



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 26 de octubre de 2017

Sr. Secretario de Ciencia y Técnica  
de la Universidad de Buenos Aires  
Dr. Ing. Aníbal COFONE

Por la presente tengo el agrado de dirigirme a Ud. con el fin de presentar mi Informe Final de la Beca categoría Estimulo (Período: 01-09-2016 al 31-08-2017).

Mi proyecto de beca es sobre el tema: **“Caracterización de eritropoyetinas modificadas por carbamilación y N-homocisteinilación. Estudio de su acción sobre el endotelio”**.

### **Introducción**

El factor de crecimiento eritropoyetina (Epo), es reconocido por su función principal como inductor de eritropoyesis. Sin embargo, también es requerido para la supervivencia de distintos tipos celulares, lo que le confiere amplias posibilidades terapéuticas. En casos en que su actividad promotora de la eritropoyesis no es requerida, ésta resulta contraproducente, por lo que se han obtenido proteínas modificadas con variada actividad biológica. La carbamilación de residuos lisina de la molécula de Epo modifica su actividad, anulando su acción como factor de crecimiento de células eritroides pero manteniendo la actividad protectora sobre tejidos no hematopoyéticos (Leist et al, 2004).

Si bien se han reportado acciones de Epo sobre diferentes tejidos, ensayos clínicos en pacientes con daño cardíaco no permitieron confirmar los beneficios de la Epo observados en ensayos con animales. Por otra parte, se ha reportado resistencia al tratamiento, especialmente en pacientes con enfermedad cardíaca e hipertensión. Una posible causa de esta falta de función podría deberse a la participación de otros factores presentes, ya que la terapia es aplicada en patologías muy complejas. Suficiente evidencia muestra que la hiperhomocisteinemia constituye un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. El reporte de la relación entre niveles elevados de homocisteína (Hcy) y modificaciones en la activación de receptores y en caminos de señalización celulares

que podían estar relacionados con Epo nos indujo a estudiar una posible interacción entre Hcy y Epo.

La caracterización de Epo carbamilada (cEpo) como factor neuroprotector aunque incapaz de estimulación eritropoyética resulta necesaria para continuar su estudio sobre otros tejidos.

En este proyecto se investigan cambios estructurales de las eritropoyetinas modificadas, se compara la acción antiapoptótica entre Epo y cEpo y se evalúa una posible acción trombogénica de Epo *N*-homocisteinilada.

#### **Objetivo general:**

Profundizar el conocimiento acerca de alteraciones estructurales y funcionales que se producen debido a modificaciones proteicas por carbamilación y homocisteinilación. Los resultados que surjan del presente proyecto pueden constituir un aporte importante para la adecuación de estrategias terapéuticas donde la mencionada interacción eritropoyetina-homocisteína es frecuente en patologías cardiovasculares.

#### **Objetivos específicos:**

- Identificar las modificaciones estructurales de Epo inducidas por carbamilación y por *N*-homocisteinilación.
- Comparar la actividad antiapoptótica de Epo y cEpo en células endoteliales inducidas a apoptosis por tratamiento con TNF- $\alpha$ .
- Evaluar el efecto de Epo y HTLEpo sobre la funcionalidad de células endoteliales a través de la detección de moléculas de adhesión V-CAM e I-CAM.

#### **Resultados y análisis**

Durante el período de beca se realizaron las actividades incluidas en el plan del proyecto.

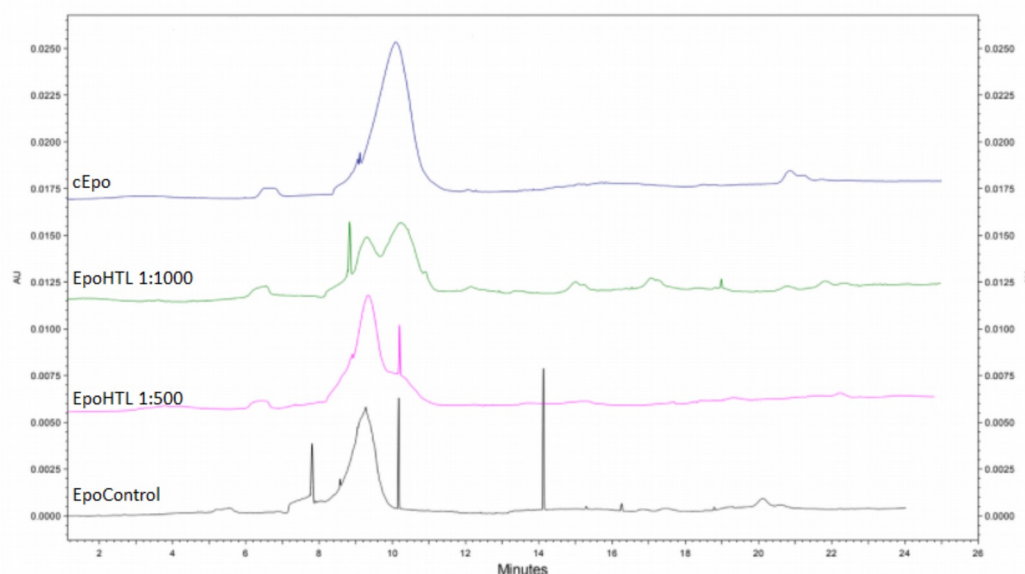
#### **Actividad 1: Reacción de carbamilación y *N*-homocisteinilación de eritropoyetina**

