

Evaluación de proteasas de origen vegetal libres y conjugadas como nuevos agentes trombolíticos y antiplaquetarios

Lic. Alfonso Pepe

Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias

Área Biología

Directora
Dra. María Gabriela Guevara

Co-director
Dr. Gustavo Abel Abraham

Instituto de Investigaciones Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Febrero 2019

Para Papi, Mami,

Flor y Andy.

"Mientras no alcances la verdad, no podrás corregirla,

pero si no la corriges, no la alcanzarás.

Mientras tanto, no te resignes."

José Saramago, Historia del Cerco de Lisboa.

Agradecimientos

A Flor, mi loquita, por todos los momentos que pasamos juntos, por levantarme cuando estoy abajo y por haberme ayudado hasta el cansancio durante esta etapa. Por los viajes, los paseos, las comidas, por ser mi partícula;

A Puchó y Mucha, por haberme dado todo siempre, por enseñarme lo que es importante en un mundo donde lo esencial es cada vez más invisible, donde jugar, compartir y aprender vale más de lo que parece. No sería el mismo sin ellos, tampoco estaría acá sin ellos;

A la Andre, por ser mi hermana preferida y mi amiga. Por los postergados findes de Super, por las pelis, por los libros, por alentarme y siempre confiar en mí. Por mostrarme el océano al final del camino;

A la Lili y a la Indi, por alegrarme el día cada vez que las veo;

A Lea, por bancarse mis quejas y mi cerveza;

A Agus, Sala, Martín, Maxi, Cóndor, Topo, Villy, Diego y Fede, por ser los futuros viejos gruñones con los que voy a jugar al truco;

A Rola, por ser mi amiga de siempre;

A Carlos, por sus charlas y consejos, por empaparme de sus ganas de estimular la capucha;

Agradecimientos

A Gaby, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis y por haberme dirigido durante todos estos años;

A Euge, a Seba y a Barbie, por haber compartido conmigo muchísimas horas en el lab;

A Gustavo , por sus charlas, los libros prestados y las lecciones sobre whisky;

A Pablo Caracciolo y Gustavo Abraham, por permitirme compartir con ellos la nueva etapa que comienza;

A Anabela Pedraza y Gustavo Galbán, por abrirme las puertas del laboratorio del Hospital Interzonal de Agudos Dr. Oscar E. Alende y ayudarme con los ensayos de coagulación;

A Diana Noemí García, por haberme enseñado mucho de lo poco que sé de hemostasia y por haberme ayudado con los estudios de agregación;

A Wally Whiteheart, por haberme recibido con los brazos abiertos en su laboratorio, por los debates, las discusiones, los reactivos y los consejos. Por hacerme sentir que estaba en my old Kentucky home;

A Smita Joshi, Meenakshi Banerjee y Jinchao Zhang por haber sido unos excelentes compañeros de Laboratorio durante mi estadía lejos de casa;

A Fernando y Belén, por haberme ayudado en la primera etapa de esta tesis;

A los jurados, por corregir este trabajo en tan poco tiempo;

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme dado la posibilidad de aprender acerca de lo que me gusta. Nuestra educación es uno de los bienes máspreciados que poseemos, este agradecimiento es mi forma de no darla por sentada.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	XI
Abstract	XIII
1 Introducción	3
1.1 Proteasas de origen vegetal y hemostasia	3
1.2 Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante	7
1.3 Proteasas de origen vegetal con actividad anticoagulante	11
1.4 Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica.	12
1.5 Objetivos	18
Bibliografía	25
2 Materiales y métodos	27
2.1 Material biológico	27
2.1.1 Hojas y tubérculos de papa	27
2.1.2 Muestras de sangre entera	27

Índice general

2.2 Extracción y purificación de <i>StSBTc-3</i>	28
2.2.1 Aislamiento de Fluido Intersticial (FI)	28
2.2.2 Purificación de <i>StSBTc-3</i>	28
2.3 Cuantificación de proteínas	29
2.4 Actividad azocaseinolítica	29
2.5 Preparación del Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)	30
2.6 Preparación del Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	30
2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida	30
2.8 Determinación del tiempo de trombina	31
2.9 Actividad fibrinogenolítica	31
2.10 Actividad fibrinogenolítica subunidad específica	32
2.11 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i>	33
2.12 Determinación de la actividad fibrinolítica por disolución del coágulo de fibrina	33
2.13 Ensayo de hemólisis	34
2.14 Preparación de plaquetas humanas	34
2.15 Agregación plaquetaria	35
2.16 Retracción del coágulo	36
2.17 Análisis estadístico	36
2.17.1 Optimización de la actividad fibrinogenolítica	36
2.18 Extracción de ARN de hojas de <i>Solanum tuberosum</i>	38
2.19 Extracción de ADN de tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i>	38

2.20 Clonado y expresión en un sistema heterólogo	39
2.20.1 Clonado en <i>E. coli</i>	39
2.20.2 Expresión y purificación	41
2.20.3 Disolución de cuerpos de inclusión y refoldeo	42
2.21 Análisis filogenético	43
Bibliografía	48
3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de <i>StSBTc-3</i>	49
3.1 Introducción	49
3.1.1 Hemostasia primaria	50
3.1.2 Cascada de coagulación	51
3.1.3 Fibrinólisis	53
3.2 Resultados y discusión	55
3.2.1 Actividad antiplaquetaria de <i>StSBTc-3</i>	55
3.2.2 Actividad anticoagulante de <i>StSBTc-3</i>	57
3.2.3 Actividad fibrinogenolítica y fibrinolítica de <i>StSBTc-3</i>	59
3.2.4 Actividad hemolítica de <i>StSBTc-3</i>	67
3.3 Conclusiones	68
Bibliografía	76
4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i>	77
4.1 Introducción	77
4.1.1 Metodología de Superficies de Respuesta (RSM)	78
4.1.2 Diseño de experimentos	80

Índice general

4.1.3	Análisis de datos	83
4.1.4	Verificación y validación del modelo	85
4.2	Resultados y discusión	85
4.2.1	Ajuste del modelo	85
4.2.2	Efecto de las variables independientes en la respuesta	88
4.2.3	Condiciones óptimas y verificación del modelo	92
4.3	Conclusiones	93
	Bibliografía	97
5	Actividad antiplaquetaria de <i>StSBTc-3</i>	99
5.1	Introducción	99
5.1.1	Plaquetas en hemostasia y trombosis	100
5.2	Resultados y discusión	104
5.3	Conclusiones	112
	Bibliografía	118
6	Expresión de <i>StSBTc-3</i> en <i>E. coli</i>	119
6.1	Introducción	119
6.2	Resultados y discusión	120
6.2.1	Clonado de <i>StSBTc-3</i>	120
6.2.2	Expresión y purificación de <i>StSBTc-3</i>	127
6.2.3	Actividad de <i>StSBTc-3</i> recombinante	129
6.3	Conclusiones	139
	Bibliografía	143

7 Modelo propuesto	145
Bibliografía	152
8 Perspectivas	153
Producción generada a partir de la presente Tesis	157
Índice de Figuras	163
Índice de Tablas	166

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel global. Esto promueve la constante búsqueda de nuevos agentes trombolíticos y antiplaquetarios. En este contexto distintas proteasas de origen vegetal han sido propuestas como potenciales fármacos. Previamente se ha reportado la purificación e identificación de la serín proteasa del tipo subtilisina de *Solanum tuberosum*, *StSBTc-3*. El objetivo de la presente tesis fue la evaluación de *StSBTc-3* como un nuevo agente hemostático.

Los resultados obtenidos mostraron que *StSBTc-3* extendió el tiempo de coagulación de plasma rico en plaquetas, degradando todas las cadenas que constituyen el fibrinógeno humano (actividad fibrinogenolítica). *StSBTc-3* también fue capaz de disolver parcialmente el coágulo de fibrina (actividad fibrinolítica). A partir de la optimización de la actividad fibrinogenolítica mediante el análisis de superficie de respuesta se vio que la enzima se mantuvo activa en un rango amplio de pH y temperaturas, encontrándose la máxima actividad a pH 8 y 43 °C (próximas a las condiciones fisiológicas pH 7,45 y 37 °C). A su vez, *StSBTc-3* no mostró actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos.

Se estudió la función plaquetaria en presencia de *StSBTc-3*, encontrándose que la misma

Resumen

inhibió la retracción del coágulo, afectando la agregación plaquetaria. Además, *StSBTc-3* inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina, colágeno, convulxina y el ionóforo A23187. Se encontró que, a diferencia de la actividad fibrinogenolítica, la actividad antiplaquetaria no fue inhibida por el inhibidor de serín proteasas PMSF.

Se clonó la región del gen codificante de *StSBTc-3* en *E. coli*. La proteína pudo ser recuperada de la fracción soluble del lisado pero no mostró actividad proteolítica. Sin embargo, *StSBTc-3* recombinante fue capaz de inhibir parcialmente la agregación plaquetaria inducida por trombina. El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica de *StSBTc-3* indicó la presencia del dominio Fibronectina III en la región codificante del C-terminal de la proteína. Al clonar la región del gen codificante de la proteasa sin incluir el dominio de Fibronectina III, la proteína no pudo ser recuperada en la fracción soluble del lisado, encontrándose en cuerpos de inclusión.

La inhibición de la actividad antiplaquetaria inducida por todos los agonistas ensayados sugirió que *StSBTc-3* intervendría en los pasos finales del proceso de activación plaquetaria que conducen a la agregación, postulándose entonces que *StSBTc-3* podría actuar como un inhibidor de la integrina plaquetaria $\alpha 2b\beta 3$. El hecho de que la actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3* no fue inhibida por PMSF, sumado al efecto antiagregante de *StSBTc-3* recombinante, sugirieron como posible mecanismo el bloqueo de la integrina debida a la unión a *StSBTc-3* y no a su actividad proteolítica. La presencia del dominio Fibronectina III representó un buen aval a dicha hipótesis, dado que se encuentra reportado que $\alpha 2b\beta 3$ posee afinidad por el mismo.

La caracterización de *StSBTc-3* presentada en este trabajo sugiere que la misma sería un potencial compuesto para ser tenido en cuenta en futuras aplicaciones biotecnológicas y ensayos *in vivo*.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death globally. This promotes the constant search for new thrombolytic and antiplatelet agents. In this context, different proteases of plant origin have been proposed as potential drugs. Previously, the purification and identification of the subtilisin like serine protease of *Solanum tuberosum*, *StSBTc-3*, has been reported. The objective of this thesis was the evaluation of *StSBTc-3* as a new hemostatic agent.

Results obtained show that *StSBTc-3* extends the coagulation time of platelet rich plasma, degrading all the chains that constitute human fibrinogen (fibrinogenolytic activity). *StSBTc-3* is also able to partially dissolve the fibrin clot (fibrinolytic activity). From the optimization of fibrinogenolytic activity by response surface methodology it was seen that the enzyme is active in a wide range of pH and temperatures, with maximum activity at pH 8 and 43 °C (close to physiological conditions pH 7,45 and 37 °C). In turn, *StSBTc-3* showed no haemolytic activity on human erythrocytes.

Platelet function was studied in presence of *StSBTc-3*, finding that it inhibits clott retraction affecting platelet aggregation. *StSBTc-3* inhibited platelet aggregation induced by thrombin, collagen, convulxin and ionophore A23187. It was found that, unlike fibrinogenolytic activity,

Abstract

antiplatelet activity was not inhibited by the serine protease inhibitor PMSF.

The region of the gene encoding *StSBTc-3* was cloned in *E. coli*. The protein could be recovered from the soluble fraction of the lysate but did not show proteolytic activity. However, the recombinant *StSBTc-3* was able to partially inhibit platelet aggregation induced by thrombin. Bioinformatic analysis of the nucleotide sequence of *StSBTc-3* indicated the presence of the Fibronectin III type domain in the coding region of the C-terminus of the protein. When the coding region of the protease excluding the Fibronectin III domain was cloned, the protein could not be recovered in the soluble fraction of the lysate, being found in inclusion bodies.

The inhibition of antiplatelet activity induced by all the agonists tested suggests that *StSBTc-3* intervenes in the final steps of the platelet activation process leading to aggregation, postulating that *StSBTc-3* could act as an inhibitor of platelet integrin $\alpha 2b\beta 3$. The fact that the antiplatelet activity of *StSBTc-3* was not inhibited by PMSF, added to the antiaggregant effect of recombinant *StSBTc-3*, suggests as a possible mechanism the blockade of integrin due to binding to *StSBTc-3* and not to its proteolytic activity. The presence of the Fibronectin type 3 domain presents a good endorsement to this hypothesis, since it is reported that $\alpha 2b\beta 3$ has affinity for it. The characterization of *StSBTc-3* suggests that it is a potential compound to be taken into account in future biotechnological applications and *in vivo* assays.

Abreviaturas

StSBTc-3 .

BBD Diseño de Box-Behnken.

