



XXV Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CE-038 (ID: 1670)

Autor: Luque, Daiana Evelyn

Título: Efecto de una metaloproteinasa de veneno de serpiente del nordeste argentino sobre la agregación plaquetaria

Director:

Palabras clave: Baltergina, Plaquetas, Bothrops alternatus, Ristocetina, Colágeno

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Evc - Cin

Periodo: 01/05/2018 al 30/04/2019

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 de proteínas y péptidos biológicamente activos, que actúan afectando la hemostasia por activación o inhibición de factores de la coagulación y de receptores plaquetarios, o bien por daño del endotelio mediante clivaje de componentes de la membrana basal. Las Metaloproteinasas de Venenos de Serpientes (SVMPs) constituyen la familia de proteínas más abundantes del veneno de *Bothrops alternatus* (yará grande). Baltergina es una PIII SVMP, aislada de este veneno, con actividades proteolítica, hemorrágica, procoagulante y desintegrina, capaz de unirse y bloquear integrinas de membrana. Luego de una injuria, la interacción del complejo plaquetario GPIIb-IX-V con el factor de von Willebrand (FvW), y de la integrina $\alpha 2\beta 1$ con el colágeno tipo I expuesto en la membrana basal, juegan un rol clave en la activación y agregación plaquetaria, convirtiéndose en blancos de acción de las SVMPs. El objetivo de este trabajo fue utilizar un método turbidimétrico, empleando lectora de microplacas, para evaluar el efecto de baltergina sobre la agregación plaquetaria. La enzima se purificó a partir del veneno de especímenes adultos de *B. alternatus* por combinación de dos técnicas cromatográficas. Para obtener baltergina inactivada, se incubó con Na₂EDTA (inhibidor), y el excedente de éste se eliminó por cromatografía de exclusión molecular. Se ensayó la actividad proteolítica, para comprobar la efectividad del inhibidor, y se realizó la cuantificación de proteínas. Primeramente, se determinó la actividad procoagulante de la enzima utilizando plasma citratado incubado con baltergina (0,007; 0,07; 0,35 y 0,7 μM) y se registraron los tiempos de coagulación (TC) utilizando un coagulómetro. Se obtuvo el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) a partir de muestras de sangre citratada, centrifugando a bajas revoluciones y tomando los dos tercios inferiores. La fracción superior restante se centrifugó a altas revoluciones, y del sobrenadante se obtuvo Plasma Pobre en Plaquetas (PPP). El PRP se incubó a 37°C con diferentes concentraciones de baltergina (0,007–0,07 μM) y baltergina-Na₂EDTA (0,07 μM) durante 20 minutos para ristocetina (1,5 $\mu\text{g/ml}$) y 5 minutos para colágeno tipo I (5 $\mu\text{g/ml}$). Se registró la turbidez de la suspensión a 405 nm por 5 minutos a 37°C, con agitación constante, utilizando lectora de microplacas y se calculó el porcentaje de agregación plaquetaria. Por último, se realizó el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA siguiendo el test de Tukey con valores de $p < 0,05$. Se determinó la concentración máxima de baltergina a la cual el plasma no coagula y se decidió trabajar con concentraciones menores o igual a 0,07 μM . Mediante el ensayo de agregación en lectora de microplacas, se demostró que la enzima, en una concentración de 0,07 μM , fue capaz de inhibir significativamente la agregación inducida por colágeno, obteniéndose valores de 30,67 \pm 2,13% y 57,49 \pm 0,50%, en presencia y ausencia de baltergina, respectivamente. El colágeno se une al receptor $\alpha 2\beta 1$ presente en la superficie plaquetaria desencadenando el proceso de agregación. Baltergina podría unirse al dominio $\alpha 2\text{I}$ del receptor evitando la unión del colágeno, como se demostró para otras SVMPs, a través del su dominio símil desintegrina. Se comprobó además que baltergina (0,07 μM) inhibió significativamente la agregación plaquetaria mediada por ristocetina, obteniéndose valores de 56,59 \pm 1,25% y 77,05 \pm 0,16% en presencia y ausencia de la enzima, respectivamente. Este ensayo evalúa la unión del FvW al receptor GPIIb-IX-V. Sin embargo, baltergina-Na₂EDTA no modificó la agregación plaquetaria mediada por este agonista (78,48 \pm 1,84%). En este caso, la actividad inhibidora podría deberse a la acción proteolítica de la enzima sobre el FvW o sobre su receptor, demostrando que el dominio catalítico de baltergina es fundamental en el efecto inhibitorio. En conclusión, se pudo demostrar que baltergina (0,07 μM) fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria mediada por colágeno y ristocetina. Asimismo, en la agregación mediada por ristocetina se comprobó que el dominio catalítico de la enzima es el responsable de su acción inhibitoria. Estudios posteriores, utilizando factores y/o receptores plaquetarios podrán dilucidar el mecanismo molecular de acción de la metaloproteinasa y evaluar su potencial uso como agente antitrombótico.