En primer lugar se realizaron las reacciones químicas, descriptas en la Actividad 1, para modificar la eritropoyetina. **Reacción de carbamilación:** Se carbamilaron los grupo lisina de la Epo por incubación con cianato de potasio en *buffer* pH 8,8. El KCNO residual se eliminó mediante lavados con H<sub>2</sub>O deionizada en tubos Centricón con *cut-off* 3 kDa por centrifugación. **Reacción de *N*-homocisteinilación:** uno de los mecanismos de los efectos perjudiciales de la Hcy se debe a la modificación química de las proteínas del suero por homocisteína tiolactona (HTL), un éster cíclico altamente reactivo derivado de Hcy. Se incubó Epo con HTL en relación molar 1:500 y 1:1000 (PBS, pH 7,4) por 24 h a 37 °C. Luego se eliminó la HTL remanente por filtración en tubos Centricón por centrifugación.

El análisis de las modificaciones estructurales se realizó comparando las proteínas modificadas con la Epo control que se procesó en paralelo, durante el mismo período de incubación, pero sin reacción de carbamilación ni *N*-homocisteinilación.

## Actividad 2: Análisis estructural de las modificaciones sobre la proteína eritropoyetina

El análisis estructural de las modificaciones sobre la proteína eritropoyetina, proyectado en la Actividad 2, se realizó en primer lugar por un desarrollo de Electroforesis Capilar de Zona (ECZ: *buffer*:Tricina) a 6.7 KV (intensidad de corriente 50  $\mu$ A) en un P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter), equipado con un detector de fototiodo. La inyección hidrodinámica de la muestra fue durante 2,5 s a una presión de 0,4 psi en un capilar de sílica fundida de 40 cm de largo (largo efectivo 30 cm) y 50  $\mu$ m de diámetro interno.

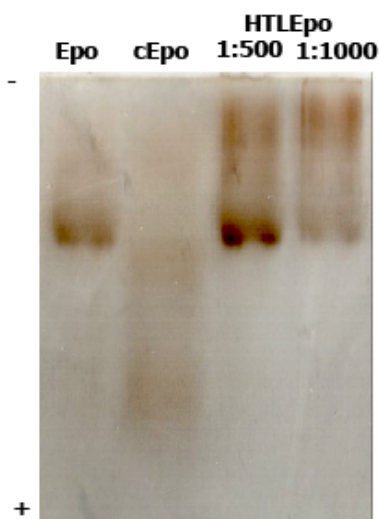


**Figura 1: Electroforesis Capilar de Zona de la eritropoyetina control y las proteínas modificadas.** Electroferogramas comparativos mostrando tiempo de migración (min) a 25 °C.

El tiempo de migración de Epo fue  $t_{mEpo} = 9,30$  min. En el electroferograma (Fig.1) se observa un retardo en el tiempo de migración para la cEpo coincidente con el aumento esperado de la densidad de carga neta negativa ( $t_{mcEpo}$ : 10,09 min). La HTL<sub>1000</sub>Epo presentó dos picos de absorbancia. El primero coincide con el tiempo de migración de la Epo control,  $t_{mHTL_{1000}Epo} = 9,32$  min y el segundo presenta un tiempo de migración mayor,  $t_{mHTL_{1000}Epo} = 10,25$  min. Esto sugiere que sólo una fracción de la Epo tratada con HTL fue modificada por la reacción de *N*-homocistenilación. El retraso observado en el segundo pico coincide con el resultado esperado, ya que la *N*-homocisteinilación de los residuos lisina disminuye densidad de carga positiva. Esto mismo se observa en menor medida para la HTL<sub>500</sub>Epo: el primer pico coincide con el pico de la Epo control, pero se observa un ensanchamiento en tiempos de migración mayores, evidenciando un cambio de la relación carga/masa.

