



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

## **N – Homocisteinilación del Plasminógeno y del Activador Tisular del Plasminógeno (t-PA)**

Laboratorio de Química Biológica

Alumno: Daniela Schiavinato

Tutor: Ana María Lauricella

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis

## **Índice**

3	Introducción
4	El sistema de coagulación
8	Objetivos
8	Objetivo general
8	Objetivo específico
9	Materiales y Métodos
9	Muestras de proteínas purificadas
9	Reactivos Químicos
9	N-Homocisteinilación
9	Electroforesis en geles de poliacrilamida
10	Inmunoelectroforesis cruzada
12	Capacidad de unión a Fibrina
13	Resultados y discusión
13	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)
13	PAGE en condiciones nativas
15	PAGE en condiciones desnaturalizantes
17	Inmunoelectroforesis cruzada (IEC)
19	Electroforesis capilar de zona (ECZ)
20	Capacidad de unión a fibrina
24	Conclusiones
25	Referencias bibliográficas
26	Difusión de los resultados

## Introducción

La relación entre niveles plasmáticos elevados de homocisteína (Hcy) y la enfermedad vascular aterosclerótica se inicia en 1969 a partir de observaciones realizadas por Kilmer Mc Cully sobre pacientes con homocistenuria. Se han realizado numerosos estudios que llevaron a concluir que los niveles elevados de Hcy constituyen un factor de riesgo importante independiente para la enfermedad vascular aterosclerótica, a nivel coronario, cerebral y periférico. La magnitud del riesgo resultó similar a la de otros factores de riesgo tales como la hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión y diabetes, que a su vez ejercen un efecto multiplicativo cuando se combinan con la hiperhomocisteinemia (HHcy) (Malinow *et al.* 1989, D'Angelo *et al.* 1997).

Evidencias experimentales sugieren que la HHcy afecta la calidad del endotelio normal, con la consecuente activación plaquetaria y del sistema de coagulación y, paralelamente, la inhibición del sistema fibrinolítico. Estos efectos alteran el balance procoagulación-anticoagulación, aumentando así el riesgo trombótico. Se han realizado, y continúan, un número muy importante de estudios epidemiológicos prospectivos y de intervención terapéutica, como así también experiencias *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales (Van Guldener *et al.* 2000, Perla-Kaján *et al.* 2007, Boushey *et al.* 1995, Selhub *et al.* 1995). Sin embargo, aún no se conocen exactamente los mecanismos involucrados en la relación entre la HHcy y la enfermedad vascular oclusiva.

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido de cuatro átomos de carbono que presenta un grupo sulfhidrilo o tiol, intermediario de la conversión metabólica de la metionina. Cuando el metabolismo de la Hcy se encuentra alterado la concentración intracelular de la misma es potencialmente tóxica y el aminoácido es exportado fuera de la célula y pasa a circulación. Aún no hay consenso internacional para establecer valores de referencia para la concentración de Hcy plasmática, aunque la mayoría de los estudios proponen que los niveles de Hcy superiores a 12  $\mu\text{M}$  se asocian con un aumento significativo del riesgo de trombosis venosa (Castañón *et al.* 2007).

En plasma, el 80% de la Hcy se encuentra unida a proteínas, principalmente albúmina, el 18% forma dímeros de bajo peso molecular y el resto está presente como Hcy libre o reducida y como el éster cíclico homocisteína-tiolactona (HTL) (Refsum *et al.* 2004). Esta última especie química se origina a partir de un "error-editing" de la enzima metionil-tRNA sintetasa, que toma Hcy en lugar de metionina para incorporarla a la proteína nascente y la libera como HTL (Jakubowski *et al.* 1993). Si bien los niveles plasmáticos de Hcy y HTL son muy bajos, los efectos nocivos de estos compuestos se deberían a la alta reactividad de estas moléculas en los sistemas biológicos.

Las reacciones químicas espontáneas, no enzimáticas, entre moléculas biológicas y Hcy o HTL, pueden alterar la estructura y función de proteínas, receptores, factores de crecimiento, etc, explicando, al menos parcialmente, los efectos tóxicos asociados a la hiperhomocisteinemia. Se ha descrito que la Hcy reducida puede unirse a los -SH libres de residuos cisteínas por interacción tiol-tiol y/o provocar el clivaje de puentes disulfuro, produciendo reacciones de intercambio con compuestos azufrados (Blom 2000). Respecto a la HTL se conoce que el grupo carbonilo del cicloéster reacciona con el grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de los aminoácidos básicos de las proteínas (reacción de “N-homocisteinilación”) (Figura 1), introduciendo un nuevo grupo tiol en la molécula, que por oxidación espontánea del mismo, se pueden generar uniones disulfuro intermoleculares y consecuentemente, la formación de multímeros (Jakubowski 2008). Se ha reportado que estas reacciones de homocisteinilación estarían involucradas en la generación de un estado protrombogénico (Jakubowski 2007).

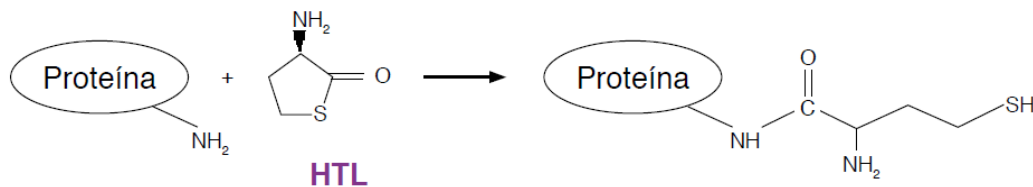


Figura 1: reacción de N-homocisteinilación

## El sistema de coagulación

Cuando se produce una injuria en los tejidos, la pérdida de sangre se detiene con la formación de un tapón hemostático. Para ello, el fibrinógeno (Fbg) se polimeriza por activación de la cascada de coagulación, formando una matriz denominada fibrina. Células inflamatorias y endoteliales migran dentro de la matriz y estimulan el proceso de reparación. Mientras se produce la reconstrucción de la pared vascular afectada, el coágulo se disuelve con la acción del sistema fibrinolítico. La coagulación (formación de la red de fibrina) y la fibrinólisis (degradación de la misma red), deben ser comprendidas como un sistema dinámico que requiere una adecuada perfusión del sistema vascular, una perfecta eliminación de los productos activos de la coagulación y fibrinólisis, a la vez que el funcionamiento adecuado de sus inhibidores fisiológicos. La alteración de alguno de estos mecanismos podría conducir a una hipo ó hipercoagulabilidad.

Es conocido que la formación y lisis del coágulo de fibrina juegan un rol importante en la fisiopatología de episodios trombóticos. La relación entre la estructura y función de la fibrina es compleja y es modulada por factores genéticos y adquiridos. Se ha descrito que la HHcy está asociada a la formación de redes de fibrina alteradas y la forma Hcy libre sería responsable de

este efecto (Undas 2006). En trabajos previos realizados por el equipo del laboratorio se ha demostrado que los coágulos obtenidos en presencia de Hcy fueron más rígidos y menos deformables respecto a los controles (Rojas 2009). Además, las redes de fibrina mostraron una estructura más compacta, con fibras más gruesas y más ramificadas, resultando menos permeables y más resistentes a la lisis que las redes control (Lauricella *et al.* 2002, Lauricella *et al.* 2006, Quintana *et al.* 2009). Recientemente, se ha propuesto que la HTL sería otro de los compuestos altamente reactivos asociados a la toxicidad de la HHcy. La N-homocisteinilación de la HTL modifica algunos residuos lisina, principalmente en el extremo carboxi-terminal de la cadena de aminoácidos, involucrado en la asociación lateral de las fibras en la red de fibrina, lo que se traduce en una polimerización defectuosa de la fibrina conduciendo a la formación de redes más difíciles de lisar que los controles. Esta característica, claramente asociada a un estado protrombótico, se debería en parte a las modificaciones inducidas por la HTL sobre la molécula de fibrinógeno (Malinowska *et al.* 2011, Jakubowski 2008).

