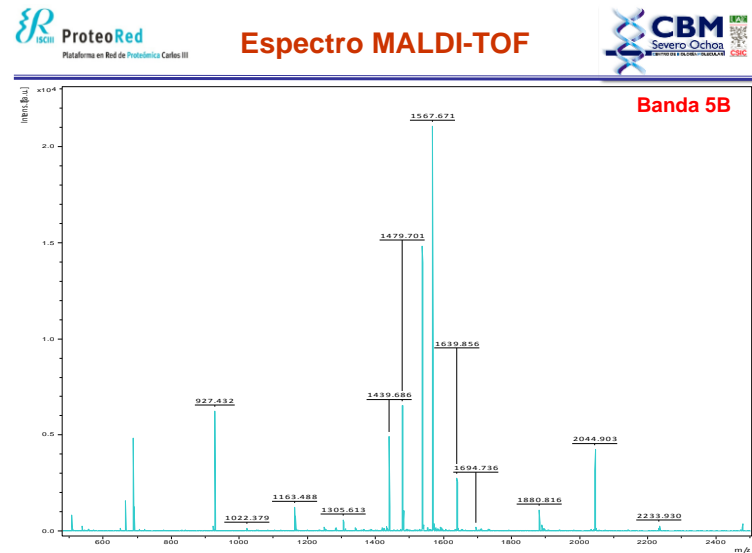


Figura 1. Degradación y secuenciación de 20 péptidos de la preparación de la albumina humana en la Universidad de Pamplona.

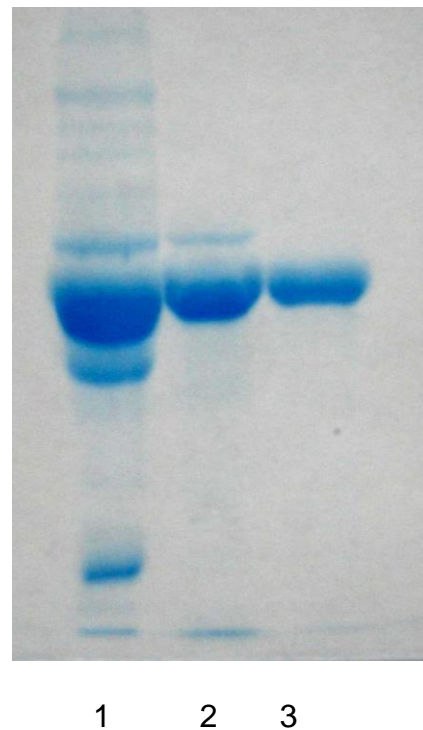


Figura 2. Electroforesis denaturante al 10%,

78

carril 1, plasma humano, carril 2, purificación por métodos tradicionales, carril 3 purificación de la Universidad de Pamplona.

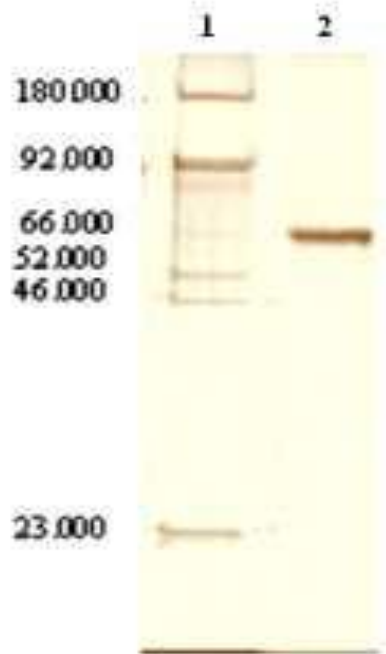


Figura 3. Tinción en plata de la electroforesis SDS-PAGE al 10%. Carril 1, estandar de peso molecular, carril 2, Albumina purificada en la Universidad de Pamplona



Figura 4. Presentación de Albumina humana, producida en la Universidad de Pamplona, volumen 50 ml al 20% con un contenido proteico de 10 g.

Referencias Bibliográficas

- [1]. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M and Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. Protein Engineering. 12: 439-446.
- [2]. Rubin, E and Farber, J. L. (1994). Liver. Synthetic Functions. Pathology. J. B. Lippincott Company. Washington.



[3]. He, X.M and Carter, D.C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 358: 209 – 215.

[4] Carter, D.C and Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*. 45:153-203.

[5]. Stewart, A. J., Blindauer, C. A., Berezenko, S., Sleep, D and Sadler, P. J. (2003). Bioinorganic Chemistry Special Feature: Interdomain zinc site on human albumin. *PNAS*. 100: 3701-3706.