BCA ácido bicinconínico.

DdE *Diseño de experimentos.*

FI fluido intersticial.

FPLC Fast Protein Liquid Chromatography.

FT Factor Tisular.

GST glutatión s-transferasa.

PBS buffer fosfato salino.

PGI₂ prostaciclina.

PPP plasma pobre en plaquetas.

Abreviaturas

PRP plasma rico en plaquetas.

RSM Metodología de Superficies de Respuesta.

t-PA activador tisular de plasminógeno.

TT tiempo de trombina.

TXA2 tromboxano A2.

vWF factor de Von Willebrand.

1 Introducción

1.1. Proteasas de origen vegetal y hemostasia

La hemostasia se define como el conjunto de fenómenos fisiológicos que mantienen la sangre en estado líquido dentro de los vasos sanguíneos, protegiendo al organismo de sangrado en los sitios de injuria así como también de coagulación sistémica. La hemostasia es comúnmente dividida en tres procesos para su estudio: la formación del tapón plaquetario, la coagulación y la fibrinólisis [Walsh y Ahmad, 2002].

Luego de la injuria vascular, se expone el subendotelio exponiendo colágeno. A su vez, se libera factor tisular (FT). El FT activa la cascada de coagulación mientras que el colágeno promueve la activación plaquetaria. Esta última lleva a la formación del tapón plaquetario [Hou y col., 2015]. La cascada de coagulación finaliza con la activación de la trombina que permite la polimerización del fibrinógeno en fibrina, estabilizando el tapón plaquetario y formando así el coágulo [Adams y Bird, 2009]. Luego de la restitución del endotelio normal es necesaria la redisolución del coágulo de fibrina. El activador tisular de plasminógeno, activa al plasminógeno en plasmina, que es la forma activa encargada de disolver el coágulo de fibrina [Nicholl y col., 2006]. En la Figura 1.1 se sintetizan los procesos antes mencionados.

1 Introducción

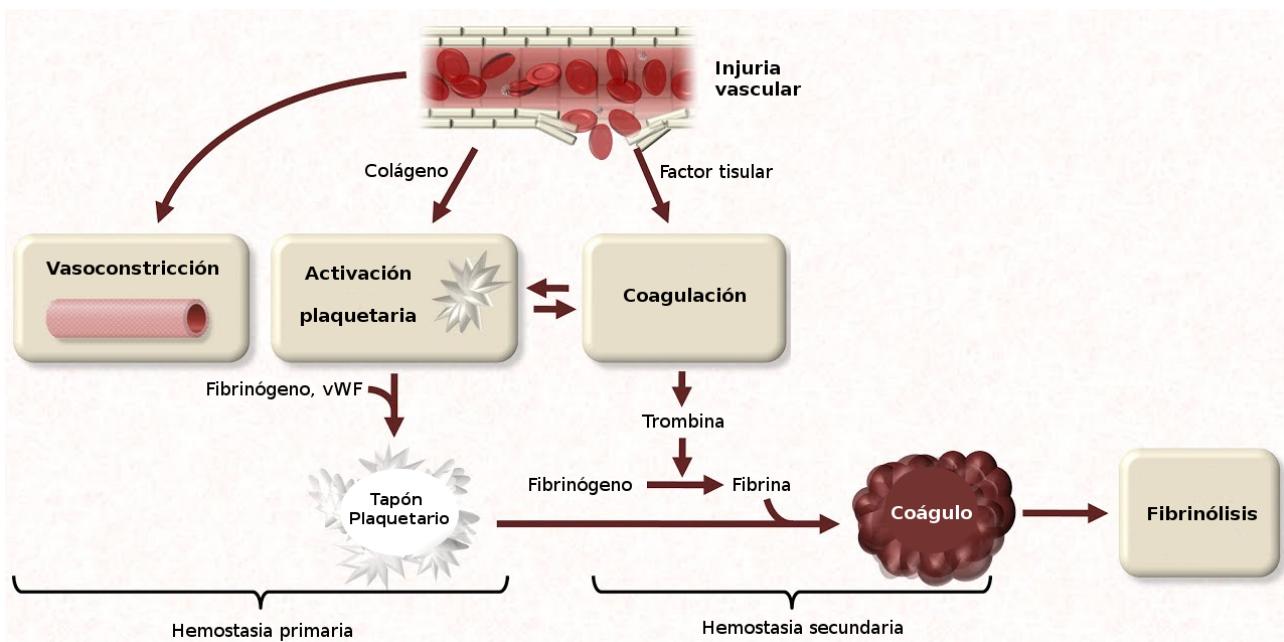


Figura 1.1: Síntesis de los mecanismos constituyentes de la hemostasia.

Uno de los procesos que involucra la hemostasia es la coagulación de las proteínas del suero sanguíneo mediado por células, la cual resulta esencial para lograr dicha protección [Walsh y Ahmad, 2002]. El mecanismo hemostático ha evolucionado como un complejo sistema en el cual serán proteasas (EC. 3.4.21.) con alta especificidad se ensamblan sobre receptores ubicados en membranas celulares junto con diversos cofactores. Estas serán proteasas son las encargadas de desencadenar una serie de reacciones enzimáticas que confluyen en la formación del trombo que detiene el sangrado [Coughlin, 2005].

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para dilucidar los mecanismos de inhibición de la coagulación sanguínea. Estudios en pacientes con deficiencias en inhibidores específicos de la coagulación y experimentos realizados en ratones genéticamente modificados han demostrado que es necesario un control negativo sistémico de la coagulación para prevenir la formación generalizada de trombos. Por un lado, los inhibidores de proteasas circulantes en la

sangre como antitrombina, el cofactor II de la heparina, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el inhibidor C1 inactivan los factores de coagulación uniéndose a sus sitios activos. La segunda modalidad del mecanismo fisiológico anticoagulante es a través de enzimas como la proteína C y la S. Esta última está implicada en vías de anticoagulación que involucran al endotelio [Versteeg y col., 2013]. En la Figura 1.2 se resumen los mecanismos de regulación negativa de la cascada de coagulación antes mencionados.

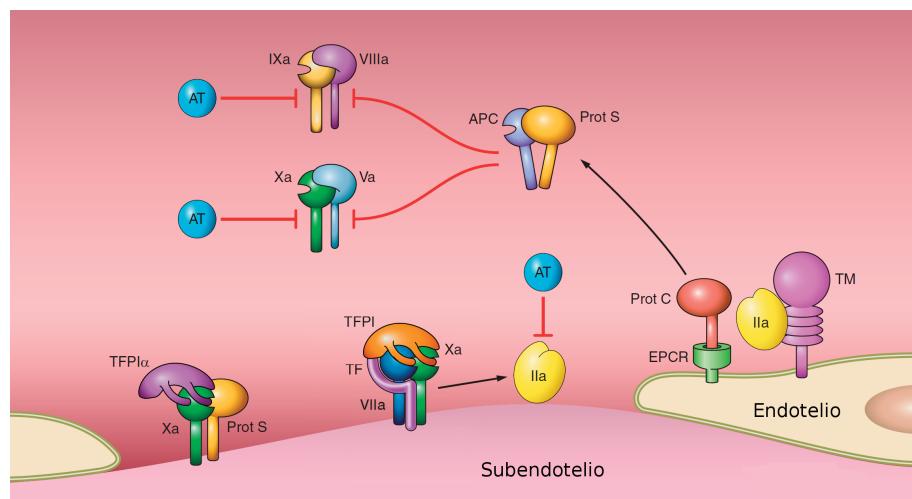


Figura 1.2: Regulación negativa de la cascada de coagulación. TFPI se une al FXa o al complejo TF-FVIIa-FXa para restringir la función de la coagulación. La proteína S (prot S) puede unirse adicionalmente a TFPIa para inhibir aún más la actividad del FXa. La trombina generada en cantidades suficientes se une a la trombomodulina y se presenta a la proteína C en el complejo con EPCR, después de lo cual la proteína C (prot C) se activa (APC). APC en complejo con su cofactor proteína S luego inactiva al FVa y FVIIIa. La antitrombina (AT) constituye otro nivel de control, ya que inhibe la función de la trombina, FIXa y FX. Imagen modificada de Versteeg y col. [Versteeg y col., 2013].

Las enfermedades cardiovasculares son una de la causa de muerte con mayor prevalencia en el mundo [Piché y col., 2018]. Millones de pacientes en todo el mundo hacen uso de drogas anticoagulantes siendo la warfarina una de las más utilizadas por décadas [Ageno y col., 2012]. En los últimos años, nuevas drogas anticoagulantes han sido aprobadas para su uso como

1 Introducción

alternativas a la warfarina, sin embargo ningún anticoagulante es ideal y sigue siendo necesario revertir los efectos de los mismos en situaciones de sangrado críticas [Dzik, 2012].

Las drogas utilizadas en terapias fibrinogenolíticas presentan el mismo problema. Existe una gran cantidad de ellas, pero todas poseen riesgo de sangrado asociado [Ageno y col., 2012]. Por ejemplo, el activador tisular de plasminógeno es una de las drogas más utilizadas para el tratamiento del infarto agudo de miocardio pero tiene asociado como efecto secundario posibles sangrados en el cerebro [Caldwell y col., 2006]. En este contexto, existen actualmente numerosas investigaciones que buscan utilizar extractos y proteasas de plantas como nuevos fármacos anticoagulantes, antiplaquetarios y/o fibrinolíticos.

Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos. Este grupo incluye exopeptidasas y endopeptidasas, diferenciadas por el lugar en el que actúan sobre la cadena polipeptídica [Guevara y col., 2018]. Las diferencias entre peptidasas y proteasas son sutiles y comparten las mismas características químicas. El término proteasa se usará a lo largo de esta tesis.

Las proteasas se dividen en 4 subclases, según la arquitectura de su sitio catalítico: serín proteasas (un residuo serina en el sitio activo), cisteín proteasas (un residuo cisteína en el sitio activo), aspartil proteasas (el residuo ácido aspártico es necesario para la actividad catalítica) y metaloproteasas (utilizan como cofactor un ion metálico). Las serín y cisteín proteasas forman complejos covalentes, mientras que las aspartil y metaloproteasas dependen de reacciones ácido base [Antão y Malcata, 2005].

Todos estos tipos de proteasas están presentes en los vegetales; las mismas se han relacionado con numerosos procesos fisiológicos tales como fotosíntesis [Wittenbach y col., 1982],

1.2 Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante

embriogénesis [Kim y col., 2009], respuesta inmune [Rodríguez-Herva y col., 2012], muerte celular [Lazebnik y col., 1995] y otros. Una característica de las proteasas de origen vegetal es la diversidad de sustratos así como el amplio rango de temperaturas y pH en los que conservan su actividad. Estas propiedades hacen de las proteasas de plantas potenciales candidatos para ser usados en biotecnología [Feijoo-Siota y Villa, 2011].

Se revisarán aquí los avances actuales en el uso de proteasas de origen vegetal como compuestos antiplaquetarios, anticoagulantes y fibrinolíticos, así como se mencionarán algunas proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante.

1.2. Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante

Se han encontrado varios compuestos procoagulantes pertenecientes a una gran variedad de especies de las cuales la gran mayoría son proteasas. A modo de ejemplo, todos los procoagulantes caracterizados en los venenos de serpiente, son proteasas [Kini, 2005]. Esto mismo ocurre con los compuestos derivados de plantas, en donde casi exclusivamente todos los procoagulantes descriptos hasta la fecha son proteasas [Shivaprasad y col., 2009a]. Sin embargo los mecanismos de acción específicos aún no han sido elucidados en la mayoría de los casos [Shivaprasad y col., 2010].

Se ha reportado que cisteín proteasas obtenidas del látex de ciertas especies vegetales exhiben una acción procoagulante específica [Rajesh y col., 2005]. La fracción enzimática del látex de *Asclepias curassavica* presenta una mayor actividad proteolítica comparada con la tripsina y

1 Introducción

es capaz de reducir el tiempo de coagulación del plasma sanguíneo. También se observó que el patrón electroforético del coágulo de fibrina inducido por esta fracción enzimática es similar al del coágulo de fibrina inducido por trombina, lo cual podría indicar un mecanismo de acción similar. La actividad proteolítica del látex de *Asclepias curassavica* fue completamente inhibida por el ácido yodoacético por lo que los autores concluyeron que la acción procoagulante se debía a la fracción de cisteín proteasas [Shivaprasad y col., 2009b].

La pergularina es una glicoproteína de 23 kDa perteneciente a la familia de las cisteín proteasas que fue purificada mediante cromatografía de intercambio iónico del látex de *Pergularia extensa*. La actividad proteolítica de esta proteasa es inhibida por ácido yodoacético. La pergularina exhibe actividad procoagulante con plasma citratado en presencia de fibrinógeno similar a la trombina y presenta actividad fibrinogenolítica dosis y tiempo dependiente. Los autores establecieron que la degradación del fibrinógeno se debe a la hidrólisis selectiva de las cadenas de fibrinógeno α y β , mientras que observaron que la cadena γ no era susceptible de hidrólisis [Shivaprasad y col., 2010].