En particular, este trabajo se centrará en el estudio de factores involucrados en la fibrinólisis. Este es un proceso localizado y limitado que resulta en la disolución del coágulo y reparación del tejido dañado. Implica la degradación de fibrina catalizada por proteasas. Estas enzimas circulan como zimógenos, (sin actividad) y es imprescindible su activación para ejercer su función. La interacción dinámica entre los mecanismos de coagulación y fibrinólisis permite un eficaz control de los sangrados y evita el depósito no deseado de fibrina. La activación o inhibición patológica de la fibrinólisis desemboca en trastornos hemorrágicos o trombóticos (Kordich *et al.* 1997).

La plasmina es considerada la principal enzima fibrinolítica. Es una serinoproteasa que hidroliza fibrina y otras proteínas como Fbg, factor V, VIII, componentes del sistema de complemento, etc. Activa metaloproteinasas e interviene en proteólisis pericelular, procesos relacionados con ovulación, reparación tisular, angiogénesis y en trastornos proliferativos. Su precursor es el **plasminógeno (Plg)**, zimógeno que es activado por la acción de activadores del plasminógeno (PA). Es una glicoproteína (90 kDa) de síntesis hepática. Desde el extremo N-terminal, la molécula de Plg está formada por una región lineal de 80 aminoácidos, 5 dominios kringles (3 de ellos con sitios de unión a lisina LBS), el enlace Arg<sub>561</sub>-Valina<sub>562</sub> (que es clivado por los activadores del Plg) y el dominio serinoproteasa (sitio activo formado por la tríada catalítica Hist-Asp-Ser) en el extremo C terminal (Figura 2). La molécula de Plg se une a fibrina específicamente a través de los sitios LBS. A través de los mismos sitios se une además a su principal inhibidor  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP), receptores celulares de células endoteliales, leucocitos y plaquetas y a proteínas (como la glicoproteína rica en histidina HRG). El 50% del Plg plasmático circula unido a la HRG formando un complejo equimolecular reversible (Pointing *et al.* 1992). La HRG

compite por la fibrina, con los sitios LBS del Plg, lo que origina in vitro una menor activación del Plg a plasmina.

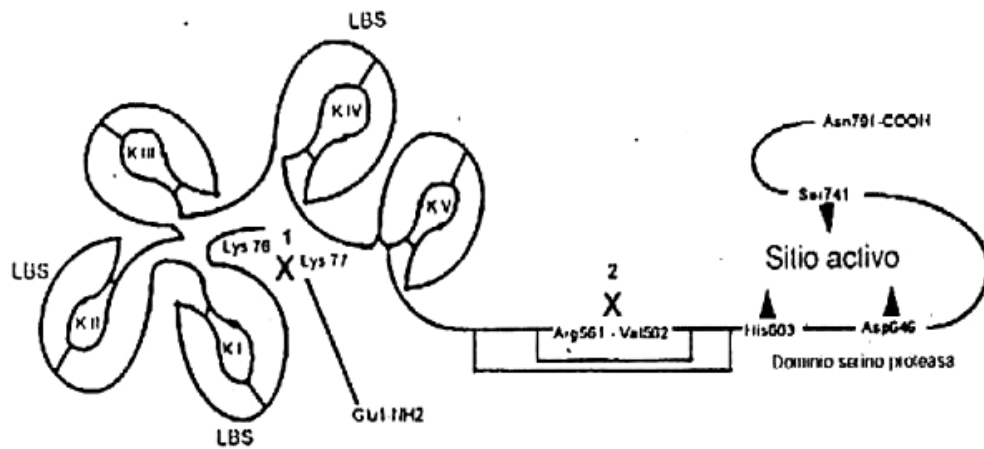


Figura 2: estructura molecular del plasminógeno

La activación del Plg puede ocurrir por tres vías: la intrínseca, la extrínseca y la exógena. En la intrínseca participan los factores de la fase de contacto XIa, XIIa, calicreína y quinínógenos de alto peso molecular (HMWK). Esta vía constituye sólo el 15 % del total de la actividad fibrinolítica (Schousboe *et al* 1999).

En la vía extrínseca participa el **activador tisular del plasminógeno (t-PA)**, el activador del plasminógeno de una sola cadena tipo urokinasa (scu-PA) y el u-PA de doble cadena; todos activan al plasminógeno, los primeros necesitan para lograr la activación superficies de fibrina y el último actúa en solución. Los activadores del plasminógeno exógenos o agentes trombolíticos son: t-PA recombinante, UK y estreptoquinasa (SK). Esta última generada por los *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos, forma un complejo con el Plg en fase fluida que tiene actividad de plasmina (Lijnen *et al*. 1995).

El t-PA es considerado el principal activador fisiológico del sistema fibrinolítico plasmático. Es una serino proteasa que cliva el enlace Arg<sub>561</sub> – Val<sub>562</sub> del Plg para generar plasmina cuando hay formación de fibrina. Es sintetizado por células endoteliales y secretado al plasma en forma continua como proteína de una cadena, activa. Circula en plasma a muy baja concentración (70 pM raramente excede 0,5 U/ml de plasma) y tiene una vida media que oscila entre 5 y 7 minutos. También es sintetizado por monocitos, megacariocitos, mastocitos, neuronas, fibroblastos cardíacos y células del músculo liso de pared vascular.

La estructura del t-PA presenta un residuo amino terminal de 20 a 23 aminoácidos y un residuo en el extremo amino terminal que forma un dominio

finger por el cual el t-PA se une a fibrina (Figura 3). La Triada catalítica His-Asp-Ser, responsable de la activación del Plg. El t-PA se une a receptores específicos de la membrana plasmática de la célula endotelial, permitiendo una activación eficiente (Bachman 1987).

