



XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CE-018 (ID: 2245)

Autor: Kraemer, Simón

Título: Inhibidores de la agregación plaquetaria del veneno de *Bothrops alternatus*

Director: Gay, Claudia Carolina

Co-Director: Gauna Pereira, María Del Carmen

Palabras clave: yarará grande, plaquetas, agonistas, metaloproteinasas, fosfolipasas, serinoproteinasas

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Evc - Cin

Periodo: 02/08/2020 al 30/07/2021

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Exactas Y Naturales Y Agrimensura

Proyecto: (17F003) Efecto de toxinas de venenos de serpientes del nordeste argentino en la función plaquetaria.

Resumen:

Los venenos de serpientes son una mezcla compleja de proteínas y péptidos biológicamente activos. Muchos de estos compuestos alteran la hemostasia y su principal acción sobre la función plaquetaria, es inhibiendo o activando su agregación. La composición del veneno de *Bothrops alternatus* (yarará grande o víbora de la cruz), incluye tres familias mayoritarias, las metaloproteinasas (SVMPs; 43,1%) y las serinoproteinasas (SVSPs; 24,1%) de venenos de serpientes y las fosfolipasas A2 (PLA2s; 7,8%), entre otros componentes minoritarios como las L-aminoácido oxidadas, lectinas de tipo C y desintegrinas. Algunos componentes minoritarios, se han purificado y estudiado su acción sobre la agregación plaquetaria, pero poco se sabe de la acción sobre plaquetas de los componentes principales de este veneno. El objetivo del trabajo fue utilizar cócteles de inhibidores para evaluar, a modo de screening, el efecto sobre la agregación plaquetaria de las tres principales familias de proteínas del veneno de *B. alternatus*, serpiente de importancia médica en el nordeste argentino. Se incubaron soluciones de 1 µg/mL de veneno en presencia y ausencia de inhibidores: PMSF (5 mM), Na2-EDTA (5 mM) y p-BPB (relación molar inhibidor:proteína 1:3) para inhibir las SVSPs, SVMPs y PLA2s, respectivamente. Los cócteles ensayados fueron 3: cóctel 1 PMSF/pBPB, cóctel 2 PMSF/Na2-EDTA y cóctel 3 Na2-EDTA/pBPB (pBPB por 24 hs, y PMSF/Na2-EDTA por 1 h, a temperatura ambiente). Luego, se midieron las actividades enzimáticas residuales: azocaseinolítica (actividad de SVMPs), amidolítica (actividad de SVSPs) y hemolítica indirecta (actividad de PLA2s). Para el ensayo de agregación plaquetaria se utilizó plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP) y plaquetas lavadas (PL) obtenidas de muestras de sangre citratada (donantes sanos) y utilizando un método turbidimétrico. El PRP/PL fue incubado por 3 minutos a 37°C con soluciones de veneno-cócteles (10,0 5,0; 2,0 y 1,0 µg). Luego se agregó el agonista, ristocetina (1,5 µg/mL), ADP (5 µM), colágeno tipo I (0,5 µg/mL) ó trombina (0,3 U/mL), en un volumen final de 100 µL. Se registró la absorbancia a 405 nm en intervalos de 30 segundos (~5-10 min), con agitación constante y utilizando lectora de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific). El porcentaje de agregación plaquetaria se calculó con la siguiente fórmula: [(Abs405 PRP/PLantes de agonista – Abs405 PRP/PLdespués de agonista)/(Abs405 PRP/PLantes de agonista – Abs405 PPP/tampón Tyrode)]x 100. Los agregados plaquetarios se observaron en microscopio de contraste de fases. La significancia de las diferencias entre las medias (n= 2) fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Tukey ($p < 0,05$). Los valores obtenidos para los ensayos de las actividades enzimáticas residuales mostraron inhibición significativa de los cócteles respecto a los controles. Así en el cóctel 1 se observó que sólo la fracción SVMP permaneció activa (95,76% de actividad azocaseinolítica); el cóctel 2 presentó actividad PLA2 conservada (halo hemolítico de cóctel y veneno control= 15,0 mm) y en el cóctel 3 sólo la fracción SVSP permaneció activa luego de la incubación (actividad amidolítica del veneno control 0,344 U/mg y de la mezcla veneno-cóctel 0,311 U/mg). Al ensayar la acción de los cócteles sobre la agregación plaquetaria inducida por el veneno de *B. alternatus*, se observó inhibición de los cócteles 1 y 2, y leve activación del cóctel 3. El cóctel 1 mostró efecto inhibidor sobre la agregación inducida por ristocetina (1 µg cóctel: 10,66%; ristocetina: 104,01%) y colágeno (2 µg cóctel: 42,06%; colágeno: 79,75%). Una SVMP aislada de este veneno (baltergina) presentó el mismo perfil de inhibición, actuando probablemente por bloqueo y/o clivaje de receptores plaquetarios. El efecto inhibidor del cóctel 2 fue sobre la agregación inducida por colágeno (5 µg cóctel: 22,91%; colágeno: 79,34%) y trombina (5 µg cóctel: 43,28%; trombina: 90,83%). Previamente se demostró que una PLA2 ácida aislada de este veneno fue capaz de inhibir la agregación inducida por trombina debido a su acción sobre fosfolípidos circulantes. Sin embargo, la inhibición de la agregación mediada por colágeno, es un resultado novedoso, y podría estar relacionado a la acción de componentes minoritarios del veneno (lectinas tipo C), y/o a la naturaleza ácida de las PLA2s activas en cóctel 2. El cóctel 3 indujo una leve activación no significativa de la agregación (10 µg cóctel: 7,28%), cuando se incubó en ausencia de agonista. Algunas SVSPs presentan actividad similar a trombina (TLEs), debido a la leve activación observada, probablemente el contenido de TLEs en esta secreción es muy bajo. En conclusión, el veneno de *B. alternatus* tiene un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria, debido principalmente a la acción de las SVMPs y PLA2s. Éstos actuarían de forma sinérgica con los componentes minoritarios, contribuyendo así, al sangrado característico del accidente botrópico.