Las proteínas derivadas del látex de *Calotropis procera* (LP) son conocidas por sus propiedades antiinflamatorias. Ramos y col. (2012) evaluaron la eficacia de LP para mantener la hemostasia durante sepsis. Como modelo biológico los autores utilizaron ratones infectados con salmonella, pudiéndose demostrar que LP redujo el conteo de plaquetas y aumentó los tiempos de coagulación, mientras que para ratones normales LP mostró un efecto procoagulante. Se analizaron tres subfracciones de látex de las cuales algunas de ellas mostraron un efecto proteolítico sobre azocaseína y exhibieron un efecto procoagulante en plasma humano de manera dependiente de la concentración. Al igual que la tripsina y la plasmina, estas subfracciones produjeron

1.2 Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante

efectos tanto fibrinogenolíticos como fibrinolíticos mediados por la hidrólisis de las cadenas α , β y γ del fibrinógeno y el α -polímero y el dímero γ del coágulo de fibrina, respectivamente [Ramos y col., 2012].

Satish y col. (2012) caracterizaron extractos acuosos de hoja y de raíz de *Moringa oleifera* (*Moringaceae*). Ambos extractos exhibieron actividad procoagulante significativa reflejada por una disminución en el tiempo de recalcificación, acompañado por actividades fibrinolíticas y fibrinogenolíticas. La actividad caseinolítica del extracto de hoja fue significativamente mayor que la del extracto de raíz. Se encontraron resultados similares para el caso de la actividad hidrolizante del coágulo de plasma humano, en donde la hidrólisis causada por el extracto de hoja fue significativamente más alta que la producida por el extracto de raíz. Con el objetivo de detectar enzimas proteolíticas los autores utilizaron técnicas zimográficas posteriormente a la separación electroforética en geles. El perfil zimográfico indicó que ambos extractos ejercían su actividad procoagulante hidrolizando selectivamente las subunidades α y β del fibrinógeno para formar la red de fibrina, exhibiendo por lo tanto actividad fibrinogenolítica. Sin embargo, la incubación prolongada dio como resultado la degradación del coágulo de fibrina formado para ambos extractos, lo que sugiere actividad fibrinolítica a tiempos más largos [Satish y col., 2012].

El látex de varias especies de plantas de la familia *Euphorbiaceae* se ha aplicado tradicionalmente sobre heridas para detener el sangrado y mejorar el proceso de curación [Jaiprakash y Chandramohan, 2006, Ambiga y col., 2007]. El látex detiene el sangrado de las heridas recientes al reducir el tiempo de coagulación de la sangre total. Se ha aceptado que la actividad hemostática se debe a las proteasas presentes en el látex de estas especies vegetales [Badgujar, 2014]. La

1 Introducción

proteasa extraída del látex de *Euphorbia nivulia* presenta una notable actividad coagulante de sangre entera así como también las proteasas extraídas del látex de *Pedilanthus tithymaloides* y *Synadenium grantii*. La proteasa del látex de *Pedilanthus tithymaloides* puede reducir significativamente el tiempo de coagulación de sangre entera de las muestras de sangre de humanos y ratones. Esta fracción de proteasas de látex posee fitoconstituyentes capaces de detener el sangrado de la herida y acelerar el proceso de coagulación, sugiriendo su potencial uso en el tratamiento de heridas. De las enzimas estudiadas por Badgujar y col. (2014) la proteasa de *Pedilanthus tithymaloides* resultó ser el agente hemostático más potente [Badgujar, 2014].

Un estudio realizado por Singh y col. (2015) evaluó el potencial hemostático de *Tabernaemontana divaricata* y *Artocarpus altilis* de las familias *Apocynaceae* y *Moraceae*, respectivamente. Para ello, los extractos crudos (CE) de látex de ambas plantas se sometieron inicialmente a diálisis y se evaluó su actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato. Se encontró que la actividad caseinolítica de ambos extractos de plantas fue mayor que la de las proteasas control, papaína y tripsina. Los estudios de inhibición confirmaron la presencia de cisteín proteasas en ambos extractos. Por otro lado, los CE de ambas plantas exhibieron actividad coagulante sobre plasma pobre en plaquetas, mientras que una reducción significativa en el tiempo de coagulación fue exhibida por el extracto de *T. divaricata* en comparación con *A. altilis*. Estos resultados se confirmaron adicionalmente mediante ensayos de actividad fibrinolítica, donde los autores mostraron que los extractos de ambas plantas fueron capaces de hidrolizar el coágulo formado a partir de sangre entera. El análisis comparativo final reveló que *T. divaricata* posee el mayor potencial como agente hemostático [Singh y col., 2015].

La actividad procoagulante revisada se debe a la actividad proteolítica del látex de distintas

especies vegetales. En algunos casos, las proteasas fueron aisladas y se encontró que eran del tipo cisteín proteasas. Las mismas se resumen en la Tabla 1.1.

1.3. Proteasas de origen vegetal con actividad anticoagulante

Las sustancias anticoagulantes se caracterizan por prolongar el tiempo de formación de coágulos. Las mismas suelen ser enzimas del tipo serín y cisteín proteasas, o compuestos no enzimáticos como inhibidores de proteasas [Garcia, 2009]. Estudios recientes mostraron que varios extractos y proteasas aislados de plantas poseen actividad anticoagulante [Pepe y col., 2018]. El mecanismo de acción aún no es entendido totalmente, sin embargo conforman una fuente potencial de nuevas opciones terapéuticas.

La proteasa trombolítica kitamasa fue purificada de la planta comestible *Aster yomena* (*Kitam.*) y posee un peso molecular de 50 kDa. La misma mostró tanto actividad anticoagulante como actividad fibrinolítica por zimografía. La actividad fibrinolítica de kitamasa fue fuertemente inhibida por los inhibidores de metalo proteasas EDTA y EGTA, el inhibidor de cisteín proteasas TPCK y el inhibidor de serín proteasas PMSF. Ensayos fibrinolíticos subunidad específicos mostraron que la enzima disolvió el coágulo de fibrina escindiendo las cadenas α y γ de fibrina y fibrinógeno. En ensayos *in vivo* en ratones, kitamasa ejerció un efecto protector significativo contra el tromboembolismo inducido por colágeno y epinefrina, en concordancia con un retraso en el tiempo de coagulación reportado por los autores. [Choi y col., 2014].

Gangaraju y col. (2015) caracterizaron extractos acuosos de semillas de *Artocarpus heterophy-*

1 Introducción

llus (AqSEJ), encontrando que presentaron tanto actividad anticoagulante como antiplaquetaria. La actividad anticoagulante de AqSEJ se corroboró mediante el ensayo *in vivo* de sangrado de cola de ratón, en el cual la inyección intravenosa de AqSEJ prolongó significativamente el tiempo de sangrado de manera dosis dependiente. Además, AqSEJ inhibió la agregación plaquetaria inducida por agonistas tales como ADP, epinefrina y colágeno [Gangaraju y col., 2015].

En la tabla 1.2 se resumen las proteasas y extractos de plantas con actividad anticoagulante.

1.4. Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(genolítica).

Fisiológicamente, la plasmina juega un papel fundamental en la fibrinólisis disolviendo el coágulo de fibrina (Figura 1.1). Algunas proteasas vegetales contribuyen a la fibrinólisis mediante la activación del plasminógeno en plasmina, mientras que otras tienen actividad fibrinolítica por sí mismas.

Las especies de *Crinum spp.* han sido ampliamente utilizadas por la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades en todo el mundo. Crinumina es una serín proteasa de *Crinum asiaticum* con un amplio espectro de estabilidad y actividad, que muestra actividad fibrinolítica similar a la plasmina e inhibe la agregación plaquetaria, según lo establecido por microscopía de contraste de fases, agregación de sangre completa y citometría de flujo. Crinumina podría ser un agente terapéutico eficiente y de bajo costo para el tratamiento y prevención de enfermedades

1.4 Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica.

tromboembólicas [Singh y col., 2011].

Siritapetawee y col. (2012) aislaron y purificaron una proteasa del látex de *Artocarpus heterophyllus* designada como proteasa antimicrobiana de 48 kDa (AMP48). La actividad enzimática de AMP48 fue fuertemente inhibida por fluoruro de fenilmetanosulfonilo y el inhibidor de tripsina de soja, lo que indica que la enzima es una serín proteasa. AMP48 presentó actividad fibrinogenolítica con una actividad máxima entre los 55 y 60 °C a pH 8. La enzima hidrolizó eficientemente la cadena α seguido de subunidades β y γ del fibrinógeno humano [Siritapetawee y col., 2012].

Una serín proteasa de 34 kDa con actividad fibrinolítica, designada como Hirtina, se purificó hasta homogeneidad a partir del látex de *Euphorbia hirta* mediante la combinación de cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel. Hirtina exhibió actividades de esterasa y amidasa junto con actividad azocaseinolítica, gelatinolítica, fibrinogenolítica y fibrinolítica. También fue capaz de hidrolizar la cadena α , seguidas de las cadenas β y γ del fibrinógeno y el coágulo de fibrina respectivamente. Se encontró que el pH y la temperatura óptimos para la actividad de la enzima fueron 7,2 y 50 °C, respectivamente. La actividad enzimática de Hirtina fue inhibida significativamente por PMSF y AEBSF, ambos inhibidores de serín proteasas [Patel y col., 2012].

Una serín proteasa con actividad fibrinolítica tipo quimotripsina fue purificada a partir de la hierba medicinal *Petasites japonicus*. Su peso molecular se estimó en 40,0 kDa. Se reportó que la actividad proteolítica de la enzima fue inhibida por los inhibidores de serín proteasa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y el fluoruro de 4-(amidinofenil)metanosulfonilo. El ensayo de actividad enzimática en placa de fibrina reveló que la enzima hidroliza fibrina de manera directa. También

1 Introducción

mostró potente actividad fibrinogenolítica, hidrolizando las subunidades α , γ y β del fibrinógeno humano [Kim y col., 2015].

La proteasa Eumilina, fue aislada del látex de *Euphorbia milii var. hislopii* mediante una combinación de etapas cromatográficas de intercambio iónico. Es una proteasa monomérica con una masa molecular aparente de 30 kDa. Tiene actividades caseinolítica y fibrinogenolítica, pero no posee actividad fibrinolítica. La enzima hidroliza fácilmente la cadena α de fibrinógeno y más lentamente, la cadena β . Su actividad fibrinogenolítica es inhibida por β -mercaptoetanol y leupeptina. La inyección intraplantar de Eumilina en ratones causó una hiperalgesia (mayor sensibilidad al estímulo doloroso) dosis y tiempo dependiente, alcanzando su punto máximo 1-5 horas después de la inyección de la enzima. Los análisis morfológicos indicaron que Eumilina indujo mionecrosis intensa, con infiltrado leucocitario visible y células musculares dañadas 24 horas después de la inyección [Fonseca y col., 2010].

Una proteasa dimérica glicosilada designada como EuP-82 se purificó a partir del látex de *Euphorbia lactea* látex. Dado que su actividad proteolítica fue inhibida por PMSF, EuP-82 fue clasificada como una serín proteasa. Mediante MALDI-TOF MS Siritapetawee y col. (2015) mostraron que EuP-82 es un homodímero, que es a su vez la forma activa. EuP-82 posee actividad fibrinogenolítica cuyas condiciones óptimas de pH y temperatura fueron 11 y 35 °C respectivamente. La enzima EuP-82 posee un amplio intervalo de estabilidad de pH (4 a 12). EuP-82 es una enzima rica en prolina (aproximadamente 20,69 % en moles). Aumentos similares en la producción de prolina pueden encontrarse en plantas superiores en respuesta a estreses tanto bióticos como abióticos. Los autores postulan que la prolina elevada podría estabilizar la actividad, estructura y plegamiento de la proteasa [Siritapetawee y col., 2015].

1.4 Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica.

Las proteasas extraídas de especies del género *Curcuma* poseen actividad procoagulante y fibrinolítica. Shivalingu y col. purificaron una proteína con potente actividad proteolítica denominada proteasa-II de *C. aromática* (CAP-II). La misma es una proteína monomérica cuyo peso molecular fue de 12,4 kDa. La actividad caseinolítica y fibrinolítica de CAP-II fue completamente inhibida por fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). El CAP-II exhibió una temperatura óptima de 45 °C y un pH óptimo de 7,5. Además resultó ser capaz de hidrolizar las tres subunidades de fibrinógeno ($\alpha > \beta > \gamma$) y exhibió una fuerte actividad procoagulante al reducir el tiempo de coagulación del plasma humano. También mostró actividad fibrinolítica por hidrólisis completa del α -polímero y el dímero $\gamma - \gamma$ presente en la red de fibrina [Shivalingu y col., 2016]. En la Tabla 1.3 se resumen las proteasas con actividad fibrin(ogen)olítica descriptas anteriormente.

