

# Obtención de albúmina de diferentes especies de mamíferos para uso inmunohematológico en bancos de sangre

Elvira Gutiérrez<sup>1</sup>, Alina Puig<sup>2</sup>, Yanelys Tirado<sup>2</sup>, Antonio Bencomo<sup>3</sup>, Armando Cádiz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Planta de Sueros y Hemoderivados "Adalberto Pesant", Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Instituto Finlay, Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. <sup>3</sup>Instituto de Hematología e Inmunología, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba.

Autor para correspondencia: Elvira Gutiérrez Rojas. Ave 45 No 17232 entre calle 172 y calle 180, Rpto. Versalles, Lisa, Ciudad de La Habana 13500, Cuba. E-mail: raúl.díaz@infomed.sld.cu

Fecha de recepción: 10/11/08  
Fecha de aprobación: 02/02/09



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 13 N° 1: 9-15  
Enero-Abril 2009

## RESUMEN

La albúmina juega un papel fundamental como componente básico en varios reactivos biológicos para uso diagnóstico. Para la obtención de esta proteína se utilizó plasma hemolítico de diferentes especies de mamíferos (bovina, equina, porcina y ovina), los cuales, fueron sometidos a un proceso de termocoagulación selectiva. Con vista a garantizar la polimerización necesaria se evaluaron diferentes concentraciones de glutaraldehído y glicina en las muestras de albúmina. A los productos finales se les determinaron: pH, concentración de proteínas y cloruro de sodio, contenido de hemopigmentos y polímeros, además se les realizaron ensayos inmunohematológicos que incluyeron: reacciones positivas no deseadas, capacidad potenciadora, presencia de IgG, sustancia de grupo sanguíneo ABO y Lewis y ausencia de actividad neuraminidasa. Se obtuvo un rendimiento promedio de 14.95 g/L, lográndose la polimerización adecuada al adicionar la misma concentración (0.06-0.08%) de glutaraldehído y glicina. Las evaluaciones fisicoquímicas e inmunohematológicas realizadas a las muestras de albúminas resultaron satisfactorias, exceptuando el contenido de hemopigmento, que aunque no afectó el resultado del ensayo serológico, sí influyó en la coloración final de la solución. En todos los casos las albúminas obtenidas podrían ser empleadas en los ensayos inmunohematológicos de los bancos de sangre y servicios de transfusiones.

Palabras clave: albúmina, termocoagulación, inmunohematológico, polimerización.

## INTRODUCCIÓN

La albúmina es la proteína más abundante del plasma, constituyendo el 50% del total proteico de esta fuente. Esta formada por una sola cadena polipeptídica, con aproximadamente 607 residuos de aminoácidos<sup>1-4</sup>. Según se refiere en la literatura, las estructuras de las albúminas bovinas, equinas,

porcinas y ovinas muestran gran similitud entre ellas<sup>5-7</sup>.

A través de la historia de la purificación de proteínas, la albúmina ha sido una de las moléculas más empleadas en las investigaciones bioquímicas. Dentro de los múltiples métodos diseñados para la purificación de la albúmina se encuentra la termocoagulación selectiva, en la cual, esta proteína es estabilizada a altas temperaturas por ácidos grasos de cadena corta, como el caprilato de sodio. El desarrollo industrial de esta técnica fue llevado a cabo por Schneider y colaboradores<sup>8</sup>.

La albúmina juega un papel fundamental como componente básico en varios reactivos biológicos para uso diagnóstico, principalmente en ensayos inmunohematológicos, tales como: antisueros en reacciones «in vitro» para la detección de antígenos eritrocitarios o anticuerpos específicos en receptores o donadores de transfusiones sanguíneas.

La albúmina bovina fue utilizada por primera vez como diluyente de suero anti-Rh en 1945 y todavía en la actualidad se continúa usando. Este componente sanguíneo puede influir en reacciones de hemaglutinación, incrementando la aglutinación eritrocitaria para una mejor visualización y fácil lectura de los resultados, basados en factores como reducción del potencial Z, incremento de la constante dieléctrica, liberación del agua unida, cambio de la forma de la célula roja y reducción de la fuerza iónica<sup>9</sup>.

