

# EFEECTO de la HOMOCISTEÍNA–TIOLACTONA sobre proteínas del SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Schiavinato D, Genoud V, Gionco S, Lauricella AM.  
Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

La homocisteína (Hcy) plasmática elevada ( $>12\text{ }\mu\text{M}$ ) es un factor de riesgo independiente para enfermedades vasculares oclusivas. Este aminoácido no esencial, intermediario en el metabolismo de la metionina, posee un grupo tiol en su molécula. El 80% de la Hcy está unida a proteínas y el 1% en la forma cíclica homocisteína tiolactona (HTL), especie química altamente reactiva que forma amidas con grupos  $\epsilon$ -amino de aminoácidos básicos de proteínas en reacciones de N-homocisteinilación.

En trabajos anteriores hemos demostrado menor actividad fibrinolítica con plasminógeno homocistenilado (Plg-HTL). Además, su activación resultó más lenta y la plasmina resultante mostró menor actividad amidolítica respecto al control.

**Objetivos:** Evaluar los cambios estructurales sobre el Plg y el tPA mediados por HTL. Estudiar la capacidad de unión del Plg-HTL a la fibrina.

**Métodos:** Se incubó ( $37^{\circ}$ , 3 horas) Plg (1,5 mg/mL) y tPA (2,5 mg/mL) humanos con HTL (relación molar Plg:HTL 1:1.000; tPA:HTL 1:2.300); control: buffer Tris-NaCl.

**Estudio de la estructura de las proteínas N-homocisteiniladas:** electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), desnaturalizante (SDS-

PAGE), inmunoelectroforesis cruzada (IEC) y electroforesis capilar (EC).

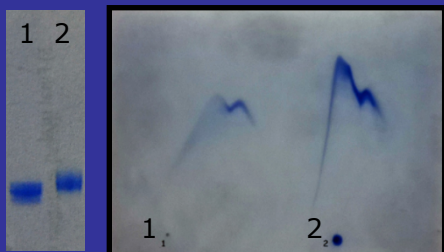
**Unión del Plg a la fibrina:** fue evaluada mediante un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio.

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

## Resultados:

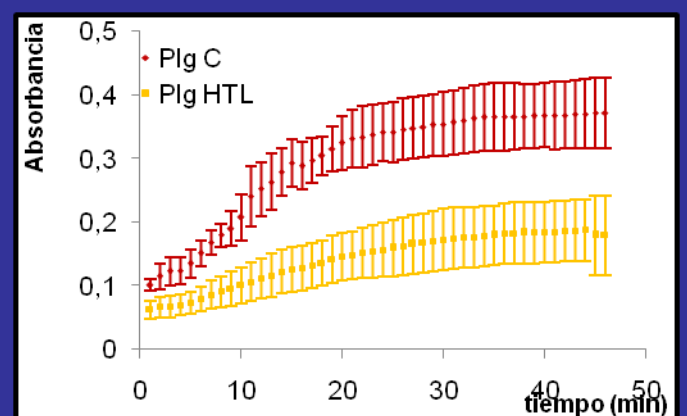
No se detectaron cambios en PAGE entre el Plg-HTL y el control, indicando que la relación carga:masa del Plg no varió significativamente.

SDS-PAGE ICE (Plg)



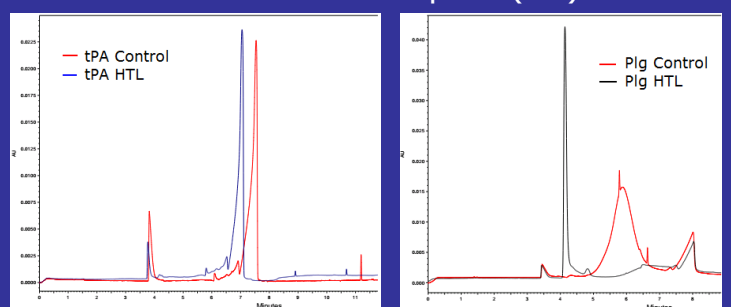
En SDS-PAGE y en IEC el Plg-HTL mostró menor desplazamiento (D) que el control.

$\Delta D$  Plg-HTL respecto al control (calle 2 vs 1): SDS-PAGE= $-3,1\pm0,5\text{mm}$ ; IEC= $17\pm2\text{mm}$



La HTL provocó una disminución del 47% de la unión de Plg a fibrina.

Electroforesis Capilar (EC)



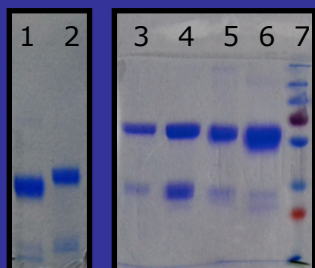
Ambas proteínas N-HTL migraron a mayor velocidad que el control

Tiempo de migración:

Plg-HTL  $4,15\pm0,02\text{ min}$  vs  $5,67\pm0,04\text{ min}$ ;  $p<0,05$

tPA-HTL  $6,94\pm0,02\text{ min}$  vs  $7,46\pm0,04\text{ min}$ ;  $p<0,05$ .

SDS-PAGE (tPA)



El tPA-HTL también presentó menor D ( $\Delta D$  (Calles 2 y 4 vs 1 y 3):  $5,0\pm0,1\text{ mm}$ ).

Desplazamiento de igual magnitud se obtuvo con tPA tratado con 2-mercaptoetanol (2ME:agente reductor).

**Conclusión:** La HTL provocó alteraciones moleculares sobre Plg y tPA. Un efecto reductor del ciclo-éster estaría involucrado en esa acción. La HTL provocó una disminución de la unión de Plg a la red de fibrina respecto al control, explicando al menos parcialmente, la actividad fibrinolítica disminuida observada en trabajos previos. Estos resultados apoyan la asociación entre hiperhomocisteinemia y trombosis.