Los reportes mencionados anteriormente muestran que existe un amplio espectro de proteasas vegetales con actividades hemostáticas, de las cuales algunas de ellas han sido purificadas y otras se presentan como extractos con actividad proteolítica. En este contexto, en la presente tesis se aborda el estudio de *StSBTc-3*, una serín proteasa de *Solanum tuberosum* previamente identificada en nuestro laboratorio [Fernández y col., 2015]. *StSBTc-3* es una serín proteasa de 70 kDa del tipo subtilisina que fue extraída y purificada del apoplasto de hojas de *Solanum tuberosum*. La expresión de esta proteasa es constitutiva en los órganos vegetativos hoja, tubérculo, tallo y raíz. *StSBTc-3* se encuentra presente en todos estos órganos a excepción de los brotes. La abundancia de serín proteasas de plantas relacionadas con la hemostasia reportadas en bibliografía (Tabla 1.3) sumada al hecho del rol fundamental que cumplen las serín proteasas

1 Introducción

en el mantenimiento de la hemostasis condujo al planteo de la siguiente hipótesis de trabajo:

la actividad proteolítica de *StSBTc-3* es capaz de afectar el proceso hemostático.

La predicción de estos efectos es difícil de realizar, ya que como se describió anteriormente, los mismos no siempre son sinérgicos. Existen proteasas con actividad fibrinogenolítica y procoagulante (Tabla 1.1) así como proteasas con actividad fibrinogenolítica que retrasan los tiempos de coagulación (Tabla 1.2). Si bien es cierto que la gran mayoría de las proteasas reportadas que presentaron actividad fibrinogenolítica resultaron ser serín proteasas (Tabla 1.3), se requiere una caracterización minuciosa de la actividad proteolítica para poder evaluar el potencial de *StSBTc-3* como un futuro agente terapéutico.

1.4 Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica.

Tabla 1.1: Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante

Referencia	Especie vegetal	Extracto	Proteasa	Subfamilia	Actividad procoagulante	Actividad fibrino(geno)lítica
Shivaprasad y col., 2009	<i>Asclepias curassavica</i>	látex	Pergularina	Cisteína	Reduce tiempos de coagulación	Hidroliza cadenas A α y B β de fibrinógeno humano
Shivaprasad y col., 2010	<i>Periploaria eatensa</i>	látex	Pergularina	Cisteína	Actividad tipo trombina	Hidroliza todas las cadenas
Ramos y col., 2012	<i>Culicropis procera</i>	látex			Efecto procoagulante en plasma humano	
Satish y col., 2012	<i>Moringa oleifera</i>	látex de hoja y raíz			Reduce tiempos de recalcificación	
Badgrijar y col., 2014	<i>Euphorbia nivalis</i>	látex			Reduce tiempos de coagulación de sangre entera	
	<i>Padilanthus tithymaloides</i>	látex			Reduce tiempos de coagulación de sangre entera	
	<i>Smilacium grantii</i>	látex			Reduce tiempos de coagulación de sangre entera	
Singh y col., 2015	<i>Tobernaemoniata divaricata</i>	látex			Reduce tiempos de coagulación de plasma pobre en plaquetas	Hidrolisis del coágulo de fibrina
	<i>Artocarpus altilis</i>				Reduce tiempos de coagulación de plasma pobre en plaquetas	Hidrolisis del coágulo de fibrina

Tabla 1.2: Proteasas de origen vegetal con actividad anticoagulante

Referencia	Especie vegetal	Extracto	Proteasa	Subfamilia	Actividad anticoagulante	Actividad fibrino(geno)lítica	Otros
Choi y col., 2014	<i>Aster yomena</i>				Reduce los tiempos de coagulación prolongados	Hidroliza las cadenas A γ y γ de fibrinógeno	
Gangaraju y col., 2015	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Extracto acuoso de semilla	Kitanasa	Serín	Tiempos de coagulación prolongados	Inhibe agregación plaquetaria	

Tabla 1.3: Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica

Referencia	Especie vegetal	Extracto	Proteasa	Subfamilia	Actividad fibrino(geno)lítica	Otros
Singh y col., 2011	<i>Crinum asiaticum</i>		Crinumina	Serín	Actividad fibrinolítica similar a la plasmina	Inhibe la agregación plaquetaria
Sitritapetawee y col., 2012	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	látex	AMP48	Serín	Hidroliza la cadena α seguida de β y γ del fibrinógeno humano	
Patel y col., 2012	<i>Euphorbia hirta</i>	látex	Hirtina	Serín	Hidroliza todas las cadenas del fibrinógeno y posee actividad fibrinolítica.	
Kim y col., 2015	<i>Petasites japonicus</i>				Hidroliza cadenas α , γ y β del fibrinógeno humano.	Prolonga tiempos de coagulación
Fonseca y col., 2010	<i>Euphorbia milii</i>		Eunivila	Serín	Hidroliza cadena α y β del fibrinógeno humano.	Posee actividad fibrinolítica y produce mionecrosis en ensayos <i>in vivo</i>
Sitritapetawee y col., 2015	<i>Euphorbia lactea</i>	látex	Exp-82	Serín	Digiere todas las subunidades de fibrinógeno humano	
Shivalingam y col., 2016	<i>Curcumina aromatica</i>		CAP-II	Serín	Hidroliza cadenas de fibrinógeno humano según la actividad A α >B β > γ	Actividad caseinolítica y actividad procoagulante

1.5. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis fue evaluar el potencial de *StSBTc-3* como un nuevo agente antiplaquetario, anticoagulante y/o trombolítico de origen vegetal para su utilización en el mantenimiento del correcto funcionamiento de la hemostasia.

Como objetivos particulares se propusieron:

1. Estudiar si *StSBTc-3* posee actividad antiplaquetaria, anti/procoagulante o fibrino(geno)lítica
2. Caracterizar las actividades encontradas en el punto anterior.
3. Expressar *StSBTc-3* de forma recombinante en un sistema heterólogo.
4. Caracterizar la proteasa recombinante obtenida.
5. Inmovilizar *StSBTc-3* sobre la superficie de sistemas poliuretánicos bioestables y caracterizar los sistemas obtenidos.

Bibliografía

- [Adams y Bird, 2009] Adams, R. L. y Bird, R. J. (2009). Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, 14(5):462–470.
- [Ageno y col., 2012] Ageno, W., Gallus, A. S., Wittkowsky, A., Crowther, M., Hylek, E. M., y Palareti, G. (2012). Oral anticoagulant therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 141(2):e44S–e88S.
- [Ambiga y col., 2007] Ambiga, S., Narayanan, R., Gowri, D., Sukumar, D., y Madhavan, S. (2007). Evaluation of wound healing activity of flavonoids from ipomoea carnea jacq. *Ancient science of Life*, 26(3):45.
- [Antão y Malcata, 2005] Antão, C. M. y Malcata, F. X. (2005). Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7):637 – 650.

Bibliografía

- [Badgujar, 2014] Badgujar, S. B. (2014). Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1):733–9.
- [Caldwell y col., 2006] Caldwell, S. H., Hoffman, M., Lisman, T., Macik, B. G., Northup, P. G., y Reddy, K. R. (2006). SPECIAL ARTICLE Coagulation Disorders and Hemostasis in Liver Disease: Pathophysiology and Critical Assessment of Current Management. pages 1039–1046.
- [Choi y col., 2014] Choi, J.-h., Kim, D.-w., Park, S.-e., Choi, B.-s., Sapkota, K., Kim, S., y Kim, S.-j. (2014). Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant Aster yomena (Kitam.) Honda with anticoagulant activity : Purification and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx):4–9.
- [Coughlin, 2005] Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8):1800–1814.
- [Dzik, 2012] Dzik, W. S. (2012). Reversal of drug-induced anticoagulation : old solutions and. pages 45–55.
- [Feijoo-Siota y Villa, 2011] Feijoo-Siota, L. y Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess technology*, 4(6):1066–1088.
- [Fernández y col., 2015] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a solanum tuberosum subtilisin-like protein with caspase-3 activity (stsbtc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86:137–146.
- [Fonseca y col., 2010] Fonseca, K. C., Morais, N. C. G., Queiroz, M. R., Silva, M. C., Gomes,

- M. S., Costa, J. O., Mamede, C. C. N., Torres, F. S., Penha-Silva, N., Beletti, M. E., Cabrava, H. a. N., y Oliveira, F. (2010). Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. *Phytochemistry*, 71(7):708–15.
- [Gangaraju y col., 2015] Gangaraju, S., Manjappa, B., Subbaiah, G. K., Kempaiah, K., Shashidharanurthy, R., Plow, J. H., Martin, S. S., Shinde, M., y Sannaningaiah, D. (2015). Jackfruit (*artocarpus heterophyllus*) seed extract exhibits fibrino (geno) lytic activity. *Pharmacognosy Journal*, 7(3).
- [Garcia, 2009] Garcia, D. (2009). Novel anticoagulants and the future of anticoagulation. *Thrombosis research*, 123:S50–S55.
- [Guevara y col., 2018] Guevara, M. G., Rocío, T. F., Virginia, T. C., y col. (2018). An overview of plant proteolytic enzymes. In *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, pages 1–19. Springer.
- [Hou y col., 2015] Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, R. C., Marshall, A., y Ni, H. (2015). Platelets in hemostasis and thrombosis: novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *Journal of biomedical research*, 29(6):437.
- [Jaiprakash y Chandramohan, 2006] Jaiprakash, B. y Chandramohan, D. (2006). Burn wound healing activity of *euphorbia hirta*. *Ancient science of Life*, 25(3-4):16.
- [Kim y col., 2015] Kim, D.-w., Choi, J.-h., Park, S.-e., Kim, S., Sapkota, K., y Kim, S.-j. (2015). International Journal of Biological Macromolecules Purification and characterization of a fi-

Bibliografía

- brinolytic enzyme from Petasites japonicus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72:1159–1167.
- [Kim y col., 2009] Kim, J., Rudella, A., Ramirez Rodriguez, V., Zybailov, B., Olinares, P. D. B., y van Wijk, K. J. (2009). Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21(6):1669–92.
- [Kini, 2005] Kini, R. M. (2005). Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 34(4-5):200–204.
- [Lazebnik y col., 1995] Lazebnik, Y. A., Takahashi, A., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., Earnshaw, W. C., y Smertenko, A. (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20):9042–6.
- [Nicholl y col., 2006] Nicholl, S. M., Roztocil, E., y Davies, M. G. (2006). Plasminogen activator system and vascular disease. *Current Vascular Pharmacology*, 4(2):101–116.
- [Patel y col., 2012] Patel, G. K., Kawale, A. A., y Sharma, A. K. (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb euphorbia hirta. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52:104–111.
- [Pepe y col., 2018] Pepe, A., Guevara, M. G., y Tito, F. R. (2018). Potential use of plant proteolytic enzymes in hemostasis. In *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, pages 129–141. Springer.

- [Piché y col., 2018] Piché, M.-E., Poirier, P., Lemieux, I., y Després, J.-P. (2018). Overview of epidemiology and contribution of obesity and body fat distribution to cardiovascular disease: an update. *Progress in cardiovascular diseases.*
- [Rajesh y col., 2005] Rajesh, R., Gowda, C. R., Nataraju, A., Dhananjaya, B., Kempuraju, K., y Vishwanath, B. (2005). Procoagulant activity of calotropis gigantea latex associated with fibrin (ogen)olytic activity. *Toxicon*, 46(1):84–92.
- [Ramos y col., 2012] Ramos, M. V., Viana, C. A., Silva, A. F. B., Freitas, C. D. T., Figueiredo, I. S. T., Oliveira, R. S. B., Alencar, N. M. N., Lima-Filho, J. V. M., y Kumar, V. L. (2012). Proteins derived from latex of C. procera maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 385(5):455–63.
- [Rodríguez-Herva y col., 2012] Rodríguez-Herva, J. J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P., y López-Solanilla, E. (2012). A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular Microbiology*, 14(5):669–681.
- [Satish y col., 2012] Satish, A., Sairam, S., Ahmed, F., y Urooj, A. (2012). Moringa oleifera Lam.: Protease activity against blood coagulation cascade. *Pharmacognosy research*, 4(1):44–9.
- [Shivalingu y col., 2016] Shivalingu, B., Vivek, H., Priya, B., Soujanya, K., y Swamy, S. N.