La calidad de la albúmina que se emplea en bancos de sangre y servicios de transfusiones está regida por normativas internacionales, que toman en cuenta aspectos fisicoquímicos e inmunohematológicos<sup>10</sup>. Uno de los parámetros que más afecta la calidad de este reactivo, es el elevado contenido de hemopigmentos que presenta, lo cual es debido fun-

damentalmente al empleo de plasma hemolítico en el proceso de obtención.

En este trabajo nos propusimos desarrollar un método de purificación y evaluación de albúmina de diferentes especies de mamíferos, para su uso en el diagnóstico inmunohematológico de los bancos de sangre.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### - Recolección del plasma.

Se empleó plasma hemolítico colectado de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, procedentes de los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). Se utilizaron animales adultos libres de las principales enfermedades infectocontagiosas que afectan a cada una de estas especies.

### - Obtención de albúmina por termocoagulación selectiva.

La albúmina se obtuvo por el método de Schneider<sup>8</sup> modificado por Gutiérrez y colaboradores<sup>11</sup> (Figura 1).

Se partió de 1200 mL de plasma en cada lote y se les añadió caprilato de sodio hasta una concentración final de 0.006 mol/L. Se le ajustó el pH a 6.5, se añadió etanol (96°) hasta 9% de concentración final y se calentó a 68 °C durante 30 minutos (Figura 1). Las mezclas se centrifugaron a 1000g por una hora en una centrifuga BECKMAN J2-21 (Estados Unidos). Los sobrenadantes se concentraron en un ultrafiltro AMICON (Estados Unidos), empleando membranas con un tamaño de poro nominal de 30 kDa, hasta obtener una concentración de proteínas de 260 a 300 mg/mL.

### - Evaluación de la polimerización en las muestras de albúmina.

A 5 mL de albúmina de cada especie se les adicionaron diferentes concentraciones (0.001 a 0.16%) de glutaraldehído al 5%. Las muestras se mantuvieron 24 horas en agitación y posteriormente se les añadieron diferentes concentraciones de glicina (0.06 a 0.24%).

### - Ensayos físicoquímicos (Se empleó como patrón albúmina SIGMA, Estados Unidos).

Las mediciones de pH se realizaron en un pHmetro RADIOMETER PHM 83 (Dinamarca), empleando buffer de calibración pH 4 y 7.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret<sup>12</sup>, usando como patrón albúmina bovina fracción V (BDH, Inglaterra), con una concentración de 2.5 mg/mL para la curva de calibración. Para el contenido de hemopigmentos las muestras se diluyeron al 1% y se leyeron a 403 nm. La concentra-

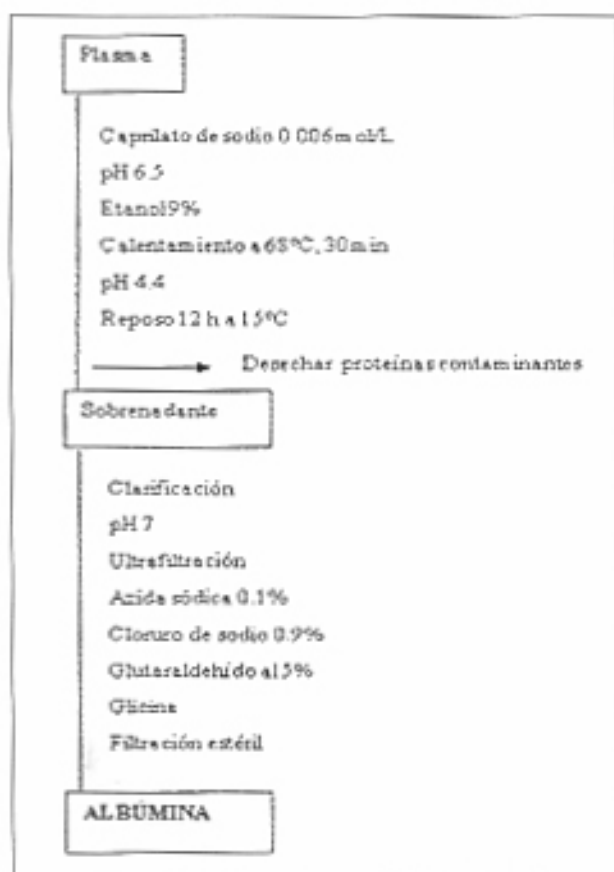


Fig. 1.- Método de termocoagulación selectiva para la obtención de albúmina.