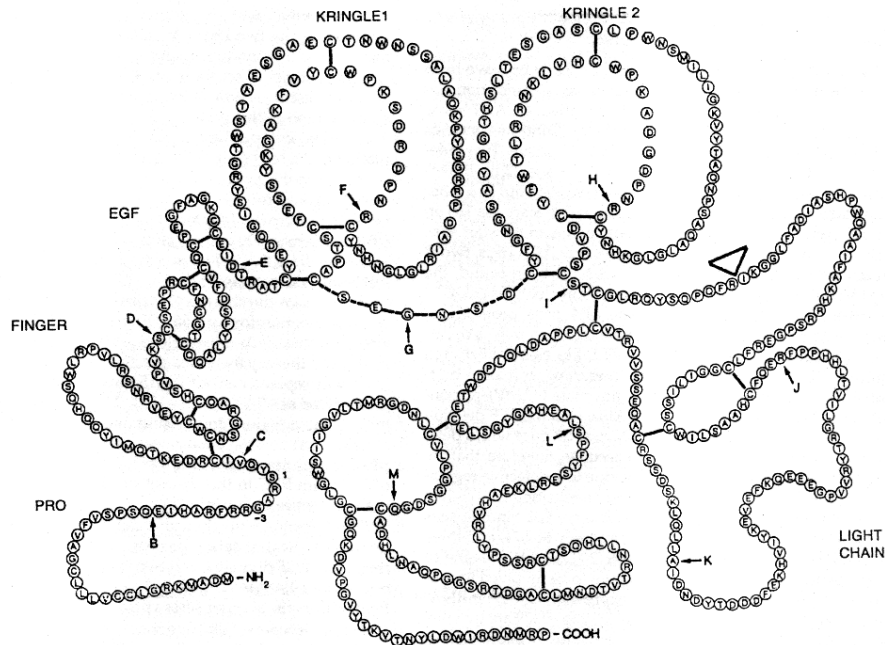


Figura 3: esquema de la estructura del t-PA

La mayor parte del t-PA está presente en un complejo inactivo, que forma con su inhibidor primario: PAI<sub>1</sub>. Su regulación se produce a tres niveles. Por un lado, la concentración de t-PA, que es mucho menor que la de Plg (15-85 pM vs. 1-2 µM). Por otro, existen tres inhibidores: PAI<sub>1</sub>, PAI<sub>2</sub> y PAI<sub>3</sub>. Estas proteínas pueden circular libres o complejadas con otras proteínas como vitronectina o HGR. Su constante de asociación ( $K_{asoc} = 10^7$ - $10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) indica que el t-PA libre, a la concentración plasmática, se compleja rápidamente con PAI. Por último, la afinidad del t-PA por el PAI o por el Plg cambia enormemente en presencia de fibrina (400 a 1000 veces), de modo que genera plasmina más rápido a menor concentración de t-PA. La fibrina actúa como catalizador heterogéneo en la reacción de activación del Plg por t-PA y actúa como sustrato de la plasmina formada (Weisel *et al.* 1999).

## **Objetivos**

Se ha reportado que el éster cíclico es un compuesto de mayor reactividad que la Hcy y se han realizado numerosos estudios que demuestran que la HTL reacciona, de manera irreversible, con proteínas originando los “aductos de HTL”. A partir de estas observaciones, se propone para el presente proyecto que la HTL participaría en los efectos trombogénicos asociados a los niveles elevados de homocisteína plasmática, ya que la N-homocisteinilación de las proteínas podría afectar no sólo a la estructura molecular sino también a la función normal.

Por lo tanto, para el desarrollo del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

- Aportar conocimientos sobre la relación entre hiperhomocisteinemia y trombosis, estudiando el rol del éster cíclico homocisteína tiolactona en la inducción de condiciones protrombóticas.

### **Objetivo específico**

- Estudiar las posibles alteraciones estructurales del plasminógeno y su activador tisular (t-PA) en presencia de homocisteína tiolactona mediante métodos electroforéticos.
- Estudiar las posibles alteraciones en la actividad fibrinolítica y la unión a fibrina del plasminógeno y t-PA, a través de ezimoinmunoensayos.



## **Materiales y Métodos**

### **Muestras de Proteínas purificadas**

Plasminógeno (Plg) humano (Chromogenix, EEUU), Activador tisular del Plasminógeno (t-PA) recombinante (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Alemania), Fibrinógeno (Fbg) humano (Sigma Aldrich, EEUU).

### **Reactivos químicos**

Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron soluciones de L-homocisteína tiolactona (HTL) (Sigma Aldrich, EEUU) en buffer Tris-salino (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico

### **I. N-Homocisteinilación**

En la reacción de N-homocisteinilación el grupo carbonilo de la HTL reacciona con los grupos  $-NH_2$  de los aminoácidos básicos, formando aductos que exponen un nuevo grupo sulfhidrilo en la proteína.

#### Materiales

- Buffer Tris-salino: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

#### Metodología

Las muestras de Plg y t-PA se incubaron con una solución de HTL en buffer Tris-salino. La relación de proteína HTL fue de 1:1000 para el Plg y 1:2300 para el t-PA. Como control Plg y t-PA fueron incubaron con buffer Tris-salino (PlgC, t-PAC). Todas las incubaciones fueron a 37°C durante 3 hs.

### **II. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La electroforesis es una técnica de separación, comparación y caracterización que se basa en la diferencia de velocidad de migración de especies cargadas, generalmente proteínas, al aplicar un campo eléctrico según su tamaño, forma y carga. Los detergentes como el SDS recubren a las proteínas otorgando la misma densidad de carga negativa, por lo que, en esas condiciones migran a través del gel en relación inversa a su masa.

#### Materiales

- Buffer de corrida: Tris 0,025M, glicina 0,192M, pH 8,3.
- Buffer de corrida con SDS: Tris 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0,1% p/v, pH 8,3.
- Solución Azul brillante de Coomasie: 0,2% en solución decolorante.
- Solución fijadora: metanol:acético:agua (3:1:6).
- Solución oxidante:  $K_2Cr_2O_7:HNO_3$ .
- Reactivo de plata:  $AgNO_3$  12mM.

- Solución reveladora:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,28M con 0,54 ml de formaldehído 40%
- Ácido acético 5% v/v.

### Metodología

Se utilizó un equipo Mini-PROTEAN Tetracell (Bio Rad) para preparar mini-geles de poliacrilamida. Se prepararon geles nativos con tamaño de poro del 4% en el gel concentrador y 8% en el gel separador. Se realizaron las diluciones correspondientes en cada placa para determinar la concentración óptima del método y se colorearon con azul de bromofenol antes de sembrar. El desarrollo electroforético se llevó a cabo empleando el buffer de corrida a voltaje constante de 200 mV durante 40 minutos.

Por otro lado, se prepararon geles para corridas con SDS. Se realizaron los geles correspondientes con tamaño de poro del 4% en el gel concentrador y 8% en el gel separador. Las muestras se trataron con SDS en buffer coloreado en proporción 3:1 durante 5 minutos a 100°C en baño de agua. Se corrió a voltaje constante de 200mV durante 40 minutos con el buffer de corrida con SDS.

Además se utilizaron mini-geles comerciales (Precast gel Mini PROTEAN TGX, gradiente de poro 4-15%) para corridas nativas y con SDS. Se procedió igual que con los geles preparados.

Las placas se revelaron con solución Azul brillante de Coomassie durante 30 minutos y se lavaron con solución decolorante. En las muestras que no se detectó proteína luego de la coloración con Coomassie se realizó un segundo revelado con reactivo de plata. Para ello, se sumergió el gel durante 30 minutos en solución fijadora y luego 5 minutos en solución oxidante. Se lavó durante 15 minutos con cambios repetidos de agua desionizada y se agregó el reactivo de plata, dejando actuar 20 minutos con agitación constante. Se retiró el reactivo de plata y se trató con solución reveladora hasta la aparición de un precipitado marrón de la intensidad deseada. Se detuvo la reacción por agregado de ácido acético.

