



XXII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CE-082 (ID: 551)

Autor: Fusco, Luciano Sebastian

Título: Etapas preliminares en la purificación de una Lectina tipo C del veneno de *Crotalus durissus terrificus* del NEA

Director:

Palabras clave: Convulxina, Lectinas, Cascabel

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Cofinanciadas Pos-doctorales

Periodo: 01/04/2016 al 31/03/2018

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

Proyecto: (13CF01) Proteínas de venenos ofídicos con potencial aplicación farmacológica

Resumen:

Del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t) de especímenes de Brasil se purificó una lectina tipo C denominada convulxina (CVX), de la cual se estudio su capacidad agregante plaquetaria (AP) "in vitro", demostrando que se une a la glicoproteína VI (GPVI) en las plaquetas (Francischetti, Saliou et al. 1997; Jandrot-Perrus, Lagrue et al. 1997); como así también que es capaz de unirse a integrinas del tipo alfa2beta1 (Niedergang, Alcover et al. 2000).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo el aislamiento, a partir del veneno de ejemplares que habitan el nordeste argentino, de una fracción proteica, mediante cromatografía de exclusión molecular, la que presentó propiedades AP y hemaglutinante (AH) (Fusco. et al., 2014). El control de pureza de la fracción obtenida no fue el adecuado para ensayos farmacológicos rigurosos, de allí que se dio paso a nuevas estrategias de purificación que permitan alcanzar la calidad deseada. En el presente trabajo se presentan las etapas preliminares en la purificación exhaustiva de una lectina tipo C del veneno de C.d.terrificus, en el marco de una beca postdoctoral recientemente iniciada. Se trabajó con mezclas de venenos desecados del veneno de C.d.terrificus obtenido del Serpentario de la ciudad de Corrientes. Una muestra de veneno de 10 mg se disolvió en solución de Tris-HCl pH: 8 y posterior ultracentrifugación en tubos Amicon (50 kDa). La solución resultante se redujo a un volumen de 500 µL que posteriormente se sembraron en una columna Q-FF (GE-Healthcare) instalada en un cromatógrafo líquido ÄKTAPrime Plus. Se diseñó un programa con gradiente en el que la concentración de Tris-HCl 1M. Con las fracciones de elución se realizaron Electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) en presencia de dodecyl sulfato de sodio (SDS-PAGE), teñidos con Coomassie Blue. Se determinó la actividad AP la que se midió a partir de un plasma rico en plaquetas (PRP), por método turbidimétrico. Para ello a 665 ul de PRP preincubados con 85 ul de la fracción seleccionada en PBS (1 mg/ml) durante 10 min. Por otro lado para control positivo de agregación se utilizó ADP en distintas concentraciones. Las mezclas posteriormente se agitaron a 37°C, la que se continuó por 5min. Luego de la formación de grumos por la agregación plaquetaria, se dejó reposar 5 min y se leyó turbidez del sobrenadante a 410 nm. Como control negativo, se midió la turbidez provocada por PBS y se calculó el % de inhibición inducida por la enzima. En un frotis con plaquetas tratadas se realizó la coloración clásica para hemograma May Grünwald-Giemsa. Se evaluó AH en pocillos de una placa de microtitulación, se colocaron 50 µL de solución TCS (Tris-CaCl₂-NaCl) a pH 7 y luego se agregó 50 µL de veneno o proteína purificada en los pocillo. Por último, solución al 3% de glóbulos rojos humanos del grupo O Rh+ fueron añadidos a cada pocillo. Las lecturas se realizaron luego de una hora de incubación a temperatura ambiente. Los resultados fueron clasificados en hemoaglutinación completa y no hemoaglutinación. El veneno fue sometido a ultracentrifugación, así se eliminaron moléculas de peso molecular inferior a 50 Kda, posteriormente se aplicó a una columna de intercambio anionico Q-FF. De esta manera se realizó la separación de las proteínas que a pH 8 presentaban una carga neta positiva primer pico de las negativas que se representaron con tres picos en el cromatograma. Todas las fracciones de elución fueron testeadas con ensayos para determinar actividad hemoaglutinante y agregante plaquetaria. Solo las primeras fracciones fueron positivas evidenciando la presencia de lectinas. Dado que la proteína de interés eluyó en el pico A se puede prever que esta presenta un punto isoeléctrico superior a 8 por no ser retenida en la columna cargada positivamente en un medio tamponado a pH 8. Cada fracción de elución fue sometida a electroforesis por SDS-PAGE. Las muestras correspondientes al primer pico, no retenido por la columna, presentaron dos bandas superiores a 97 KDa. Estos hallazgos coinciden con estudios realizados por otros autores donde se reporta una lectina de 110 KDa compatible con un complejo (Alfa-Beta)₄. Adicionalmente se evidencian bandas de bajo peso molecular aprox. 14KDa, si se tienen en cuenta que la solución de veneno fue en primera medida sometida a un proceso de ultrafiltraciones eliminando las proteínas de bajo peso molecular (50KDa) es altamente probable que sean parte de la estructura cuaternaria de las moléculas de alto peso molecular. Por esto concluimos que la combinación de dos métodos de separación de proteínas, ultrafiltración e intercambio anionico, condujo a la obtención un extracto rico en proteínas compatibles convulxina (aprox. 100 kDa). Sin embargo, resta confirmar si las bandas que se visualizan en la SDS-PAGE de masa molecular del orden de 15 kDa son cadenas pertenecientes a la proteína oligomérica ó si son extrañas a esta lectina de interés.