ción de cloruro de sodio se analizó por colorimetría<sup>13</sup>. Para calcular el contenido de polímeros se utilizaron las técnicas de cromatografía de filtración en gel y electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5%<sup>14</sup>. Para la cromatografía las muestras se diluyeron al 3% y se aplicaron en una columna (1 m x 25 mm) con Sephacryl S-200 como matriz, buffer Tris-HCL 50 mM, NaCl 0.1 mol/L, pH 7 y flujo de 34 mL/h. Las corridas electroforéticas se realizaron en condiciones desnaturizantes. A cada muestra se le añadió buffer muestra y se calentaron cinco minutos a 100 °C, aplicando una corriente constante de 30 mA. Se utilizó un marcador de peso molecular (Pharmacia, Suecia).

### - Ensayos inmunohematológicos<sup>15</sup>

Se utilizó como patrón albúmina SIGMA (Estados Unidos).

Para la determinación de la presencia de reacciones positivas no deseadas (hemólisis y Rouleaux) se mezcló albúmina y hematíes al 5% de los grupo A, B y O. La mezcla se incubó de 18-22 °C a 37 °C durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó. En la determinación de la capacidad de potenciar la reacción de aglutinación, se emplearon sueros humanos

con anticuerpos eritrocitarios anti-RhD y anti-Rhc de la clase IgG obtenidos de pacientes aloimmunizados, estos se mezclaron con albúmina y hematíes de grupo O y fenotipo Rh: C+c+D+E-e+. Se incubaron a 37 °C por 30 minutos y se centrifugaron. La presencia de inmunoglobulina G (IgG) se determinó al mezclar albúmina con hematíes de grupo O RhD positivos sensibilizados con anticuerpos anti-D de la clase IgG. Después de 5 minutos de incubación a 18-22 °C y se centrifugaron a 150g. La presencia de sustancias de grupo sanguíneo ABO y Lewis se determinó al mezclar los reactivos hemoclasificadores anti-A, -B, -Le<sup>a</sup> y -Le<sup>b</sup> (BIOTEST) con un volumen de albúmina. Como control negativo se sustituyó la albúmina por solución salina y como control positivo se adicionó en vez de albúmina un volumen de sustancia de grupos A, B, Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup> (BIOTEST). Después de la incubación se añadió a cada tubo un volumen de la suspensión de los hematíes del fenotipo específico. Posteriormente se centrifugo a 150g por 30 segundos. Para comprobar la ausencia en la albúmina de actividad similar a la neuraminidasa se mezclaron los hematíes y la albúmina y se incubaron a 37 °C por una hora, luego se añadió lectina anti-T (*Arachys hypogea*) (GAMMA BIOLOGICALS, Estados Unidos) y se centrifugaron los tubos a 150g durante 30 segundos.

#### - Análisis estadístico

Los valores de rendimiento y contenido de hemopigmentos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando un ensayo de análisis de varianza con el programa Statistica versión 5.0 (STATSOFT, Estados Unidos).

## RESULTADOS

El método de termocoagulación permitió obtener albúmina bovina, equina, porcina y ovina, lográndose el rendimiento más alto para la especie bovina (Tabla I). Los valores para la especie porcina mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ), con relación al resto de las especies.

La adición de cantidades crecientes de glutaraldehído (0.001-0.16%) a las muestras de albúmina, solo mostró aglutinación cuando se añadieron 0.06 y 0.08%, comportándose de igual manera en las cuatro especies estudiadas. En los resultados que se muestran en la tabla II, solo se especificó la capacidad de potenciar la reacción de aglutinación, siendo negativo el resto de los ensayos inmunohematológicos. En las muestras donde se utilizó la misma concentración de glutaraldehído y glicina fue donde solamente se observó aglutinación (Tabla II).