Bibliografía

- (2016). Purification and characterization of novel fibrin(ogen)olytic protease from Curcuma aromatica Salisb.: Role in hemostasis. *Phytomedicine*, 23(13):1691–1698.
- [Shivaprasad y col., 2009a] Shivaprasad, H., Riyaz, M., Kumar, R. V., Dharmappa, K., Tarannum, S., Siddesha, J., Rajesh, R., y Vishwanath, B. (2009a). Cysteine proteases from the asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 28(3):304–308.
- [Shivaprasad y col., 2010] Shivaprasad, H. V., Rajaiah, R., Frey, B. M., Frey, F. J., y Vishwanath, B. S. (2010). 'Pergularain e I'-a plant cysteine protease with thrombin-like activity from Pergularia extensa latex. *Thrombosis research*, 125(3):e100–5.
- [Shivaprasad y col., 2009b] Shivaprasad, H. V., Rajesh, R., Nanda, B. L., Dharmappa, K. K., y Vishwanath, B. S. (2009b). Thrombin like activity of Asclepias curassavica L. latex: action of cysteine proteases. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1):106–9.
- [Singh y col., 2011] Singh, K. A., Nayak, M. K., Jagannadham, M. V., y Dash, D. (2011). Thrombolytic along with anti-platelet activity of crinumin, a protein constituent of Crinum asiaticum. *Blood cells, molecules & diseases*, 47(2):129–32.
- [Singh y col., 2015] Singh, M. K., Usha, R., Hithayshree, K., y Bindhu, O. (2015). Hemostatic potential of latex proteases from tabernaemontana divaricata (l.) r. br. ex. roem. and schult. and artocarpus altilis (parkinson ex. fa zorn) forsberg. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 39(1):43–49.
- [Siritapetawee y col., 2015] Siritapetawee, J., Sojikul, P., y Klaynongsruang, S. (2015). Plant

Physiology and Biochemistry Biochemical characterization of a new glycosylated protease from Euphorbia cf . lactea latex. *Plant Physiology et Biochemistry*, 92:30–38.

[Siritapetawee y col., 2012] Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P., y Thammasirirak, S. (2012). Biochimica et Biophysica Acta A novel serine protease with human fibrinolytic activities from Artocarpus heterophyllus latex. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1824(7):907–912.

[Versteeg y col., 2013] Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., y Reitsma, P. H. (2013). NEW FUNDAMENTALS IN COAGULATION. pages 327–358.

[Walsh y Ahmad, 2002] Walsh, P. N. y Ahmad, S. S. (2002). Proteases in blood clotting. *Essays in biochemistry*, 38:95–111.

[Wittenbach y col., 1982] Wittenbach, V. A., Lin, W., y Hebert, R. R. (1982). Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant physiology*, 69(1):98–102.

2 Materiales y métodos

2.1. Material biológico

2.1.1. Hojas y tubérculos de papa

Se utilizaron los cultivares de plantas de papa *Solanum tuberosum* L. cv. Pampeana INTA. Los tubérculos de papa y semillas fueron provistos inicialmente por la Estación Experimental Agropecuaria (E.E.A) Balcarce, Argentina, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y de los cuales actualmente el laboratorio cuenta con stock. Las plantas fueron crecidas en macetas conteniendo una mezcla 1:1 de tierra con pinocha y vermiculita a 18 °C con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

2.1.2. Muestras de sangre entera

Las muestras fueron donadas por pacientes sanos con conocimiento informado. Los ensayos con sangre entera y derivados fueron realizados en el Hospital Interzonal General de Agudos (HIGA) Dr. Oscar E. Alende a través de una colaboración con el Laboratorio de Análisis Clínicos de dicho establecimiento y en la Clínica 25 de Mayo a través de una colaboración con

2 Materiales y métodos

la Dra. Diana Noemí García, directora del Laboratorio de Análisis Clínicos de dicha institución.

2.2. Extracción y purificación de StSBTc-3

2.2.1. Aislamiento de Fluido Intersticial (FI)

El fluido intersticial (FI) se extrajo de hojas y tubérculos de plantas de papa cv. Pampeana de acuerdo a lo descripto previamente [Fernández y col., 2015]. Brevemente, el tejido se colocó en buffer de infiltración (Tris-HCl 500 mM pH 8, β -mercaptoetanol 0,1% (v/v), ClNa 3,5% (p/v) y 20 μ l/ 15 ml de Tween 20) y se lo sometió a tres ciclos de 10 s cada uno de vacío, separados por intervalos de 30 s. Posteriormente, el tejido se secó sobre papel secante y se centrifugó en tubos de vidrio a 400 xg y 4 °C por 20 min. El FI recuperado fue cuantificado y utilizado inmediatamente o almacenado a -20 °C.

2.2.2. Purificación de StSBTc-3

La proteasa *StSBTc-3* fue purificada a partir del FI de hojas de papa siguiendo el método previamente descripto por Fernández y col. [Fernández y col., 2015]. Se realizó una separación mediante Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)(GP-250Plus, Pharmacia) en dos etapas. Para la primera separación se utilizó una columna de intercambio aniónico MonoQ HR 5/5 (GE Healthcare, Sweden) a un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente. La elución se llevó a cabo con un gradiente de concentración de NaCl 1M. El eluido obtenido fue separado posteriormente utilizando una columna de exclusión molecular Superosa 12 10/300GL (GE Healthcare, Sweden) a un flujo de 0,5 ml/min. Los perfiles cromatográficos de las distintas

corridas se obtuvieron utilizando un lector de absorbancia UV-Vis (Pharmacia) a 280 nm y un registrador.

2.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método del ácido bicinconílico (BCA) usando seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml como estándar para la curva de calibración. El ensayo de BCA fue inventado por Paul K. Smith en 1985. Tanto el ensayo de BCA como el de Lowry se basan en la conversión del Cu²⁺ a Cu¹⁺ en condiciones alcalinas. Los residuos de cisteína, cistina, tirosina y triptófano reaccionan reduciendo el Cu²⁺ a Cu¹⁺. Luego el Cu¹⁺ forma un complejo coloreado con el BCA que absorbe a 560 nm [Smith y col., 1985].

2.4. Actividad azocaseinolítica

Para determinar la actividad proteolítica de *StSBTc-3* se utilizó como sustrato azocaseína, según el método descripto por [Sarah y col., 1989]. Se incubaron alícuotas la proteasa con 75 μ l de azocaseína 2% (m/v) en un volumen final de 500 μ l en buffer fosfato 100 mM pH 7,5. Cada mezcla se incubó 3 h a 37°C. La reacción se detuvo por agregado de 500 μ l de ácido tricloroacético 10% (v/v). Luego de 15 min de enfriado en hielo, se centrifugó a 5000 rpm y se midió la absorbancia del sobrenadante a 335 nm. Como control positivo se utilizó 1 μ l de tripsina 1 μ g/ μ l y como control negativo se reemplazó la alícuota de *StSBTc-3* por buffer fosfato 100 mM pH 7,5.

2.5. Preparación del Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)

El PPP se obtuvo a partir de sangre entera humana citratada por doble centrifugación a alta velocidad, 2500 xg (aproximadamente 4500 rpm), durante 10 min cada una. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descripto por Sultan (2010).

2.6. Preparación del Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

El PRP fue obtenido de acuerdo a lo descripto por Dhurat [Dhurat y Sukesh, 2014]. Este método consiste en una centrifugación inicial que separa a los glóbulos rojos seguida de una segunda centrifugación para concentrar las plaquetas, las cuales se suspenden en un volumen de plasma final más pequeño. Se realizaron 2 centrifugaciones a partir de sangre entera humana citratada; la primera a 240 xg por 8 min seguida de otra a 700 xg por 17 min, ambas a temperatura ambiente.

2.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas de proteínas fueron realizadas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS), de acuerdo a lo descripto por Laemmli [Laemmli, 1970]. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla conteniendo albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lactoalbúmina (14,2 kDa) (Sigma). Las muestras y los marcadores de peso molecular fueron hervidos durante 5 min en buffer desnaturalizante conteniendo Tris- HCl 60 mM pH 6,8, glicerol

25 %, SDS 2 %, β - mercaptoetanol 14,4 M y azul de bromofenol 0,1 %. Como buffer de corrida se utilizó glicina 190 mM, SDS 0.1 % (p/v) y Tris 25 mM. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120 V durante 90 min. Posteriormente los geles fueron teñidos con Coomasie Brillant Blue R250 coloidal [Neuhoff y col., 1988] y desteñidos con buffer de limpieza (50 % Etanol 96 % v/v, 40 % H₂O, 10 % Ácido Acético) por 24 h.

2.8. Determinación del tiempo de trombina

El ensayo fue realizado de acuerdo a lo descripto por Ignjatovic [Ignjatovic, 2013] usando un coagulómetro automático IL ACL 200, Instrumentation Laboratory (USA) y un kit de tiempo de trombina provisto por Wiener Labs (Argentina) que se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se midió el tiempo de coagulación al agregar trombina y Ca⁺² a la muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP). Alícuotas de 100 μ l de PPP fueron preincubadas con diferentes concentraciones de *StSBTc-3* (de 0 a 1 μ M) durante 2 h a 37 °C.

2.9. Actividad fibrinogenolítica

La actividad fibrinogenolítica fue detectada de acuerdo a lo descripto por Siritapetawee y col. [Siritapetawee y col., 2015] usando una modificación del método propuesto por Satake y col. [Satake y col., 1963]. Para la realización del ensayo, 40 μ l de fibrinógeno humano (10 mg/ml de fibrinógeno en buffer Glicina-NaOH 25 mM, pH 11) fueron incubados con diferentes concentraciones de *StSBTc-3*: 0.2 μ M, 0.4 μ M, 0.75 μ M, 1.5 μ M, 3 μ M. La digestión se realizó a 37 °C durante 2 h. La reacción se detuvo con el agregado de 500 μ l de ácido tricloroacético

2 Materiales y métodos

10 % v/v. Los péptidos liberados por la digestión fueron obtenidos centrifugando las muestras a 10000 rpm por 20 min. La concentración de péptidos en el sobrenadante fue medida utilizando el método del BCA descripto anteriormente. Para el blanco se utilizó la mezcla de reacción sin la enzima. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar la absorbancia en 0.01 a 540 nm a 37 °C.

2.10. Actividad fibrinogenolítica subunidad específica

La degradación de las cadenas del heterotrímetro de fibrinógeno por *StSBTc-3* se analizó por SDS-PAGE usando el método descripto por Rajesh (Rajesh et al. 2005) con algunas modificaciones. Se obtuvo la fracción de euglobulinas (fracción enriquecida en fibrinógeno) a partir de PPP, de acuerdo a lo descripto por Zamora González [Zamora-González, 2012]. Posteriormente, 40 μ l de la fracción de euglobulinas se incubaron con distintas concentraciones de *StSBTc-3* (de 0 μ M a 2 μ M) a 37 °C por 2 h. La reacción fue detenida por el agregado de buffer de muestra conteniendo urea 1 M, SDS 4 % (p/v) y β -mercaptoetanol 4 %. Las muestras fueron posteriormente calentadas a 100 °C por 5 min y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15 % de acuerdo a lo descripto en la sección 2.7. Posteriormente, se analizó el porcentaje de degradación de cada subunidad por medio de densitometrías correspondientes a cada una de las bandas del fibrinógeno utilizando el software Image J [Schneider y col., 2012].

2.11. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

El pH óptimo de *StSBTc-3* se determinó variando el pH de la mezcla de reacción entre 3 y 12. Los buffers utilizados fueron: acetato de sodio 25 mM (pH 3–5), fosfato de sodio 25 mM (pH 6–7), Tris-HCl 25 mM (pH 8–9), y glicina-NaOH 25 mM (pH 10–12). La actividad fibrinogenolítica fue medida de acuerdo a lo descripto en la sección 2.9. Para la determinación de la temperatura óptima de *StSBTc-3* se utilizó un rango de temperaturas desde 10 °C hasta 95 °C. La actividad enzimática se midió según lo descripto en la sección 2.9. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.12. Determinación de la actividad fibrinolítica por disolución del coágulo de fibrina

La actividad fibrinolítica de *StSBTc-3* fue determinada por medio del descenso en la turbidez del polímero de fibrina causado por *StSBTc-3*. El ensayo fue llevado a cabo en una placa de ELISA de 96 pocillos. Para realizar las lecturas se utilizó un lector de microplacas automático ELx800 (BioTek Instruments) a una longitud de onda de 350 nm. El ensayo fue preparado de acuerdo a lo descripto por Choi [Choi y col., 2013] utilizando diferentes concentraciones de *StSBTc-3*.

2.13. Ensayo de hemólisis

A partir de muestras de sangre de pacientes sanos se obtuvo la fracción correspondiente a glóbulos rojos humanos, los cuales fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS), centrifugados por 10 min a 800 rpm y posteriormente resuspendidos en PBS a una concentración final de eritrocitos de 4 % v/v. 100 μ l de la suspensión de glóbulos rojos fueron incubados con distintas concentraciones de *StSBTc-3* en PBS : 0,2 μ M; 0,5 μ M; 0,8 μ M; 1 μ M. El control de hemólisis negativa consistió en glóbulos rojos resuspendidos en PBS mientras que el control positivo consistió en glóbulos rojos incubados con Tritón X-100. Se incubaron las mezclas de reacción a 37 °C por 1 h. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 800 xg por 10 min. La liberación de hemoglobina al sobrenadante fue determinada midiendo la absorbancia del mismo a 550 nm.