### **III. Inmunoelectroforesis cruzada**

La inmunoelectroforesis cruzada es una técnica de separación cualitativa o cuantitativa que se realiza en dos etapas. La primera etapa consta de una separación electroforética de una mezcla de antígenos sobre una placa de acetato de celulosa deshidratado. En la segunda etapa se incorpora el antisuero específico al medio de soporte y se realiza una electroforesis a 90° con respecto de la primera.

Durante la segunda etapa ocurre la inmunoprecipitación del complejo formado por el anticuerpo-antígeno. Se establecen equilibrios de precipitación-

redisolución de forma tal que el antígeno migra según la concentración en la que se encuentre.

#### Materiales

- Placa de celulosa Titan III, Helena Laboratories, EEUU.
- Buffer Tris-glicina: 0,025 M Tris 0,192 M glicina pH 8,3.

#### Metodología

La placa de celulosa se hidrató en buffer tris-glicina. En un primer lugar se desarrolló la electroforesis únicamente en la primera dimensión para obtener la concentración óptima para el método. Se sembraron 2  $\mu$ l de cuatro concentraciones seriadas, se esparció la solución de anticuerpo correspondiente (70  $\mu$ l de disolución 1:2) y se corrieron a voltaje constante de 400 V durante 90 minutos con buffer Tris-glicina.

Luego se realizó la inmunoelectroforesis cruzada, sembrando la muestra (2  $\mu$ l de proteína: plasminógeno 1,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) a 1,5 cm del borde lateral y 1 cm del borde inferior de la placa. Se desarrolló 15 minutos en la primera dimensión y 90 en la segunda, a voltaje constante de 400 V.

### **IV. Electroforesis capilar de zona**

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en la movilidad diferencial de partículas generada por la aplicación de un campo eléctrico. Las partículas migran a través de un fluido contenido en un capilar de sílica fundida. El radio pequeño del capilar genera una alta resistencia, lo que permite la aplicación de campos eléctricos de grandes magnitudes (hasta 30000V) con pequeñas corrientes (1  $\mu$ A) por lo cual la generación de calor es mínima. Además la elevada relación superficie:diámetro permite una disipación del calor muy eficiente.

Los grupos silanoles de la pared interna del capilar otorgan cargas eléctricas estáticas negativas, dependiendo del pH, que atraen a las cargas positivas del buffer formando una capa móvil positiva. Al aplicar un campo eléctrico, la capa positiva migra hacia el cátodo negativo generando una fuerza electroendosmótica (FEO) que arrastra al analito.

El principio de separación se basa en la movilidad electroforética del analito, que es proporcional a su carga y masa, y sumado a la fuerza electroendosmótica. Las especies que porten cargas positivas adquieren una velocidad mayor que la del flujo electroendosmótico debido a la atracción electroforética hacia el cátodo. Los solutos neutros migran a través del capilar por el flujo endosmótico, y los negativos se ven retardados por la atracción hacia el ánodo, llegando así de forma diferencial a la zona de detección.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P-ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman-Coulter, EEUU) provisto de un detector UV con arreglos de diodos. Servicio de electroforesis capilar, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA. STAN-CONICET.

## **V. Capacidad de unión a Fibrina**

El nivel de proteína unida a fibrina se determinó por un ensayo de binding directo seguido de un enzimoimmunoensayo.

### Materiales

- Fibrinógeno humano (Sigma Aldrich, EEUU).
- Buffer A: Tris 0,5 M; NaCl 0,1 M; pH 7,6.
- Buffer B: Tris 0,05 M, NaCl 0,1M, pH 7,6.
- Trombina bovina, (Wiener Lab, Suiza).
- Anticuerpo anti-plasminógeno: Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-plasminógeno (Therm Scientific, EEUU).
- PBS-T: buffer fosfato salino 0,05% Tween 20, pH 7,4.
- Anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con biotina (Dako, Dinamarca).
- StreptAvidina-peroxidasa (Dako, Dinamarca).
- Sustrato de o-fenilenediamina: 2mg/ml de o-fenilenediamina en buffer cítrico y fosfatos 0,1M pH 5 y 2 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por ml de buffer.

### Metodología

En policubetas de poliestireno de alto binding, se incubaron 100 µL de fibrinógeno (Fbg) en buffer A a 37°C, durante 24 horas. Los pocillos se lavaron con el buffer B para eliminar el Fbg excedente. El Fbg fue polimerizado a fibrina con el agregado de trombina bovina (2 U/mL en buffer A) y aprotinina (4 KIU/mL en buffer A). Después de 2 horas de incubación a 37°C, los pocillos fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (1% en buffer B) durante 1 hora. Luego se agregó la proteína control y homocisteinilada (4,6 ug/well). Se incubó durante 2 horas. Luego de lavar el excedente de proteína, se determinó el nivel de proteína unida a las redes de fibrina.

Para la determinación de la unión del Plg se realizó un enzimoimmunoensayo. Se incubó 1 hora con anticuerpo anti-plasminógeno. Se hicieron tres lavados con PBS-T. El segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con biotina, se incubó durante 1 hora. Se lavó nuevamente con PBS-T y se incubó con el complejo StreptAvidina-peroxidasa durante 1 hora 30 minutos. Luego del lavado se agregó el sustrato de o-fenilenediamina de la peroxidasa y se midió la densidad óptica a 490 nm durante 45 minutos. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado y las incubaciones a 37°C.

## Resultados y discusión

La N-homocisteinilización fue realizada en relaciones molares para comparar el efecto producido por la HTL en la estructura de las proteínas. Se utilizaron relaciones de Plg:HTL 1:1000 y t-PA:HTL 1:2300. La relación proteína: HTL en circulación es mucho menor y el entorno en el que se encuentran es complejo (proteínas, factores de coagulación, entre otros) comparado con los utilizados en los ensayos. Además, la exposición *in vivo* es sostenida y prolongada hasta la degradación de la proteína. Por lo tanto, se seleccionaron relaciones molares proteína:HTL aún mucho mayores a las encontradas *in vivo* en pacientes hiperhomocistinúricos, para poder detectar cambios de las proteínas por tratamiento *in vitro* durante pocas horas.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Con el objeto de estudiar las posibles alteraciones estructurales en las moléculas Plg y t-PA N-homocisteiniladas, se analizaron muestras de las mismas por PAGE, en condiciones nativas y desnaturalizantes. Se optimizaron la concentración de proteína y las relaciones molares de HTL utilizados. En cada caso se muestran, según corresponda, los geles representativos.

#### PAGE en condiciones nativas

Se ensayaron concentraciones entre 0,015 - 18 µg de proteína. Con cantidades menores a 1,5 µg no se logró observar patrón electroforético luego de la corrida, lo que puede deberse a la baja sensibilidad del revelado (Coomasie Blue y con Plata). Las masas ensayadas entre 1,5 y 18 µg presentaron los mismos resultados, por lo que se seleccionaron para la repetición del estudio las cantidades de 3 y 6 µg de Plg y 2,75 y 5,5 µg de t-PA.