Los valores de pH, concentración de proteínas y cloruro de sodio de los productos finales se ajusta-

TABLA I.- Rendimientos obtenidos para sobrenadantes y productos finales en la obtención de albúmina de las cuatro especies de mamíferos

ESPECIES	ETAPAS	RENDIMIENTOS (g/L)
Bovina	Sobrenadante	14.95
	Producto final	13.46
Equina	Sobrenadante	12.13
	Producto final	11.26
Porcina	Sobrenadante	10.70
	Producto final	10.21
Ovina	Sobrenadante	11.30
	Producto final	10.43

TABLA II.- Efecto de la adición de glutaraldehído y glicina sobre la reacción de aglutinación en las preparaciones de albúminas

Concentración de glutaraldehído al 5% (%)	Concentración de glicina (%)	Potenciador de la reacción de aglutinación
0.06	-	falsa aglutinación
0.06	0.06	aglutinación
0.06	0.12	poca aglutinación
0.06	0.18	poca aglutinación
0.08	-	falsa aglutinación
0.08	0.08	aglutinación
0.08	0.16	poca aglutinación
0.08	0.24	poca aglutinación

ron de manera tal que quedaran dentro del rango aceptado (Tabla III). Esto resulta de gran importancia para que no se afecten los resultados en las pruebas inmunohematológicas.

El contenido de hemopigmento obtenido para las especies estudiadas osciló entre 0.414 y 0.685, siendo el valor más bajo el de la albúmina patrón (Tabla III), el cual mostró diferencias estadísticamente muy significativas ( $p < 0.0001$ ).

El análisis del estado de agregación por cromatografía (Tabla IV) y electroforesis (Figura 2), de los productos finales y la albúmina patrón brindaron similitud en todas las muestras analizadas.

En la tabla IV se puede observar un ligero incremento en los monómeros, trímeros y polímeros de la albúmina patrón.

La electroforesis muestra una banda intensa a los 66 kDa (monómero) y otras tres bandas superiores que corresponden con los dímeros, trímeros y polímeros de acuerdo al marcador de peso molecular (Figura 2).

Los ensayos inmunohematológicos (reacciones positivas no deseadas, capacidad potenciadora, presencia de IgG, sustancias de grupo sanguíneo ABO y Lewis y ausencia de actividad neuraminidasa) re-

moléculas de albúmina y aquellas que están temporalmente libres de protección se desnaturalizan, mientras aquellas que si están protegidas acumulan altas concentraciones de ácidos grasos y se vuelven resistentes al calor y a la urea<sup>14</sup>.

Mayormente, la albúmina obtenida por termo-coagulación selectiva se encuentra en forma de monómero, es por ello que se hace necesario emplear un agente polimerizante (glutaraldehído 5%) que le proporcione la agregación necesaria para que pueda ser utilizada en los ensayos inmunohematológicos. Este compuesto, se une covalentemente a los grupos amino de la lisina e hidroxilisina en la molécula proteica, creando una estructura más estable que la lograda por la agregación física<sup>15</sup>.

El número de grupos amino disponibles capaz de interactuar con el glutaraldehído en cada proteína fue estudiado por Silva y colaboradores<sup>16</sup>. La albúmina presentó 59 grupos amino libres que son capaces de unirse covalentemente al glutaraldehído. Estos grupos amino libres provienen de los grupos  $\alpha$  amino de los residuos de la lisina y un grupo  $\alpha$  amino terminal. Como la albúmina presenta alto contenido de lisina libre, el glutaraldehído resulta efectivo para la formación de polímeros.

Las muestras de albúmina de las cuatro especies estudiadas se comportaron de igual manera al adicionar diferentes concentraciones de glutaraldehído al 5%, influyendo solamente en la determinación de la capacidad de potenciar la reacción de aglutinación (Tabla II). Para evitar la formación continua de polímeros, se empleó glicina que actúa bloqueando los grupos aldehídos libres del glutaraldehído<sup>19</sup>.