Por otro lado, se realizó el desarrollo electroforético en condiciones nativas en gel de poliacrilamida (PAGE T=10%, sistema multifásico de *buffers*, *buffer* Tris 25mM, glicina 192 mM, pH 8,3), seguido de la tinción de plata ya que se requería una alta sensibilidad en la detección. La Figura 2 muestra que la cEpo tiene un comportamiento electroforético acorde con la disminución de su carga neta positiva debido al bloqueo de los residuos lisina en su

molécula, esto se refleja en una mayor velocidad de migración que la de la Epo control, como predijo el análisis por ECZ. Sin embargo, las proteínas tratadas con HTL mostraron bandas con una disminución de la relación carga/masa, lo que causa tasas de migración menores que para la Epo nativa. Estos resultados sugieren que el tratamiento de Epo con HTL lleva a la generación de estructuras más grandes. En la ECZ, la carga total de la proteína tiene una alta influencia en la movilidad de la molécula, contrariamente a lo que pasa en electroforesis en gel, donde este parámetro es afectado por la relación carga/masa y por la propiedad de tamiz molecular del gel.



**Figura 2: Gel de poliacrilamida en condiciones nativas.** Se sembraron 5 µg de las proteínas en cada calle. El revelado se realizó por tinción de Plata.

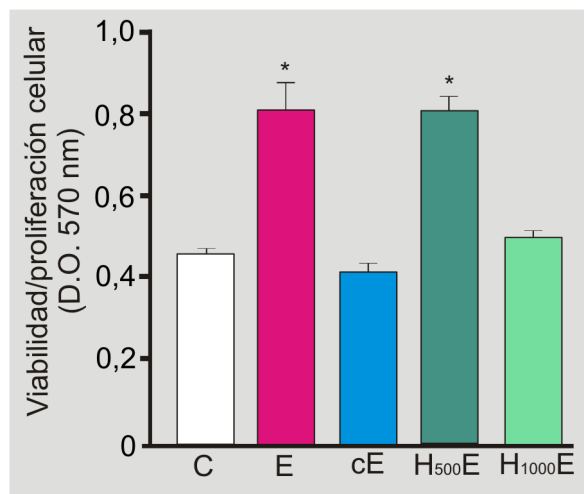
Con el fin de explicar la discrepancia de resultados entre ambas técnicas, se analizaron posibles modificaciones estructurales en las Epo tratadas. Ensayos preliminares de dicroísmo celular (DC), para evaluar cambios en la estructura secundaria de las proteínas modificadas, mostraron que la Epo nativa exhibe una conformación  $\alpha$ -hélice, de acuerdo a reportes previos. El espectro de la cEpo no mostró cambios significativos en su estructura secundaria, en comparación con la Epo nativa. Sin embargo, la HTLEpo mostró una pérdida de estructura  $\alpha$ -hélice. El espectro de CD muestra una disminución significativa de la elipticidad y un cambio en la relación de la señal 208:222 nm con la contribución de un mínimo a 216 nm, típico de la conformación hoja  $\beta$ .

### **Actividad 3: Análisis funcional de las modificaciones sobre la proteína eritropoyetina**

Luego, se estudiaron diferentes funciones de Epo y si las alteraciones estructurales observadas en las proteínas podían modificar estas funciones.

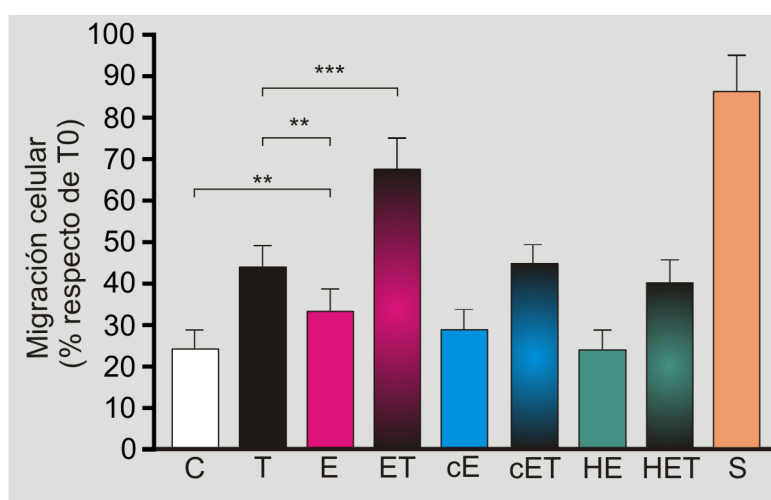
En primer lugar se estudio la acción proliferativa sobre células de origen eritroide UT-7 que necesitan Epo para sobrevivir, mediante el ensayo de proliferación por MTT (Fig. 3). Se