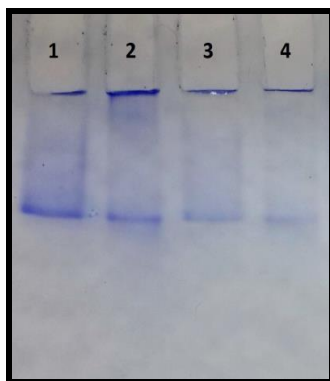
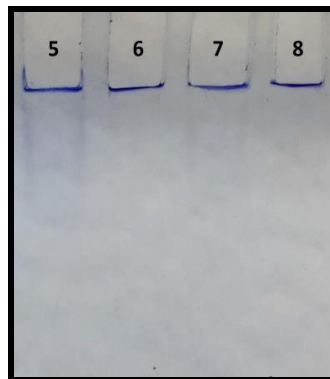


Figura 4: PAGE nativa de muestras de Plg N-homocisteinilados  
Gel de poliacrilamida comercial (Gradiente de T=4-15%, pH 8,3).  
Calle 1 y 3: Plg control (6 y 3 µg); Calle 2 y 4: Plg con HTL (6 y 3 µg).  
Representativo de 6 ensayos independientes.

La Figura 4 representa el perfil electroforético del plasminógeno control y tratado con HTL. Se observan bandas anchas y presencia de proteína en la zona de siembra. No se observaron diferencias pronunciadas entre la migración del Plg<sub>C</sub> y Plg<sub>HTL</sub>.

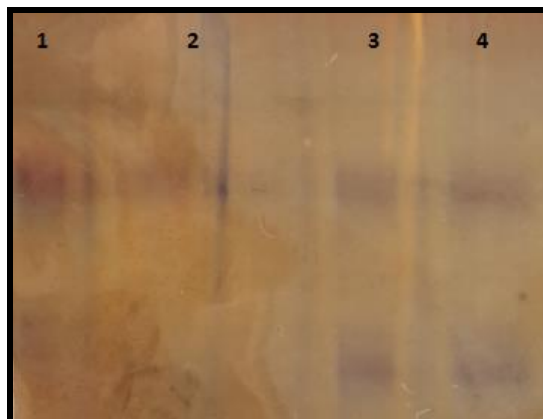
Se observaron pequeños incrementos en el desplazamiento electroforético del plasminógeno tratado, sin embargo, las diferencias no resultaron significativas. La movilidad electroforética depende de la relación carga:masa. El tratamiento con HTL provoca el aumento de la carga neta negativa incrementando la movilidad electroforética y, por otra parte, un pequeño aumento del peso molecular como consecuencia de la unión de la HTL a los grupos lisina de la proteína (pequeño, ya que el incremento de la masa por HTL resulta despreciable frente a la masa total del Plg), disminuyendo dicha movilidad. Ambos efectos contrapuestos resultarían en cambios no detectables por la sensibilidad de la técnica.

La presencia de Plg en la zona de siembra sugiere la multimerización de las moléculas proteicas, que impide la entrada al gel por el tamaño del multímero respecto del poro.



*Figura 5: PAGE nativa de muestras de t-PA N-homocisteinilados*  
Gel de poliacrilamida comercial (Gradiente de T=4-15%, pH 8,3).  
Calle 5 y 7: t-PA control (5,5 y 2,75 µg) Calle 6 y 8: t-PA con HTL (5,5 y 2,75 µg).  
Representativo de 6 ensayos independientes.

La Figura 5 representa el perfil electroforético del t-PA control y tratado con HTL. Solamente se observa presencia de proteína en la zona de siembra. Se realizó la tinción con plata para aumentar la sensibilidad del revelado (Figura 6). En la misma puede observarse presencia de proteína tanto para t-PA<sub>C</sub> como tratado. Es posible que la interacción entre las proteínas entre sí o con otros componentes presentes en la muestra (t-PA recombinante) establezca una conformación proteica que dificulte el ingreso al gel. De esta forma, la cantidad de t-PA que migra a través del gel resulta menor al límite de detección del revelado con Coomassie Blue.

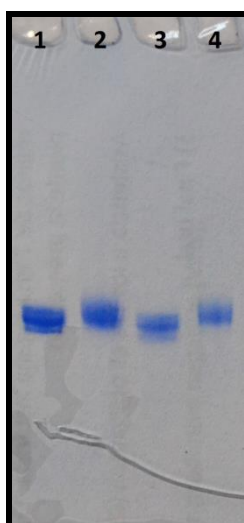


*Figura 6: PAGE nativa de muestras de t-PA N-homocisteinilados revelado con plata. Gel de poliacrilamida comercial (Gradiente de T=4-15%, pH 8,3). Calle 1 y 2: t-PA control (5,5 y 2,75 µg) Calle 3 y 4: t-PA con HTL (5,5 y 2,75 µg).*

### **PAGE en condiciones desnaturalizantes**

Se utilizaron las mismas soluciones de Plg y t-PA que en el ensayo de PAGE nativa, las cuales obtuvieron el tratamiento correspondiente para las condiciones desnaturalizantes.

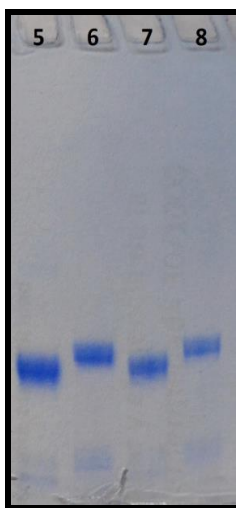
En la Figura 7 se observa el perfil electroforético del Plg control y homocisteinilado. No se observan proteínas en la zona de siembra, lo que indica la ausencia de los multímeros presentes en condiciones nativas. Esto se debe al tratamiento desnaturalizante que sufrieron las muestras, lo que permitió su homogeneización.



*Figura 7: SDS-PAGE de muestras de Plg N-homocisteinilado. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (Gradiente de T=4-15%, pH 8,3). Calle 1 y 3: Plg control (6 y 3 µg); Calle 2 y 4: Plg con HTL (6 y 3 µg). Representativo de 4 ensayos independientes.*

Además, se observa que el desplazamiento electroforético del PlgC (calle 1 y 3) fue mayor al del PlgHTL (calle 2 y 4). La diferencia de movilidad relativa del Plg HTL respecto del control resultó  $3,1 \pm 0,5$  mm.

En el caso del t-PA, al igual que con el Plg, tampoco se observaron proteínas en la zona de siembra (Figura 8). También se distingue una diferencia en el desplazamiento electroforético del t-PA<sub>C</sub> (calle 5 y 7) frente al t-PA<sub>HTL</sub> (calle 6 y 8), siendo la diferencia de movilidad relativa del t-PA<sub>HTL</sub> respecto del control resultó  $5,0 \pm 0,1$  mm.



*Figura 8: SDS-PAGE de muestras de t-PA N-homocisteinilado*

Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (Gradiente de T=4-15%, pH 8,3). Calle 5 y 7: t-PA control (5,5 y 2,75  $\mu$ g) Calle 6 y 8: t-PA con HTL (5,5 y 2,75  $\mu$ g). Representativo de 4 ensayos independientes.