Solo se obtuvo aglutinación en aquellos casos donde se utilizó la misma concentración de glutaraldehído y glicina (Tabla II). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Cheung y Brown, quienes también emplearon la glicina para bloquear los grupos aldehídos libres del glutaraldehído<sup>20</sup>. Ellos demostraron que la acción inhibitoria de la glicina sobre el glutaraldehído es satisfactoria, cuando ambos compuestos presentan la misma concentración<sup>20</sup>.

Según la farmacopea USP XIII, los valores de pH para estas soluciones deben encontrarse entre 6.5-7.5<sup>13</sup> (Tabla III), pues una disminución del pH del medio provocaría un aumento en la fijación de los anticuerpos y afectaría los resultados de las pruebas inmunohematológicas<sup>21</sup>.

La concentración de proteínas de las muestras también es un aspecto importante a tener en cuenta para lograr la aglutinación de los hematíes. Ensayos realizados en nuestro laboratorio demostraron que, valores de concentración inferiores a 150mg/mL no provocan aglutinación de los eritrocitos debido a que

la cantidad de albúmina es insuficiente. Por el contrario, valores superiores a 300mg/mL tornan excesivamente viscoso el medio y dificultan la aglutinación<sup>22</sup>.

Las lecturas de densidad óptica a 403nm para determinar el contenido de hemopigmentos deben ser inferiores a 0.25, lo que corresponde con 0.2mg de hemopigmentos por gramo de proteína<sup>13</sup>. A diferencia de la albúmina patrón los valores de hemopigmentos obtenidos fueron superiores, esto se debió al empleo de plasma hemolítico, cuyas lecturas de D.O a 403nm oscilaron alrededor de 0.727. A pesar de que el proceso de termo-coagulación selectiva permite reducir estos valores, en nuestro caso no fue posible debido al alto grado de hemólisis del plasma de partida.

Los valores de concentración de cloruro de sodio se encontraron dentro del intervalo admitido<sup>13</sup>. En aquellas soluciones de albúmina que contienen una inadecuada concentración de cloruro de sodio se produce un desbalance entre los hematíes y el medio, provocando lisis eritrocitaria afectando los resultados de los ensayos inmunohematológicos.

Tanaka y colaboradores refieren valores muy distantes a los obtenidos en este trabajo en cuanto a monómeros (56.0%), dímeros (23.6%), trímeros (12.2%) y polímeros (8.2%). Ellos emplearon como agente polimerizante, una mezcla de glutaraldehído (0.06%)/formaldehído (0.1%) y con ello lograron títulos anti-Rho(D) de 1:512<sup>16</sup>. Aunque estos autores obtuvieron altos títulos, resulta importante destacar que estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que preparaciones de albúmina con alto contenido de polímeros provocan falsa aglutinación<sup>21</sup>.

Los resultados en la electroforesis y en la cromatografía ratifican que la cantidad de glutaraldehído y glicina utilizadas, fueron suficientes para garantizar la polimerización necesaria y lograr la aglutinación en las pruebas inmunohematológicas.

Al analizar las muestras de albúmina no se detectaron reacciones positivas no deseadas (hemólisis y Rouleaux), en ninguna de las albúminas analizadas. Las soluciones de albúminas que contienen concentraciones bajas de ácidos grasos en presencia de cantidades significativas de albúmina polimerizadas pueden provocar, en ocasiones, reacciones positivas no deseadas<sup>9</sup>.

Además de la hemólisis y el fenómeno Rouleaux, pueden existir otras causas que provocan falsos resultados positivos como son: el uso de sueros no específicos, isoaglutininas irregulares, células sensibilizadas previamente y la presencia de aglutinas anti-especie<sup>9</sup>.