observó que las células UT-7 crecieron en respuesta al estímulo con Epo y Epo-HTL (relación 1:500). Sin embargo, la cEpo perdió su capacidad eritropoyética, al igual que la Epo-HTL (relación 1:1000).



**Figura 3: Crecimiento de células UT-7.** La proliferación se evaluó mediante la actividad metabólica de las células determinada por el ensayo de MTT. Las células UT-7 fueron cultivadas en presencia de las distintas proteínas por 48 h. Diferencias estadísticamente significativas Epo y HTL<sub>500</sub>Epo vs. C, cEpo y HTL<sub>1000</sub>Epo \* $P < 0,05$ ;  $n = 3$ .

A continuación, teniendo en cuenta los resultados de las modificaciones estructurales y de la acción proliferativa se decidió continuar el estudio con la HTL<sub>1000</sub>Epo que es la proteína que sufrió modificación por *N*-homocisteinilación.



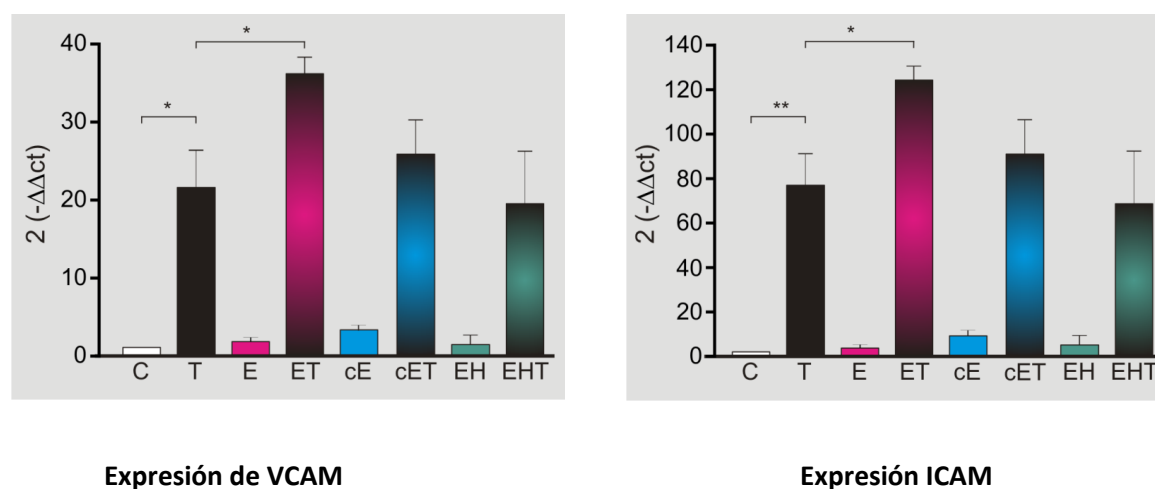
**Figura 4: Migración celular en ambiente.** Diferencias estadísticamente significativas \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 8$ .

La migración de células endoteliales fue analizada en un ambiente proinflamatorio en presencia de Epos modificadas (Fig. 4). Luego de realizar una herida en el cultivo de células EA.hy926, se incubaron con TNF- $\alpha$  y Epo (control o modificada según tratamiento) durante 18 h.

Los resultados mostraron un efecto estimulante del TNF- $\alpha$  para la migración celular, el cual se encuentra significativamente incrementado por la presencia de Epo. Sin embargo, el incremento no se observa para el caso de las Epos modificadas, lo que sugiere una pérdida de la función promigratoria.

Continuando con el análisis funcional se realizó la cuantificación de la activación de células endoteliales en un medio proinflamatorio en presencia de las Epos modificadas. Células EA.hy926 fueron incubadas con TNF- $\alpha$  y Epo (control o modificada según tratamiento) durante 24 h. Se determinó la expresión de ARNm de moléculas de adhesión, VCAM e ICAM por *Real Time PCR* (Fig. 5).