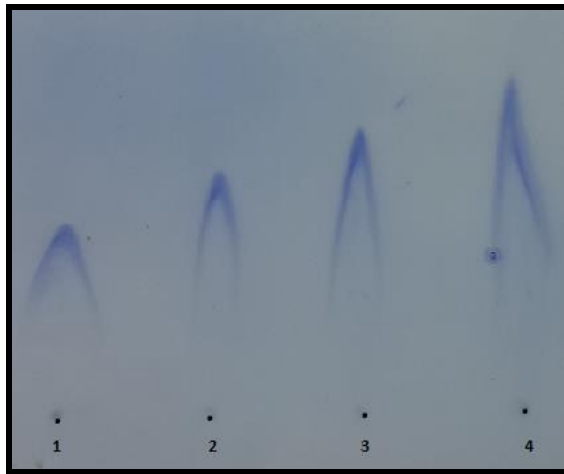
La diferencia en el desplazamiento electroforético observado, tanto para el Plg como para el t-PA, sugiere un cambio conformacional de las proteínas. La adición de moléculas de HTL por la reacción de homocisteinilización produce un aumento en el peso molecular de las proteínas. Sin embargo, este cambio es despreciable frente al peso molecular total. Por otro lado, las proteínas homocisteiniladas presentan una menor densidad de carga positiva: los grupos  $\text{-NH}_3^+$  de los residuos reaccionan con la HTL generando un nuevo grupo neutro, por lo que se esperaría que las proteínas tuvieran un desplazamiento anódico mayor. Por lo tanto, la diferencia observada sugiere que el factor determinante no es ni el peso molecular ni la carga. Tanto el Plg como el tPA son moléculas planas de una sola cadena polipeptídica, que poseen kringles, fingers u otras estructuras formadas por puentes disulfuro. El tratamiento con HTL produciría una alteración conformacional que dificulta su migración a través de los poros del gel. Esto podría ser explicado por la ruptura de puentes disulfuro intracatenarios de ambas proteínas. Anteriormente, se ha reportado en nuestro laboratorio que la HTL en altas concentraciones produjo efecto reductor modificando la conformación de proteínas como el fibrinógeno.



### Inmunoelectroforesis cruzada (IEC)

Con el objetivo de continuar el estudio de las alteraciones estructurales del Plg por efecto de la HTL, se realizó una IEC sobre acetato de celulosa deshidratado. El Plg se incubó con HTL en relación 1:1000.

Para determinar la cantidad de proteína y anticuerpo específico adecuada para el ensayo, se realizó en primer lugar una inmunoelectroforesis unidimensional evaluando un rango de cantidad de Plg de (0,3-2,4)  $\mu\text{g}$  y una dilución al medio del anticuerpo. Los resultados se observan en la Figura 9, en la cual los puntos representan la zona de siembra.



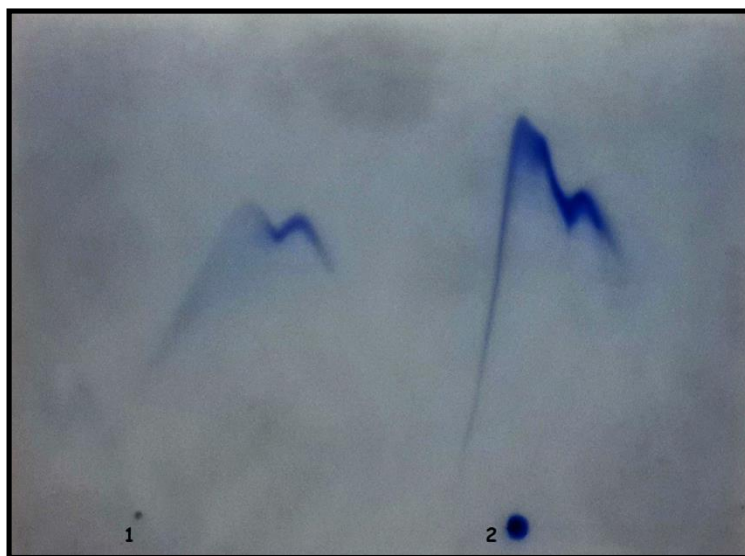
*Figura 9: inmunoelectroforesis unidimensional de Plg. Perfil electroforético de plg control a distintas concentraciones. Se indica la zona de siembra con el punto negro. Representativo de 2 ensayos independientes.*

En la técnica de inmunoelectroforesis unidimensional el área bajo la curva es directamente proporcional a la concentración proteica. Esto se observa en la Figura 9, donde los picos tienen una altura creciente manteniendo la base aproximadamente constante, según la cantidad de proteína sembrada.

En todos los casos los picos presentan una buena intensidad para detección del precipitado Plg-Anticuerpo, por lo que se utilizará una dilución al medio del anticuerpo para los próximos ensayos.

El pico 4 presenta una altura tal que se aprovechar al máximo el tamaño de la placa, lo que es importante para aumentar la resolución de la técnica, ya que se amplifican las posibles diferencias. En base a estas observaciones, se seleccionó 2,4  $\mu\text{g}$  de Plg para cada siembra.

Una vez puesto a punto el método, se procedió a realizar las IEC. En la Figura 10 se observa el perfil electroforético del Plg<sub>C</sub> (1) y tratado (2).



*Figura 10: IEC de muestra de Plg N-homocisteinilado. Perfil electroforético de 1: Plg<sub>C</sub>, 2: Plg<sub>HTL</sub>. Se indica la polaridad aplicada en la primera dimensión de la técnica.*

El Plg<sub>C</sub> mostró un corrimiento anódico, presentando dos picos ( $1,1 \pm 0,1$  cm y  $1,7 \pm 0,1$  cm), lo que puede deberse a la heterogeneidad de la muestra. El Plg tratado con HTL presentó dos picos, cuyo desplazamiento electroforético ( $0,0 \pm 0,1$  cm y  $0,7 \pm 0,1$  cm) fue marcadamente inferior al Plg<sub>C</sub>. El calcularon las áreas bajo la curva (en unidades arbitrarias): Plg<sub>C</sub> 256452; Plg<sub>HTL</sub> 255529. Estos valores son comparables, por lo que diferencia de altura observada entre Plg control y HTL ( $4,0 \pm 0,1$  cm y  $3,1 \pm 0,1$  cm) se debe a una diferencia de migración y no a una diferencia de concentración. Se observa que el primer pico no tiene corrimiento en la primer dimensión, mientras que el Plg control migra considerablemente. Este resultado es consistente con el obtenido con SDS-PAGE en el cual se observó un retraso en la migración por parte de la proteína tratada. En este caso, también se estaría observando el efecto reductor de la HTL, provocando una alteración en la estructura del plasminógeno que no le permite desplazarse como lo hace la proteína control.

### **Electroforesis capilar de zona (ECZ)**

Se continuó con el estudio del cambio estructural del plasminógeno tras la N-homocisteinilización realizando una electroforesis capilar de zona. El Plg fue tratado con HTL en una relación Plg-HTL 1:1000.

En la Figura 11 se observa el electroferograma obtenido, en el cual se distinguen la curva del plasminógeno tratado y el control. Se obtuvieron dos picos para el Plg<sub>C</sub>, lo que coincide con las observaciones previas. La muestra de Plg tratado

presenta un pico angosto y pronunciado, el cual pertenece a la HTL, haciendo evidente el exceso de la misma en la solución. Se obtuvo un solo pico, cuyo tiempo de retención fue igual a uno de los picos del control. El área bajo la curva de las fracciones de proteína de ambas curvas no resultó equivalente, por lo que la cantidad de proteína en ambos casos no resultó la misma, a pesar de que ambas soluciones sean de la misma concentración. Esto sugiere que las mediciones realizadas presentaron interferencias cuya naturaleza no podemos asegurar. Posiblemente existan interacciones entre el  $\text{Plg}_{\text{HTL}}$  y el capilar de modo que la proteína quede retenida y no llegue al detector. Son necesarios más estudios para obtener resultados concluyentes.