Los títulos de hemoaglutinación frente a eritrocitos Rho D positivos fueron de 1:32 para cada espe-

TABLA III.- Parámetros fisicoquímicos realizados a los productos finales por especie

ESPECIES	pH	Concentración de proteína (mg/mL)	Contenido de hemopig. (DO <sub>410nm</sub> )	Concentración de cloruro de sodio (%)
Bovina	7.11	272	0.685	0.89
Equina	7.35	280	0.414	0.9
Porcina	7.0	291	0.659	0.88
Ovina	6.6	276	0.593	0.91
Patrón(Sigma)	7.15	290	0.055	0.85
Valores aceptados	6.5-7.5	260-300	≤ 0.25	0.85-0.95

Tabla IV.- Porcentaje de monómeros, dímeros, trímeros y polímeros obtenido en cada especie estudiada, determinado por cromatografía

Especies	Monómeros (%)	Dímeros (%)	Trímeros (%)	Polímeros (%)
Bovina	86.53	10.55	1.78	1.14
Equina	85.56	11.10	2.05	1.29
Porcina	86.20	11.27	1.81	1.35
Ovina	85.30	10.39	2.20	1.11
Albúmina patrón (Sigma)	87.10	8.2	2.60	2.10

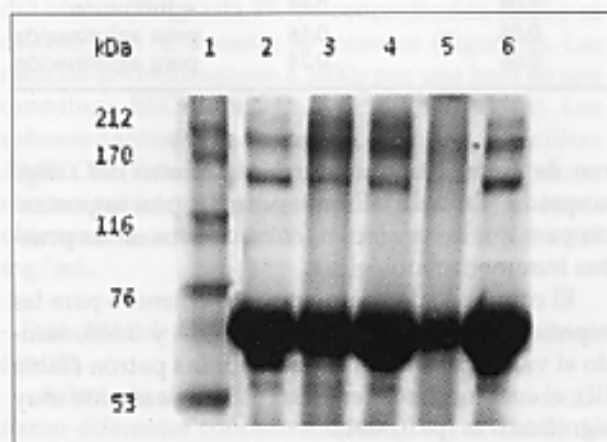


Fig. 2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% con SDS de los productos finales de cada especie. Línea 1 - Marcador de peso molecular (Pharmacia), 2 - bovina, 3 - equina, 4 - porcina, 5 - ovina, 6 - albúmina patrón (Sigma).

sultaron negativos para las cuatro especies estudiadas, al igual que para la albúmina patrón.

## DISCUSIÓN

La termocoagulación selectiva o fraccionamiento térmico con etanol es un método simple que ofrece grandes ventajas tales como: un mínimo requerimiento de inversión en el equipamiento, bajo costo de producción, elevada pureza y altos rendimientos. Su

única desventaja es que solo se utiliza para obtener preparaciones de albúmina, debido a que el resto de las proteínas plasmáticas se desnaturalizan<sup>14,16</sup>.

Los procesos de calentamiento del plasma son realizados a temperaturas cercanas al rango de pasteurización en presencia de caprilato y se corresponden con la tecnología desarrollada por Schneider y colaboradores en 1975<sup>8</sup>, la cual ha sido adoptada por diferentes centros de fraccionamiento de varios países<sup>14</sup>. Versiones del mismo, combinan la separación con polietilenglicol y tratamientos de calentamiento y han logrado obtener albúminas con una pureza cercana al 100% y rendimientos del 90%; esto unido a su corto tiempo de procesamiento y al bajo costo del equipamiento lo han convertido en un método popular. Sin embargo, en Estados Unidos solo es utilizado para separar albúmina bovina y no es normalmente autorizado para las preparaciones de albúmina humana para uso *in vivo*<sup>14</sup>.

Los valores de rendimiento obtenidos en este trabajo (Tabla I), fueron inferiores a los reportados por otros autores<sup>16-17</sup>. Esto pudo deberse a que los lotes fueron realizados a escala de laboratorio y al aplicar el proceso de termocoagulación no se pudo lograr una agitación uniforme, y trajo como consecuencia una desigual exposición al calor de todas las proteínas del sistema. Además, cuando el plasma se somete a altas temperaturas (68-70 °C) en presencia de caprilato de sodio, este se disocia y se mueve entre las

cie. Nuestras albúminas se comportaron de manera similar a la albúmina patrón, por tanto, las albúminas analizadas potenciaron la reacción de aglutinación adecuadamente.