[6]. Mahesha, H. G., Singh, S. A., Srinivasan, N and Appu A. G. (2006). A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *FEBS Journal* 273: 451–467

[7]. Liu, R., Pidikiti, R., Ha C. E., Petersen C. E., Bhagavan, N. V., and Eckenhoff, R. G. (2002). The Role of Electrostatic Interactions in Human Serum Albumin Binding and Stabilization by Halothane. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 36373–36379.

[8]. LIU, R. YANG, J., HA, C. E., BHAGAVAN, N. V. and ECKENHOFF, R. G. (2005). Truncated human serum albumin retains general anaesthetic binding activity. *Biochem. J*. 388: 39–45.

[9]. Cohn, E J., Strong, L. E., Hughes, J. L., and Mulford, D. J. (1964). Separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.

Journal of the American Chemical Society. 68: 459-475.

[10]. Tanaka, K., Sawatani, E., Shigueoka, E.M., Campos, T.C., Nakao, H.C., Dias, G.A., et al. (1998). A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. *Braz J Med Biol Res*. 31(11):1375-81.

[11]. Tanaka, K., Shigueoka, E.M., Sawatani, E., and Dias G.A. (1998). Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. *Braz J Med Biol Res*. 31(11): 1383-1388.

[12]. Redl, H., Kros, I. P., Schlag, G., Hammerschmidt, D. E. (1989). Permeability studies in a hypovolemic traumatic shock model: comparison of Ringer's lactate and albumin as volume replacement fluids. *Resuscitation*. 17(1):77-90.

[13]. Sanchez, R. (2002). Higher urinary albumin excretion is associated with abnormal erythrocyte Na(+)/Li(+) countertransport (SLC) in non-modulating essential hypertensives and offspring of hypertensive parents. *Pathol. Biol*. 50(2): 82-92.

[14]. Cho, K., Adamson, L. K., Hobson, K. G., Greenhalgh, D. G. (2002). Direct quantification of autologous serum albumin leakage after burn injury in mice. *Burns*. 28 (1): 53-6.

[15]. Wong, C.S., Hingorani, S., Gillen, D. L., and Sherrard, D.J. (2002). Hypoalbuminemia



and risk of death in pediatric patients with end-stage renal disease. Stehman-Breen CO. *Kidney Int.* 61(2): 630-7.

[16]. Arena, U., Boddi, V., Tarquini, R., Pantaleo, P., Gentilini, P., et al. (2006). Long-term albumin infusion improves survival in patients with cirrhosis and ascites: An unblinded randomized trial. *J. Gastroenterol* 12(9):1403-1407

[17]. Sola-Vera, J., Minana, J., Ricart, E., Planella, M., Gonzalez, B., et al. (2003). Randomized trial comparing albumin and saline in the prevention of paracentesis-induced circulatory dysfunction in cirrhotic patients with ascites. *Hepatology.* 37(5):1147-53.

[18]. Pares, A., Cisneros, L., Salieron, JM., Caballeria, L., Mas, A., et al. (2004). Extracorporeal albumin dialysis: a procedure for prolonged relief of intractable pruritus in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 99(6):1105-10.

[19]. Danalioglu, A., Cakaloglu, Y., Karaca, C., Aksoy, N., Akyuz, F., et al. (2003). Terlipressin and albumin combination treatment in hepatorenal syndrome. *Hepatogastroenterology.* 50 Suppl 2:ccciii-cccv.

[20]. Gentilini, P., Bernardi, M., Bolondi, L., Craxi, A., Gasbarrin, G., et al. (2004). The rational use of albumin in

patients with cirrhosis and ascites. A Delphi study for the attainment of a consensus on prescribing standards. *Dig Liver Dis.* 36(8):539-46.

[21]. Bellomo, R., Boyce, N., French, J., Myburgh, J and Norton, R. (2004). A

Comparison of Albumin and Saline for Fluid Resuscitation in the Intensive Care Unit. *new england journal of medicine.* 350:2247-56.

[22]. Moya, A., Paz, O., Joó, L., Gutiérrez, E., Rodríguez, Z. (2000). Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización. *VacilMonitor* 9 No. 4 (10-15).

[23]. Evans T W. Review article: Albumin as a drugbiological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; vol. 16 No. 5 (6-11.)

Arbeláez-Ramírez Luis F:Ph.D.
Profesor Titular.

Investigador Asociado. Programa de Medicina. Facultad de Salud. Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Química. Laboratorio de Biomoléculas

Quijano Parra A:Ph.D
Profesor Asociado.

Investigador Asociado. Programa de Química. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Química. Laboratorio de Control de Calidad.



Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.2015.13(1):70-80