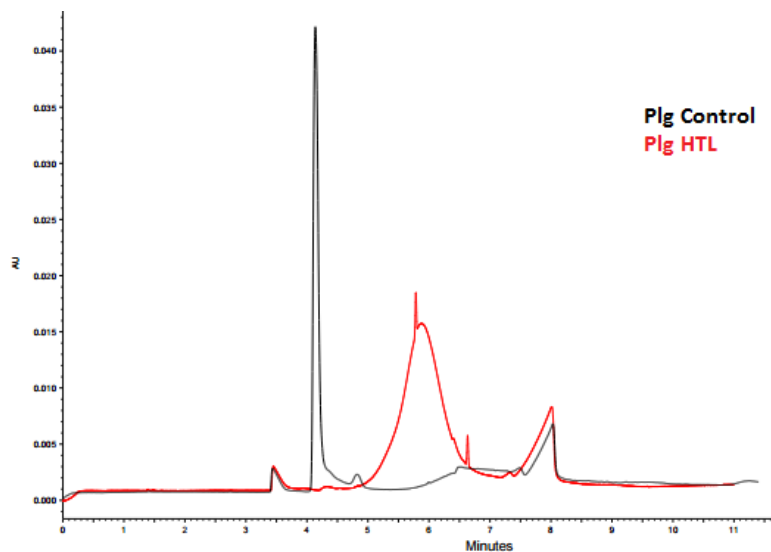


Figura 11: Electroforesis capilar de zona. Patrón electroforético comparativo del  $\text{Plg}_C$  y  $\text{Plg}_{\text{HTL}}$ .

### Capacidad de unión a fibrina

Con el objetivo de determinar las posibles alteraciones en la actividad fibrinolítica del Plg causadas por la reacción de homocisteinilación, se estudió su capacidad de unión a fibrina. El Plg fue tratado con HTL en una relación Plg-HTL 1:1000. Se realizaron estudios con y sin eliminación del exceso de HTL.

En un primer lugar se determinó la concentración de Plg óptima para el método. Se ensayaron las concentraciones 0,05; 0,025; 0,005; 0,0025  $\mu\text{M}$ .

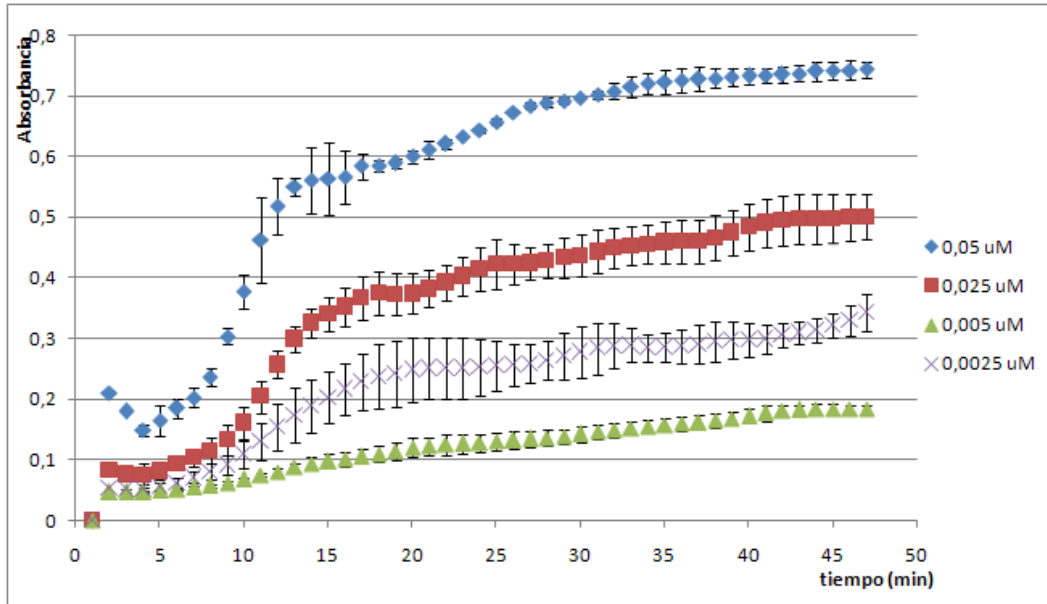


Figura 12: Ajuste de unión del Plg a Fna. Absorbancia en función del tiempo. Representativo de 3 ensayos independientes

A partir de los resultados representados en la Figura 12 se observa que la mayor absorbancia se obtuvo con la concentración 0,05  $\mu\text{M}$ . No se ensayaron concentraciones más elevadas por la limitación de la cantidad de proteína disponible.

Las otras concentraciones se descartaron porque presentan respuesta de absorbancia baja en comparación, lo que disminuiría la detección de posibles diferencias entre la proteína tratada y control. Entonces se utilizará para las próximas determinaciones Plg 0,05  $\mu\text{M}$  (4,6  $\mu\text{g}/\text{well}$ ).

En el gráfico 13 se observan las curvas de absorbancia en función del tiempo obtenidas para el Plg<sub>C</sub> y Plg<sub>HTL</sub>. La técnica utilizada permite establecer una relación directamente proporcional entre la absorbancia medida y la cantidad de Plg unido a una red de fibrina. Se obtuvieron diferencias significativas entre la absorbancia del ensayo con Plg<sub>C</sub> y el correspondiente a Plg<sub>HTL</sub>, lo que indica una disminución en el pegado del Plg a la fibrina por efecto de HTL. Esto implicaría la disminución de la actividad fibrinolítica.

El efecto observado puede deberse a cambios estructurales en el Plg<sub>HTL</sub> que disminuyan la unión a la fibrina o a la presencia de HTL libre que interfiera con el ensayo.

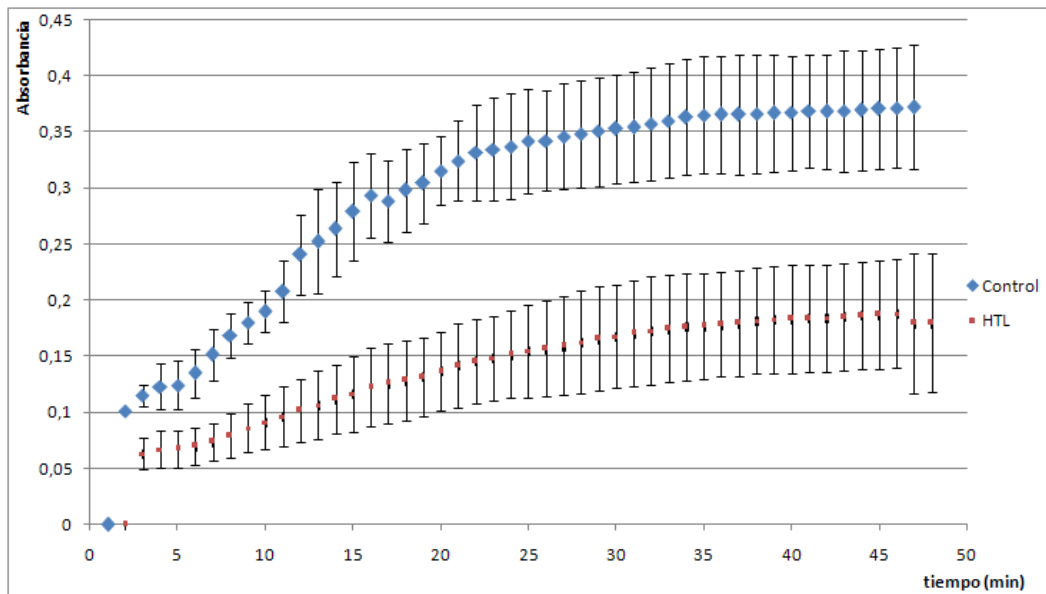


Figura 13: Capacidad de unión del Plg a Fna. Absorbancia en función del tiempo. Representativo de 4 ensayos independientes