El suero hemoclasificador anti-D es uno de los diagnosticadores de grupo sanguíneos utilizados en la tipificación sanguínea en los bancos de sangre y servicios de transfusiones. La mayoría de los anticuerpos anti-D son de la clase IgG conocidos como «incompletos», pues frecuentemente no aglutinan los glóbulos Rho D positivos suspendidos en medio salino, por lo que, necesitan de agentes potenciadores, como la albúmina (alrededor del 70%), para llevar a cabo la reacción de aglutinación.

Para evidenciar la ausencia de IgG se realizó un ensayo de aglutinación, con suero antiglobulina humana. En nuestras preparaciones no se detectó la presencia de esta proteína. De forma general, en los bancos de sangre se emplean sustancias comerciales que contienen anticuerpos antigamma, este es un ensayo ampliamente usado en inmunohematología, tanto en enfermedades hemolíticas del recién nacido, como en ensayo de compatibilidad, en pesquisa y titulación de anticuerpos, en investigación de variantes de ciertos antígenos (Du) y otros<sup>9</sup>.

Las muestras de albúminas de las diferentes especies no presentaron sustancias de grupo sanguíneo ABO y Lewis, resultando satisfactorias. Las preparaciones de albúmina pueden contener sustancias similares a los antígenos A y B humanos, capaces de neutralizar a los anticuerpos anti-A, anti-B, anti-Le<sup>a</sup> y anti-Le<sup>b</sup>, lo cual imposibilita su uso en los ensayos inmunohematológicos<sup>9</sup>. Sustancias antigénicas similares a los grupos sanguíneos humanos se han aislado en otros niveles de la escala animal y vegetal. Es probable que en la superficie del eritrocito existan otros antígenos en potencia, aún no descubiertos. Los grupos A, B y O reconocidos con reactivos usados para humanos, también pueden ser detectados en los glóbulos rojos y células de algunas especies animales.

El sistema Lewis contiene principalmente dos antígenos nombrados Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, que a diferencia de los demás antígenos eritrocitarios, son sustancias tisulares solubles que están presentes en los líquidos orgánicos y se absorben secundariamente sobre los hematíes. Sus anticuerpos (anti-Le<sup>a</sup> y anti-Le<sup>b</sup>) son de tipo IgM con una frecuencia del 20%.

No se detectó la presencia de actividad neuraminidasa en las preparaciones, debido a que las albúminas no fueron capaces de exponer el antígeno T en los hematíes. Las soluciones de albúminas pueden contener además sustancias con actividad neuraminidasa, que cuando están presentes exponen el criptoantígeno T de células rojas, siendo el anti-T un anticuerpo natural del suero humano.

En resumen, el método de termocoagulación selectiva empleado nos permitió obtener albúmina bovina, equina, porcina y ovina para ser usada en el diagnóstico inmunohematológico. Los productos obtenidos presentaron un alto grado de pureza y un rendimiento promedio de 11.34g/L, lográndose la polimerización adecuada al añadir igual concentración de glutaraldehído y glicina (0.06-0.08%) a las muestras de albúmina.

Las albúminas obtenidas de cada especie cumplieron con los parámetros de calidad establecidos, exceptuando el contenido de hemopigmento, no obstante pueden ser empleadas en el diagnóstico serológico de los bancos de sangre y servicios de transfusiones.

## ABSTRACT

**Obtaining of albumin from different mammalian species for immunohematologic use in blood banks.**

The albumin has a fundamental role as basic component in several biological reagents for diagnostic use. For the obtaining of this protein, hemolytic plasma from different mammalian species (bovine, equine, porcine and ovine) was subjected to a selective thermocoagulation process. In order to guarantee the necessary polymerization different glutaraldehyde and glycine concentrations were evaluated in the albumin samples. To the final products pH, protein and sodium chloride concentration, hemopigments content and polymers were determined.