2.14. Preparación de plaquetas humanas

Las preparaciones y ensayos con plaquetas humanas fueron realizados en el Laboratorio especializado en el estudio de metabolismo plaquetario del Dr. Wally Whiteheart en la *University of Kentucky* (Lexington, Kentucky, EEUU) en el marco de una beca del tipo de estadías cortas de investigación financiada por Becar-Fulbright.

Se extrajo sangre entera de donantes sanos con consentimiento informado utilizando tubos de recolección con ácido cítrico/citrato dextrosa (ACD) (BD Biosciences). La sangre entera se diluyó en buffer HEPES Tyrode (pH 6.5) 1:1 en presencia de 0.2 U/ml de apirasa y 10 ng/ml de prostaciclinina (PGI₂). Después de la centrifugación a 215 x g durante 20 min a temperatura am-

biente, se recogió el sobrenadante (plasma rico en plaquetas (PRP)). Para eliminar los glóbulos rojos residuales y los glóbulos blancos, se sometió el PRP a centrifugación a 155 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Las plaquetas se recuperaron del PRP resultante mediante centrifugación a 750 x g durante 13 min a temperatura ambiente y luego se suspendieron en buffer HEPES Tyrode (pH 6.5) en presencia de 0.2 U/ml de apirasa, 10 ng/ml de PGI₂ y 1 mM de EDTA. Las suspensiones de plaquetas se sometieron nuevamente a centrifugación a 750 x g durante 13 min a temperatura ambiente y el sedimento resultante se resuspendió en buffer HEPES Tyrode (pH 7,4) suplementado con CaCl₂ 1 mM. La concentración de plaquetas se determinó mediante el uso del contador Z2 (Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) y se ajustaron a 4 x10⁸ /ml con buffer HEPES Tyrode (pH 7,4) a menos que se indique lo contrario. Las plaquetas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min antes de su uso.

2.15. Agregación plaquetaria

Se prepararon plaquetas lavadas en el momento y su concentración se ajustó a la deseada con buffer HEPES Tyrodes (pH 7,4) conteniendo CaCl₂ 1 mM. Las suspensiones de plaquetas (250 o 500 μ l) se calentaron a 37 °C en una cubeta de vidrio siliconado (Chrono-log, Havertown, PA) bajo condiciones de agitación (1200 rpm) durante 2-3 min en un Lumi-agregómetro modelo 460Vs (Chrono-log). Luego del tratamiento previo con los reactivos indicados, las plaquetas se estimularon con distintos agonistas para iniciar la agregación plaquetaria. Se utilizaron trombina 0,5 U/ml, A23187 2 μ M, convulxina 0,5 U/ml y colágeno 5 mg/ml como inductores de la agregación. Se utilizó una interfaz de computadora Aggro/Link modelo 810 y el software Aggro/Link (Chrono-log) para monitorear la agregación plaquetaria. La línea de base fue

2 Materiales y métodos

establecida con buffer HEPES Tyrodes (pH 7,4). Los gráficos de agregación plaquetaria se procesaron y ensamblaron utilizando el software libre GIMP (*GNU Image Manipulation Program*).

2.16. Retracción del coágulo

Se procedió según lo descripto por Osdoit et al. [Osdoit y Rosa, 2001]. Se utilizó trombina (0,05 U/ml) para estimular la formación de coágulos y la retracción en plaquetas lavadas (500 μ l; 3×10^8 /ml) suplementadas con CaCl₂ 1 mM en presencia de fibrinógeno humano (0,5 mg/ml; Sigma) . Las imágenes se tomaron a tiempos crecientes y los tamaños de los coágulos se midieron utilizando el software ImageJ (v1.48, NIH) [Schneider y col., 2012]. El porcentaje del tamaño de los coágulos en relación con los volúmenes de suspensión inicial se determinaron y analizaron utilizando R [R Core Team, 2014].

2.17. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm SD. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas utilizando ANOVA y test de t. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el entorno de trabajo R [R Core Team, 2014].

2.17.1. Optimización de la actividad fibrinogenolítica

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) [Lenth y col., 2009] para optimizar las condiciones de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* *in vitro*. Se realizaron ensayos a diferentes pH, temperaturas y concentración de *StSBTc-3* y se midió la actividad fibrinogenolítica

para determinar las condiciones óptimas de la enzima.

Se aplicó un diseño factorial de Box-Behnken de 3 factores a 3 niveles. El diseño consistió en 12 experimentos más 3 correspondientes al centro del dominio experimental. Las 3 variables estudiadas fueron la temperatura, el pH y la concentración de enzima. Los rangos asignados para cada variable se indican en la Tabla 2.1. Los mismos fueron seleccionados en base a los resultados obtenidos durante la caracterización bioquímica de *StSBTc-3*.

El diseño resultante se muestra en la Tabla 2.1. Los tres niveles asignados para cada factor X_j están representados por los niveles codificados: -1 para el valor más bajo, 0 para el valor medio y +1 para el valor superior. El experimento correspondiente al centro del dominio experimental se llevó a cabo por triplicado según las condiciones indicadas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Niveles de factores codificados para un diseño de Box-Behnken correspondiente a un sistema de 3 variables.

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

2.18. Extracción de ARN de hojas de *Solanum tuberosum*

Hojas recolectadas de plantas de *Solanum tuberosum* fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente se realizó la extracción de ARN con trizol según Chomczynsky y col. ([Chomczynski, 1993]).

2.19. Extracción de ADN de tubérculos de *Solanum*

tuberosum

Se extrajo ADN genómico de tubérculos de papa según Kumari y col. ([Kumari y col., 2012]). 2 a 3 g de material vegetal (previamente lavado con agua de canilla y luego destilada) fue pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero. Posteriormente se transfirió a un frasco contenido 15 ml de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 50 mM pH 8.0, NaCl 250 mM, sacarosa 15 % p/v) y se mezcló vigorosamente, se incubó en hielo por 20 min y luego se centrifugó a 4000 g y 4 °C por 30 min. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10000 g y 4 °C por 15 min. El ADN crudo fue lavado 2 veces con etanol frío (70 % v/v), luego secado al aire y resuspendido en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0)

2.20. Clonado y expresión en un sistema heterólogo

2.20.1. Clonado en *E. coli*

Se amplificó la porción del gen codificador de *StSBTc-3* (PGSC0003DMT400027148) mediante PCR utilizando ADN genómico extraído de tubérculos de *Solanum tuberosum* como templado. Para la amplificación se utilizaron los primers PF1: 5'-GCCCATATGGTTGAAGCTCACACAACTCATACC-3' y PR1: 5'-GCAGGATCCTCAGGTCCAGGCATCAAG-3' (PF1 primer *forward* y PR1 primer *reverse* respectivamente). El primer *forward* introduce un sitio de restricción NdeI y el *reverse* introduce un sitio de restricción BAMH1, permitiendo la clonación directa en el vector de clonado y expresión pProEx HtB (QUIAGEN) (Figura 2.1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl contenido 2,5 µM de cada primer (ThermoFisher); MgCl₂ (Promega) 1,5 mM; dNTPs (Invitrogen) 0,2 mM; Buffer Taq polimerasa (Promega) 1x y Taq polimerasa (Promega) 2,5 U. Las condiciones del termociclador fueron:

- 7 min a 94 °C (1 ciclo);
- 1 min a 94 °C; 30 s a 60 °C; 2 min a 72 °C (25 ciclos);
- 10 min a 72 °C.

El producto de PCR obtenido fue purificado utilizando un Kit de Miniprep (QUIAGEN), clonado dentro del vector de expresión pProEx-HTb y transformado dentro de células competentes *E. coli* Rosetta (DE3) (Merk Millipore). La selección de las colonias transformadas se realizó mediante crecimiento de las mismas en ágar Luria-Bertani (LB) (Bactopeptona 1%

2 Materiales y métodos

m/v, Extracto de levadura 0,5 % m/v , NaCl 1 % p/v y Bactoágar 1,2 % m/v) suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml y cloranfenicol 0,035 mg/ml. La presencia de la secuencia en las colonias transformadas fue confirmada analizando el patrón de restricción del ADN plasmídico purificado de las mismas. La purificación de los productos de PCR y del ADN plasmídico se realizó según las especificaciones del fabricante (QUIAGEN). La secuencia obtenida fue verificada por secuenciación de ADN.

La porción del gen codificador del dominio peptidasa de *StSBTc-3* fue amplificada utilizando el clon anterior como templado. Para la amplificación se utilizaron los primers PF1: 5'-GCCCATATGGTTGAAGCTCACACAACTCATAACC-3' y PR2: 5'-GCAGGATCCTAGTTGGCAGTGGTCATCAT-3' (PF1 primer *forward* y PR2 primer *reverse* respectivamente). El primer *forward* introduce un sitio de restricción NdeI y el *reverse* introduce un sitio de restricción BAMH1. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2,5 μ M de cada primer (ThermoFisher); MgCl₂ (Promega) 1,5 mM; dNTPs (Invitrogen) 0,2 mM; Buffer Taq polimerasa (Promega) 1x y Taq polimerasa (Promega) 2,5 U. Las condiciones del termociclador fueron:

- 7 min a 94 °C (1 ciclo);
- 1 min a 94 °C; 30 s a 60 °C; 2 min a 72 °C (25 ciclos);
- 10 min a 72 °C.

El producto de PCR obtenido fue purificado utilizando un Kit de Miniprep (QUIAGEN), subclonado dentro de los vectores de expresión pGEX-KG (QUIAGEN) y pProEx-HTb (QUIAGEN) (Figura 2.1) y transformado dentro de células competentes *E. coli* Rosetta (DE3) (Merk

Millipore). La selección de las colonias transformadas se realizó mediante el crecimiento de las mismas en ágar LB suplementado con ampicilina 0.1 mg/ml y cloranfenicol 0,035 mg/ml. Las colonias seleccionadas fueron confirmadas analizando el patrón de restricción del ADN plasmídico purificado de las mismas. La purificación de los productos de PCR y del ADN plasmídico se realizó según las especificaciones del fabricante (QUIAGEN).

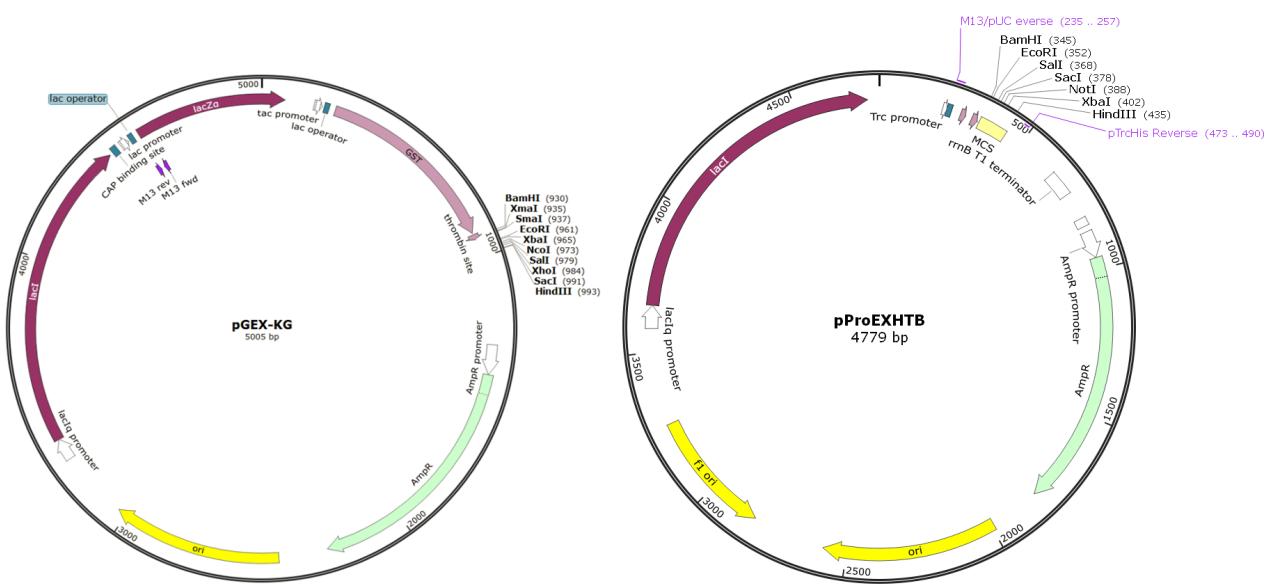


Figura 2.1: Diagrama de los plásmidos de expresión pGEX-KG y pProEx-HTb. Ori, origen de replicación; AmpR, gen de resistencia a ampicilina.