Para eliminar el exceso de HTL se utilizó se utilizó la técnica de ultrafiltración en tubos Centricon (Amicon Ultra 0,5 Centrifugal Filter Devices) portadores de membranas de celulosa con poro selectivo con cut-off 30 KDa, realizándose lavados sucesivos con Buffer B y la posterior medición de densidad óptica para lograr la concentración proteica deseada (1,5 mg/ml).

No se obtuvieron diferencias significativas entre el Plg<sub>C</sub> y Plg<sub>HTL</sub> en ausencia de HTL libre. Con el objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo, se aumentó el tiempo de pegado del Plg a la fibrina, incubando durante 18 hs y se continuó con el protocolo. En estas condiciones, tampoco se observaron diferencias. (Figura 14).

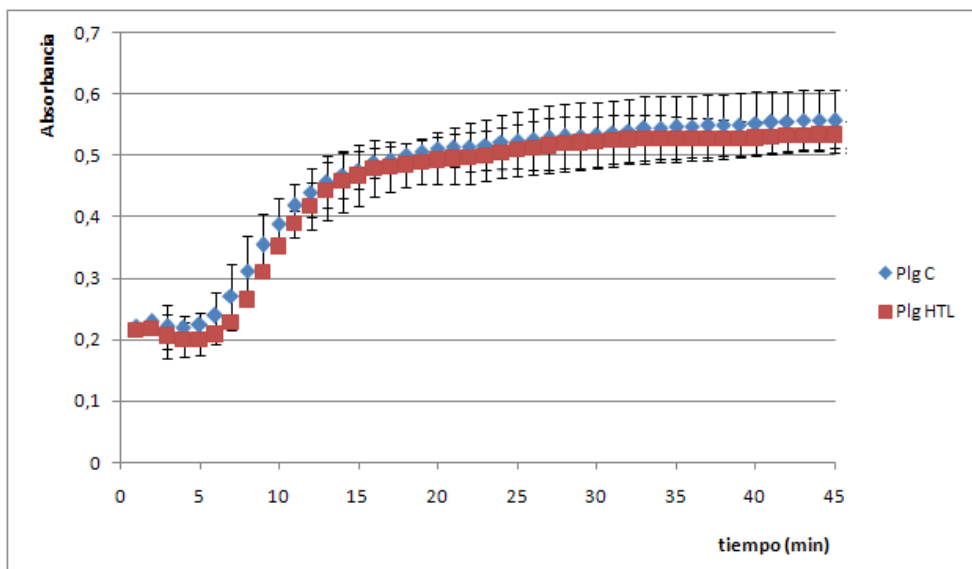


Figura 14: Capacidad de unión del Plg a Fna. Absorbancia en función del tiempo. Representativo de 3 ensayos independientes.

## Conclusiones

Se observó que el plasminógeno N-homocisteinilado mostró alteraciones estructurales en la molécula respecto al control. Estos cambios fueron estudiados por técnicas electroforéticas. Los resultados obtenidos a partir de SDS-PAGE y de IEC evidenciaron una disminución en las movilidades electroforéticas. Estos resultados ponen de manifiesto una modificación a nivel estructural de la proteína. Los resultados obtenidos evidencian la alteración estructural del plasminógeno tras la reacción de N-homocisteinilación.

Por otro lado, se observó que la HTL disminuyó la unión del plasminógeno a la fibrina, determinada por enzimoimmunoensayos.

También se observó disminución en la movilidad electroforética en PAGE-SDS del t-PA N-homocisteinilado frente al control, sugiriendo una alteración de su estructura molecular.

## Referencias bibliográficas

Bachman F. Plasminogen-Plasmin Enzyme System, en Verstraete, M, Vermynen J, Lijnen R, Arnout J. (Ed.) Thrombosis and Hemostasis. Leuven University Press. 1987, 275-301.

Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. Semin Thromb Hemost 2000; 26:227-32.

Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG, 1995. A quative assessment of plasma homocysteine as a risk for vascular disease: probable benefit of increasing folic acid intake. JAMA 1995; 274:1049-1057.

Castañon MM, Lauricella AM, Kordich L, Quintana I. Plasma homocysteine cutoff values for venous thrombosis. Clin Chem Lab Med 2007; 45:232-6.

D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. Blood 1997; 90:1-11.

Jakubowski H, Goldman E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. FEBS Lett 1993; 317:237-40.

Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. J Physiology Pharmacology 2008; 59:155-167.

Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. Clin Chem Lab Med 2007;45:1704-16.

Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. J Physiol Pharmacol. 2008; 59:155-67.

Kordich L, Duboscq C, Quintana, Rossi E. Bases del Diagnóstico Biológico en Hemostasia y Trombosis: El sistema Plasminógeno-Plasmina Informa ALAC, AÑO II, Nº2,1997.

Lauricella AM, Quintana IL, Kordich LC. Effects of homocysteine thiol group on fibrin networks: another possible mechanism of harm. Thromb Res 2002; 107:75-9.

Lauricella AM, Quintana I, Castañon M, Sassetti B, Kordich L. Influence of homocysteine on fibrin network lysis. Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17:181-6.

Lijnen HR, Collen D. Fibrinolytic agents: Mechanisms of activity and pharmacology. Thomb. Haemost.1995;74(1):387-396.

Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. Circulation 1989; 79:1180-1188.



Malinowska J, Nowak P, Olas B. Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylation on hemostatic properties of plasma. *Thromb Res* 2011; 127:214-9.

Perla-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007; 32:561-72.

Pointing CP, Marshall JM, Cederholm Williams SA. Plasminogen: a Structural Review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3:605-614.

Quintana IL, Oberholzer MV, Kordich L, Lauricella AM. Impaired fibrin gel permeability by high homocysteine levels. *Thromb Res* 2009; 127:35-8.

Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem*. 2004; 50:3-32.

Schousboe I, Feddersen K, Rojkaer R. Factor Xlla is a kinetically favorable plasminogen activator. *Thromb Haemost* 1999;82:1041-1046.

Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; 332:286-291.

Rojas AM, Kordich L, Lauricella AM. Homocysteine modifies fibrin clot deformability: another possible explanation of harm. *Biorheology* 2009; 46:379-87.

Undas A, Brozek J, Jankowski M, et al. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1397-1404.

Van Guldener C, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia, vascular pathology, and endothelial dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:281-9.

Weisel J, Veklich Y, Collet J Francis C. Structural studies of fibrinolysis by electron and light microscopy. *Throm Haemost* 1999; 82 (2): 277-282.

## **Difusión de los resultados**

**-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.**