Some immunohematologic assays were also determined, that included: undesirable positive reaction, potentiating capability, IgG presence, substance of ABO blood groups and Lewis, and no neuraminidase activity. An average yield of 14.95 g/L was obtained, being achieved the appropriate polymerization when adding the same glutaraldehyde and glycine concentration (0.06-0.08%). The physical-chemical and immunohematological evaluations carried out to the albumin samples were satisfactory, excepting the hemopigments content that although no variation was observed in the serologic assays, if it influenced in the final coloration of the solution. In all cases, the obtained albumins could be used in the immunohematologic assays of blood banks and transfusion services.

**Key words:** Albumin, termocoagulation, inmunohematología, polimerización.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu M, Estronca L, Moreno M, Vaz W. Binding of a fluorescent lipid amphiphile to albumin and transfer to lipid bilayer membranes. *Biophysical J* 2003; 84: 386-99.
2. Bhattacharyya AA, Grune T, Curry S. Binding sites for and long-chain fatty acids. *J Mol Biol* 2000; 303: 721-3.
3. Colgan K, Moody M, Witte K. Responsible use of blood products in response to supply and demand. *Am J Health Syst Pharm* 2000; 57: 2094-8.
4. Nicholson JP, Wolmarans M, Park CR. The role of albumin in critical illness. *Brit J Anaesth* 2000; 85: 4599-610.
5. Baldin GS, Weinstock J. Nucleotide sequence of porcine liver albumin. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 9045-6.

6. Brown WN, Dziegielewska KM, Foreman RC, Saunders NR. Nucleotide and deduced amino acid sequence of sheep serum albumin. *Nucleic Acid Res* 1989; 17: 1095-6.
7. Stubitowski DM, Venta PD, Douglas CL, Zhou RX, Ewart SL. Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Anim Genet* 2001; 32: 78-88.
8. Schneider W, Lefevre H, Fiedler H, McCarty LJ. An alternative method of large scale plasma fractionation for the isolation of serum albumin. *Blut* 1975; 30: 121-34.
9. Meza C y Correa N. *Inmunohematología. Principios y técnicas. Publicaciones técnicas mediterráneo Ltda, Editorial Universitaria, 1988.*
10. Guidelines for the blood transfusion services. Chapter 8. HMSO; London, UK, 1992.
11. Gutiérrez E, Bencomo A, Moya A, Joo L, Hernández J, Cádiz A. Obtención de albúmina bovina por termocoagulación. Análisis fisicoquímico e inmunohematológico. *Rev Arg Transf* 2001; 27: 129-35.
12. Gornal AG, Bordwill S, David MM. Determination of serum proteins by the Biuret reactin. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-66.
13. Farmacopea USP XXIII, 2004.
14. Peters T, Jr. All about albumin. *Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. Ed. by Academic Press, 1996.
15. Moya A, Paz O, Joo L, Gutiérrez E, Rodríguez Z, Cádiz A. Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización. *VaciiMonitor* 2000; 9: 10-5.
16. Tanaka K, Sawatani E, Arashiro F y col. Main human plasma derived medicinal products-Current situation in Brazil. *Farmacia y Química* 2003; 36: 37-43.
17. Cao L, Rantwijk F, Sheldon R. Cross linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett* 2000; 2: 1361-4.
18. Silva C, Sousa F, Guditiz C, Cavaco-Paulo A. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. *Food Technol Biotechnol* 2004; 42: 51-6.
19. Kavun E, Kolibo D, Romaniuk S. Antigenic properties of glycine residue blocking aldehyde group of cross-linking agent in peptide-protein conjugates. *Ukr Biokhim Zh* 2001; 73: 101-6.
20. Cheung H, Brown M. Evaluation of glycine as an inactivador of glutaraldehyde. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34: 211-4.
21. Genetet B y Manoni P. Bases genéticas en inmunología de la transfusión sanguínea, La Transfusión, Ed Toray S.A, 1980.
22. Gutiérrez E, Bencomo A, Cádiz A. Empleo de la termocoagulación selectiva en la obtención de albúmina bovina al 30%. *Rev Cubana Quím* 2001; 8: 150.