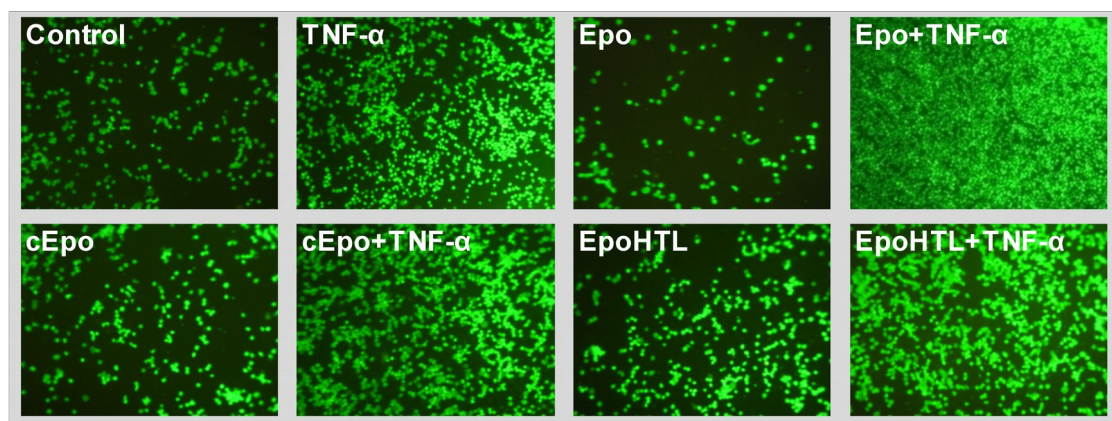
Como era esperable, el medio proinflamatorio indujo un aumento de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1. Llamativamente, la presencia de Epo en presencia de TNF- $\alpha$  aumentó la expresión de ambas moléculas, mientras que la cEpo y la HTLEpo no alteraron significativamente esta expresión.



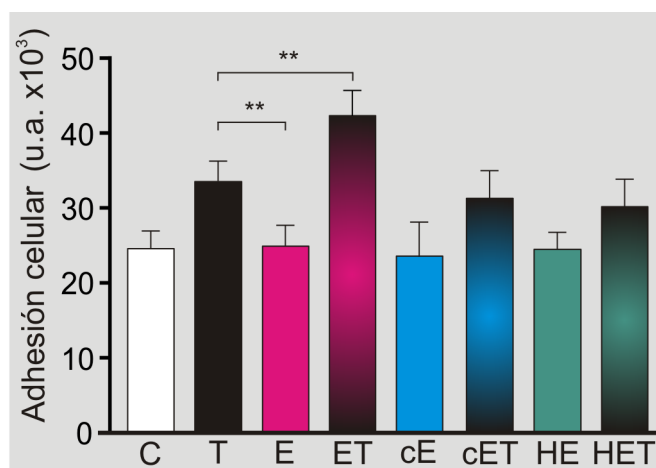
**Figura 5: Expresión de las moléculas de adhesión VCAM e ICAM.** Evaluación de la expresión de ARN mensajero de VCAM e ICAM en células endoteliales tratadas con las diferentes proteínas en presencia de un ambiente proinflamatorio. Técnica de *Real Time RT-PCR*. Valores de  $\Delta\Delta ct$ . Diferencias estadísticamente significativas \* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ;  $n = 3$ .

En base a los resultados anteriores fue interesante estudiar la función de estas moléculas de adhesión en presencia de las proteínas nativa y modificadas, en un ambiente proinflamatorio. Para ello se cultivaron células EA.hy926 en presencia de los distintos tratamientos y por último se agregaron células THP1 marcadas con CFSE. Luego, se ensayó la adhesión de células monocíticas por microscopía de fluorescencia (Fig. 6) y por cuantificación fluorométrica (Fig. 7).

Como puede observarse en las Figuras 6 y 7, la Epo nativa exacerba en forma significativa la adhesión monocítica generada por la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , mientras que las proteínas modificadas pierden esta función.



**Figura 6: Ensayo de adhesión celular en ambiente proinflamatorio por microscopía de fluorescencia.** Células EA.hy926 cultivadas en presencia de los distintos tratamientos y en contacto con células THP1 marcadas con CFSE. Observación en microscopio de fluorescencia (60 $\times$ )



**Figura 7: Ensayo de adhesión celular en ambiente proinflamatorio por fluorimetría.** Células EA.hy926 cultivadas en presencia de los distintos tratamientos y en contacto con células THP1 marcadas con CFSE. Lavado, lisado de las células y detección de la marca de CFSE en espectrofluorómetro ( $\lambda_{ex}$  485 nm -  $\lambda_{em}$  520 nm). Diferencias estadísticamente significativas \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 7$ .