2.20.2. Expresión y purificación

Los plásmidos recombinantes obtenidos fueron transformados en *E. coli* Rosetta (DE3) (Merk Millipore). *StSBTc-3* recombinante y el dominio proteasa fueron expresados como proteína fusión acoplada con His₆-tag (QIAGEN). El dominio de proteasa también fue expresado acompañado a glutatión s-transferasa (GST). Los cultivos de bacterias fueron crecidos a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 35 µg/ml hasta alcanzar

2 Materiales y métodos

una densidad óptica (OD) de 0,6. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 1 mM final. Luego de 4 hs a 37 °C las células fueron cosechadas por centrifugación (4 °C, 500 xg, 10 min), resuspendidas en buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 25 mM; Tween 20 0,05 % v/v, pH 8) e incubadas con lisozima 100 µg/ml durante 30 min en hielo. Los lisados de bacterias fueron sonicados mediante 5 pulsos de 30 s al máximo nivel de potencia (High Intensity Ultrasonic Processor, 50 W model, USA) en hielo. La fracción soluble del lisado fue separada de la insoluble mediante centrifugación a 12000 xg durante 10 min a 4 °C. Las proteínas de ambas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y teñidas con Coomasie Coloidal G-250 (Bio-Rad). Para la purificación de las proteínas fusionadas a His₆-tag se utilizó cromatografía de afinidad (ión Ni²⁺) con una columna de ácido nitrilotriacético (NTA) bajo condiciones nativas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QUIAGEN). Se mezclaron 5 ml del sobrenadante (luego de la centrifugación a 12000 xg) con 1,5 ml de matriz Ni-NTA. Se agitó la suspensión en un agitador por 1 h a temperatura ambiente y se llenó una columna plástica con la misma. Las proteínas no unidas a la matriz fueron recuperadas lavando con 15 ml de buffer NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 25 mM a pH 8. Las proteínas unidas a la matriz fueron eluidas con el buffer anterior supplementado con Imidazol 50 mM. La pureza de las proteínas recombinantes obtenidas fue evaluada por SDS-PAGE 12 %.

2.20.3. Disolución de cuerpos de inclusión y refoldeo

Para los casos en los que las proteínas recombinantes obtenidas no pudieron ser recuperadas de la fracción soluble del lisado, los cuerpos de inclusión fueron redissueltos en solución de urea 8M según lo descripto por Santos y col. [Santos y col., 2012]. Brevemente, los cuerpos de

inclusión fueron lavados 3 veces mediante sonicación con buffer A (Tris-HCl 50 mM y NaCl 300 mM pH 8) conteniendo urea 1M y luego se centrifugaron a 27000 xg por 40 min a 4 °C. Los cuerpos de inclusión obtenidos a partir del último lavado fueron redissueltos adicionando solución de urea 8M hasta obtención de una solución transparente. Para el refoldeado se realizaron 3 diálsis consecutivas en relación 1:100 contra buffer A con concentraciones decrecientes de Urea (4, 2 y 0 M respectivamente).

2.21. Análisis filogenético

El análisis fue realizado en la plataforma Phylogeny.fr [Dereeper y col., 2010, Dereeper y col., 2008]. Las secuencias fueron alineadas con MUSCLE (v3.8.31) configurado con la máxima precisión (valores por defecto) [Edgar, 2004]. Luego del alineamiento las regiones ambiguas (que contienen huecos o con un alineamiento pobre) fueron removidas con Gblocks (v0.91b) usando los siguientes parámetros [Guindon y Gascuel, 2003]:

- Largo mínimo final del bloque luego de remover los huecos: 10;
- No se permiten huecos al final del alineamiento;
- Todos los segmentos con regiones no conservadas mayores a 8 son rechazados;
- Mínimo número de secuencias para una posición aledaña: 85 %.

El árbol filogenético fue construido usando el método de máxima similitud implementado en el programa PhyML (v3.1/3.0 aLRT) [Anisimova y Gascuel, 2006, Guindon y Gascuel, 2003]. El modelo de sustitución WAG fue seleccionado asumiendo una proporción estimada de sitios

2 Materiales y métodos

invariantes y 4 categorías gamma distribuidas respecto a la relación de heterogeneidad entre sitios. El parámetro gamma fue estimado directamente de los datos ($\text{gamma}=1.073$). El intervalo de confianza para las ramas internas fue evaluado usando el test aLRT (SH-Like). La representación gráfica y la edición del árbol filogenético fue realizada con TreeDyn (v198.3) [Chevenet y col., 2006].

Bibliografía

[Anisimova y Gascuel, 2006] Anisimova, M. y Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology*, 55(4):539–552.

[Chevenet y col., 2006] Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A.-L., Jacq, B., y Christen, R. (2006). Treedyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC bioinformatics*, 7(1):439.

[Choi y col., 2013] Choi, J.-H., Sapkota, K., Park, S.-E., Kim, S., y Kim, S.-J. (2013). Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from codium fragile. *Biochimie*, 95(6):1266–1277.

[Chomczynski, 1993] Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of rna, dna and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532–4.

[Dereeper y col., 2010] Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., y Blanc, G. (2010). Blast-explorer helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology*, 10(1):8.

Bibliografía

- [Dereeper y col., 2008] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., y col. (2008). Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2):W465–W469.
- [Dhurat y Sukesh, 2014] Dhurat, R. y Sukesh, M. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 7(4):189.
- [Edgar, 2004] Edgar, R. C. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5):1792–1797.
- [Fernández y col., 2015] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a solanum tuberosum subtilisin-like protein with caspase-3 activity (stsbtc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86:137–146.
- [Guindon y Gascuel, 2003] Guindon, S. y Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, 52(5):696–704.
- [Ignjatovic, 2013] Ignjatovic, V. (2013). Thrombin clotting time. In *Haemostasis*, pages 131–138. Springer.
- [Kumari y col., 2012] Kumari, V., Bansal, A., Aminedi, R., Taneja, D., y Das, N. (2012). Simplified extraction of good quality genomic dna from a variety of plant materials. *African journal of biotechnology*, 11(24):6420–6427.

- [Laemmli, 1970] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *nature*, 227(5259):680.
- [Lenth y col., 2009] Lenth, R. V. y col. (2009). Response-surface methods in r, using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7):1–17.
- [Neuhoff y col., 1988] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., y Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue g-250 and r-250. *Electrophoresis*, 9(6):255–262.
- [Osdoit y Rosa, 2001] Osdoit, S. y Rosa, J.-P. (2001). Fibrin clot retraction by human platelets correlates with α iib β 3integrin-dependent protein tyrosine dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9):6703–6710.
- [R Core Team, 2014] R Core Team (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [Santos y col., 2012] Santos, C. A., Beloti, L. L., Toledo, M. A., Crucello, A., Favaro, M. T., Mendes, J. S., Santiago, A. S., Azzoni, A. R., y Souza, A. P. (2012). A novel protein refolding protocol for the solubilization and purification of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein from xylella fastidiosa overexpressed in escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 82(2):284–289.
- [Sarah y col., 1989] Sarah, G., De La Motte, R., y Wagner, F. (1989). Proteolytic enzymes: a practical approach. *Oxford UK*, 25.

Bibliografía

[Satake y col., 1963] Satake, M., Murata, Y., y Susuki, T. (1963). Studies on snake venom.

The Journal of Biochemistry, 53(6):438–447.

[Schneider y col., 2012] Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671.

[Siripetawee y col., 2015] Siripetawee, J., Sojikul, P., y Klaynongsruang, S. (2015). Biochemical characterization of a new glycosylated protease from euphorbia cf. lactea latex. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92:30–38.

[Smith y col., 1985] Smith, P. e., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., y Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85.

[Zamora-González, 2012] Zamora-González, Y. (2012). Pruebas del coagulograma y componentes de la hemostasia. utilidad para diagnosticar las diátesis hemorrágicas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 28(2):141–150.

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de StSBTc-3

3.1. Introducción

La capacidad del cuerpo para controlar el flujo sanguíneo después de una lesión vascular es fundamental para la supervivencia del organismo. El proceso de coagulación de la sangre y la posterior disolución del coágulo, luego de la reparación del tejido lesionado, se denomina **hemostasia** [Mann y col., 2003]. La misma comprende cuatro eventos principales que ocurren en un orden establecido después de la pérdida de la integridad vascular. La fase inicial del proceso es la **constricción vascular** que limita el flujo de sangre al área de la lesión. A continuación, las plaquetas se activan y se agregan en el sitio de la injuria, formando un tapón temporal de plaquetas. En esta etapa, la proteína denominada **fibrinógeno** es la principal responsable de permitir la **agregación plaquetaria**. El fibrinógeno es un dímero compuesto por tres pares de cadenas polipeptídicas α , β y γ , con un peso molecular de 64, 57 y 48 kDa respectivamente [Marder y col., 1969]. Las plaquetas se agrupan al unirse al colágeno que se

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de StSBTc-3

expone posteriormente a la ruptura del revestimiento endotelial de los vasos sanguíneos. Tras la **activación**, las plaquetas liberan ADP y tromboxano A2 (TXA2) (ambos extienden la agregación activando plaquetas adicionales), serotonina, fosfolípidos, lipoproteínas y otras proteínas importantes para la cascada de coagulación. Además de la secreción inducida, las plaquetas activadas cambian de forma para adaptarse a la formación del tapón. La estabilidad final del tapón plaquetario, se logra mediante la formación de una malla de fibrina que consolida el **coágulo**. Este proceso se conoce como **coagulación**. Finalmente, el coágulo debe disolverse para que el flujo sanguíneo normal se reanude después de la reparación de los tejidos. La disolución del coágulo se produce por acción de la plasmina y es conocido como **fibrinólisis** [Hoffman y Pawlinski, 2014]. Por lo general, el proceso de coagulación se encuentra bajo el control inhibitorio de varios inhibidores que limitan la coagulación, evitando así la propagación del trombo. Este delicado equilibrio se interrumpe cuando aumenta la actividad de los factores de coagulación, o disminuye la actividad de los inhibidores naturales [Previtali y col., 2011]. A continuación se detallan las etapas que constituyen la hemostasia.

3.1.1. Hemostasia primaria

La hemostasia primaria resulta de interacciones complejas entre las plaquetas, la pared del vaso sanguíneo y las proteínas de adhesión que conducen a la formación del tapón plaquetario inicial. Las células endoteliales que recubren la pared vascular exhiben propiedades antitrombóticas debidas a múltiples factores, a saber: glicosaminoglicanos como heparina con carga negativa, fosfolípidos neutros, síntesis y secreción de inhibidores plaquetarios, inhibidores de la coagulación y activadores de la fibrinólisis. En contraste, la capa subendotelial es altamente

trombogénica y contiene colágeno, factor de Von Willebrand (vWF) y otras proteínas como laminina, trombospondina y vitronectina que están involucradas en la adhesión plaquetaria. La injuria vascular produce vasoconstricción, mediada por mecanismos neurogénicos reflejos y la liberación de mediadores locales como la endotelina y el TXA2 derivado de plaquetas [Triplett, 2000]. Cuando se produce una injuria en el endotelio los componentes del subendotelio pueden activar a las plaquetas por distintos mecanismos e inducir su agregación [Lasne y col., 2006]. Estos mecanismos serán descriptos con mayor detalle en el Capítulo 3, donde se aborda el estudio del efecto de *StSBTc-3* sobre la agregación plaquetaria.

3.1.2. Cascada de coagulación

Las proteínas de coagulación son los componentes centrales del sistema de coagulación que conducen a una compleja red de reacciones, finalizando en la conversión de fibrinógeno soluble en hebras de fibrina insoluble. La cascada de coagulación se ha dividido tradicionalmente para su estudio en la vía intrínseca y la extrínseca, las cuales convergen en la vía final común (Figura 3.1). Esta última consiste en la activación del factor X que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina [Bombeli y Spahn, 2004]. Aunque la teoría clásica de la coagulación sanguínea no logra incorporar el papel central de las superficies basadas en células en el proceso de coagulación *in vivo*, es particularmente útil para comprender las pruebas de coagulación *in vitro*.

Vía extrínseca

Se considera como el primer paso en la hemostasia mediada por plasma. Se activa mediante el Factor Tisular (FT), que se expresa en el tejido subendotelial [Lasne y col., 2006]. En

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de StSBTc-3

condiciones fisiológicas normales, el endotelio vascular normal minimiza el contacto entre el FT y los procoagulantes plasmáticos. Las lesiones vasculares exponen el FT que se une con el factor VIIa y el calcio para promover la activación del factor X en Xa [Owens III y Mackman, 2010].

Vía intrínseca

Es una vía paralela para la activación de la trombina. Comienza con el factor XII, kininógenos de alto peso molecular y prekalicreína, lo que resulta en la activación del factor XI. El factor XI activado genera la activación del factor IX, que luego actúa con su cofactor (factor VIII) para formar el complejo tenasa en una superficie de fosfolípidos que finalmente activa el factor X en Xa [Hall, 2015, Kim, 2015].