## Discusión

Los resultados de electroforesis en gel y capilar de zona mostraron que tanto la reacción de *N*-homocitenilación de la Epo como la de carbamilación inducen alteraciones estructurales en la proteína. Según estudios preliminares de dicroísmo celular la estructura secundaria  $\alpha$ -

hélice en la HTLEpo se modifica, resultando una estructura hoja  $\beta$ . Por otro lado, no se encontraron cambios en la estructura secundaria de la cEpo.

En cuanto al análisis de las funciones de Epo, se encontró una alteración funcional de las Epos modificadas. Si bien ya se conocía la ausencia de la acción eritropoyética de la cEpo, se encontró una inhibición similar de esta actividad para la Epo incubada con HTL, perdiendo su función como factor de crecimiento para las células UT-7 (Epo dependientes).

Estudios previos del laboratorio reportaron que la cEpo posee una acción de protección neuronal, por lo que fue interesante estudiar si la Epo carbamilada mantenía su acción sobre otros tejidos como en endotelial. Los resultados muestran que la proteína carbamilada no tiene acción sobre células endoteliales, perdiendo la función promigratoria y de inducción de moléculas de adhesión.

Con la *N*-homocisteinilación de la Epo ocurre un efecto similar que con la carbamilación en cuanto a su función sobre células endoteliales. La Epo *N*-homocisteinilada, pierde todas las habilidades que posee la Epo sobre las células endoteliales.

Si bien las alteraciones estructurales que ocurrieron sobre la molécula de Epo debido a cada reacción son diferentes (resultados de PAGE y dicróismo circular), las mismas podrían afectar a la interacción ligando-receptor y como consecuencia llevar a la pérdida de su capacidad de activación celular.

**Conclusión:** Los resultados muestran nueva evidencia para el rol de la Epo. La capacidad proangiogénica de Epo, potenciada en presencia de factores proinflamatorios, podría favorecer su acción como un protector vascular en la isquemia y un mediador de la migración de linfocitos dependiente de las moléculas de adhesión ante un proceso inflamatorio. Estas funciones se verían afectadas por las modificaciones estructurales estudiadas.

#### ➤ PRESENTACIONES A CONGRESOS (RESUMENES EN REVISTAS DE PUBLICACIÓN PERIÓDICA)

- ACTION OF MODIFIED ERYTHROPOIETINS ON ENDOTHELIAL CELLS IN A PROINFLAMMATORY ENVIRONMENT

*Chamorro ME, **Schiavinato D**, Maltaner R, Schiappacasse A, Nesse A, Vittori D.*

Trabajo en forma de Póster aceptado para su presentación en la Reunión Conjunta de Sociedades Biomédicas - LXII Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Buenos Aires, 13-17 de noviembre, 2017. Resumen a ser publicado en la Revista Medicina, 2017.

- -EFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA-TIOLACTONA SOBRE PROTEÍNAS DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO.

***Schiavinato D**, Genoud V, Gionco S, Lauricella AM.*

XII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis / III Curso Educacional de la ISTH. 28 de Septiembre al 1º de Octubre 2016. **Póster Mención Especial.**



➤ **OTROS ELEMENTOS DE JUICIO QUE CONSIDERE PERTINENTES**

**Cargos docentes durante el período:**

**Ayudante de Segunda con carácter interino (Res. CD Nº 1878).**

Período: Agosto 2016 - Julio 2017

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Dedicación: Parcial. Materia: Química Biológica (Primer y Segundo cuatrimestre).

**Materias de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas cursadas durante el período de la Beca:**

- Análisis Funcional Orgánico. Materia Cuatrimestral. Calificación: 8 (ocho). Fecha: 27/04/17
- Toxicología y Química Legal. Materia Cuatrimestral. Trabajos Prácticos aprobados. Calificación: final no rendido.

**Pasantía de idioma en el exterior:**

Beca otorgada por el Servicio alemán de intercambio académico (DAAD)

Lugar: Institut für Internationale Kommunikation e.V., Berlin, Alemania

Duración: 3 enero 2017 – 15 febrero 2017

**Daniela Schiavinato**

**Laboratorio Celular de la Eritropoyetina.**

**Departamento de Química Biológica**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**[danielaschiavinato@gmail.com](mailto:danielaschiavinato@gmail.com)**