Vía final común

El factor Xa junto con su cofactor (factor V), fosfolípidos tisulares, fosfolípidos plaquetarios y calcio forman el complejo protrombinasa que convierte la protrombina en trombina. Esta trombina escinde al fibrinógeno circulante, lo convierte en fibrina insoluble y activa al factor XIII, que reticula covalentemente los polímeros de fibrina incorporados en el tapón plaquetario. Esto crea una red de fibrina que estabiliza el coágulo y forma un tapón hemostático secundario definitivo [Hall, 2015, Kim, 2015].

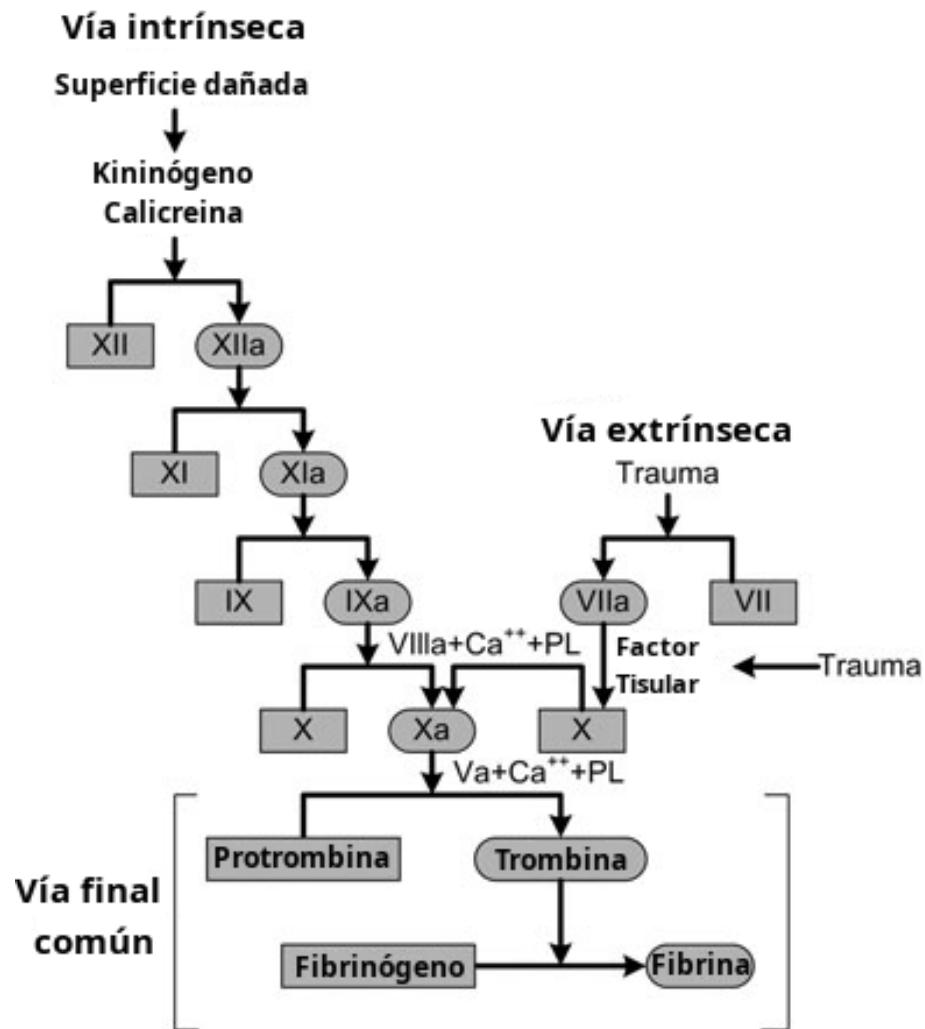


Figura 3.1: Diagrama de la cascada de coagulación. En el esquema se muestran la vía intrínseca, la extrínseca y la vía final común de acuerdo al modelo de cascada de coagulación descripto [Adams y Bird, 2009].

3.1.3. Fibrinólisis

El sistema fibrinolítico es un sistema paralelo que se activa junto con la cascada de coagulación y sirve para limitar el tamaño del coágulo. La fibrinólisis es un proceso enzimático que consiste en la disolución del coágulo de fibrina en productos de degradación. Se encuentra mediado por plasmina originada a partir del plasminógeno unido a fibrina en el hígado. Esta

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de StSBTc-3

reacción es catalizada por el activador tisular de plasminógeno (t-PA) o uroquinasa (u-PA) liberados desde el endotelio vascular. La liberación de t-PA es estimulada por oclusión tisular, trombina, epinefrina, vasopresina y ejercicio vigoroso. Dado que la plasmina tiene el potencial de degradar al fibrinógeno y ocasionar consecuencias perjudiciales, la actividad fibrinolítica está limitada por factores como el inhibidor del activador del plasminógeno, que actúa inhibiendo irreparablemente el t-PA y el u-PA y por inhibidores de la plasmina como la antiplasmina $\alpha 2$ y la $\alpha 2$ -macroglobulina [Ezihe-Ejiofor y Hutchinson, 2013, Cesarman-Maus y Hajjar, 2005].

Las proteasas cumplen un rol fundamental en el correcto funcionamiento de estos procesos [Turk, 2006, López-Otín y Bond, 2008, Nicholl y col., 2006]. Existe un delicado balance entre la formación del tapón plaquetario, la cascada de coagulación y la redisolución del coágulo de fibrina. La desregulación de este balance, provoca la aparición de trastornos de la hemostasia, enfermedades relacionadas con los vasos sanguíneos e inflamación crónica [Flemmig y Melzig, 2012].

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar la actividad de *StSBTc-3* en relación con la hemostasia, estudiando su efecto sobre la agregación plaquetaria y la coagulación, y su actividad fibrino(geno)lítica.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

El proceso de agregación plaquetaria finaliza con la retracción del coágulo. Las plaquetas tensionan los filamentos de fibrina para consolidar el tapón hemostático y permitir así el flujo normal de sangre [Feghhi y Sniadecki, 2011]. Para que el coágulo se retraiga se requiere tanto de plaquetas como de fibrina. Las plaquetas anclan la fibrina a su superficie y los motores intracelulares actúan contrayendo las fibras de fibrina polimerizadas. Además, se sabe que la integrina $\alpha 2\beta 3$ presente en la membrana de las plaquetas es necesaria para la retracción del coágulo, ya que los pacientes con trombastenia de Glanzmann, que carecen del receptor, presentan una retracción defectuosa del mismo [Munday y López, 2013].

Con el fin de evaluar la función plaquetaria en presencia de *StSBTc-3* se estudió la retracción del coágulo *in vitro* en presencia y ausencia de la proteasa. Para ello se incubaron plaquetas lavadas humanas con CaCl_2 , fibrinógeno y trombina en buffer HEPES (CaCl_2 1mM, pH 7.4) en presencia y ausencia de *StSBTc-3* a distintos tiempos (0, 60, 90, 120 y 150 min), según lo descripto en Materiales y Métodos. El efecto de la proteasa se determinó mediante la cuantificación del volumen del coágulo formado relativo al volumen de suspensión inicial. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2.

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

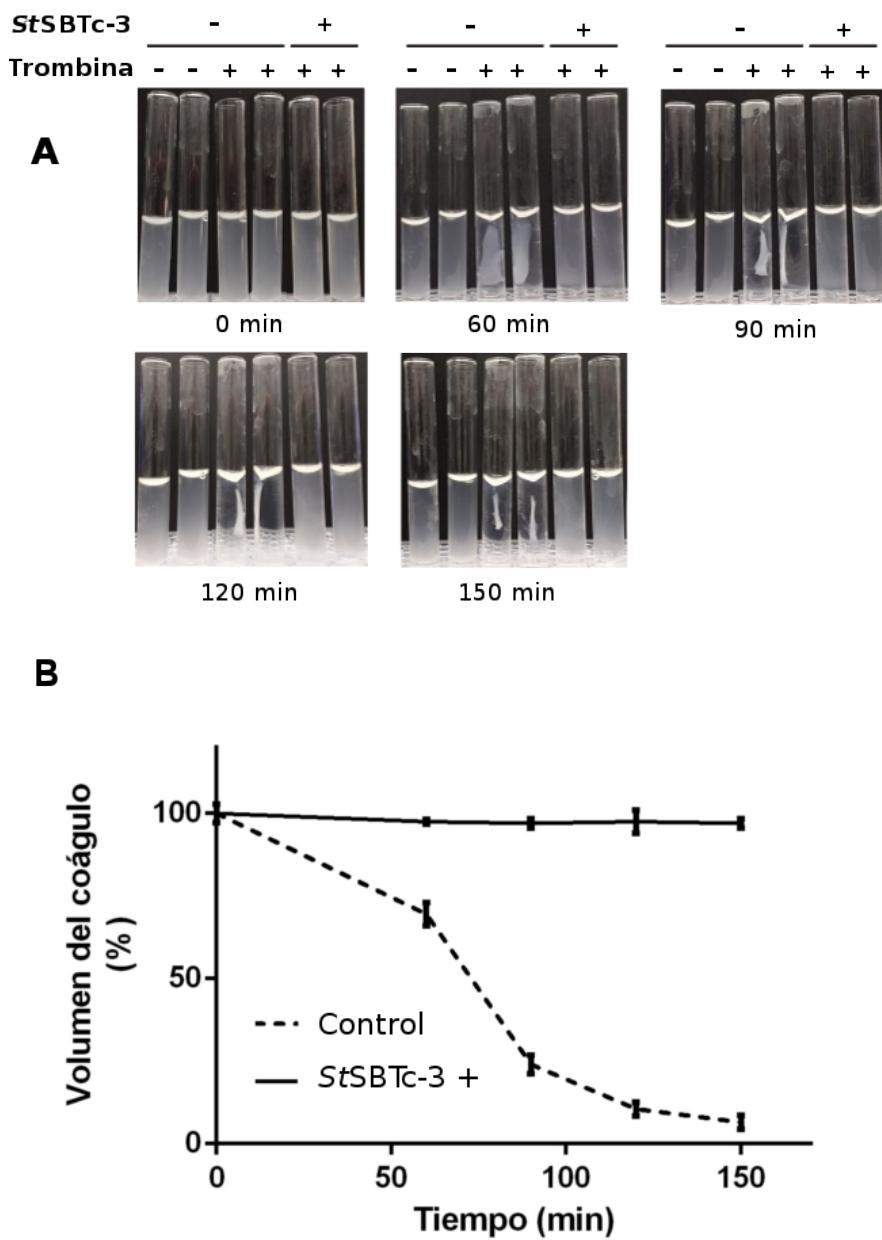


Figura 3.2: Determinación del efecto de *StSBTc-3* sobre la retracción del coágulo. Se incubaron plaquetas humanas lavadas ($3 \times 10^8/\text{ml}$) con *StSBTc-3* $0,5 \mu\text{M}$ durante 1 h. Luego se suplementaron las muestras con $0,5 \text{ mg/ml}$ de fibrinógeno humano y 1 mM de CaCl_2 . Se inició la retracción del coágulo con trombina ($0,1 \text{ U/ml}$), se tomaron imágenes (A) y se midió el volumen del coágulo (B) a los tiempos indicados (0, 60, 90, 120 y 150 min). Como control de la función plaquetaria normal se utilizaron plaquetas lavadas sin incubar con *StSBTc-3*. El tamaño del coágulo fue medido utilizando el programa Image J v1.50i [Schneider y col., 2012]. Los valores se normalizaron en relación con el tamaño del coágulo a tiempo cero. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Como se puede observar, *StSBTc-3* inhibió la formación del coágulo de fibrina, registrándose ausencia completa de retracción del coágulo a todos los tiempos ensayados, pudiéndose comparar el efecto con el reportado para la droga blebistatina, capaz de inhibir la retracción del coágulo a tiempos similares [Samson y col., 2017].

La agregación plaquetaria es un proceso complejo que puede iniciarse por diversas vías. Todas ellas involucran la unión de determinadas moléculas (agonistas) a receptores específicos en la membrana de las plaquetas. Estas interacciones inician una cascada de señalización que finaliza en la formación de puentes de fibrinógeno entre las plaquetas, permitiendo su agregación [Watson, 2009]. Dado que el ensayo de retracción del coágulo sólo permite evaluar el efecto de *StSBTc-3* sobre la función plaquetaria general pero no sobre el posible mecanismo de acción, en el Capítulo 5 se continuará con la caracterización de la actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3* en mayor profundidad.

3.2.2. Actividad anticoagulante de *StSBTc-3*

Con el fin de analizar el efecto de *StSBTc-3* sobre la coagulación se procedió a evaluar el tiempo de trombina (TT) de PPP proveniente de un *pool de plasmas normales* (correspondientes a pacientes sanos) en presencia o ausencia de *StSBTc-3*. El TT es una prueba de coagulación que evalúa la vía final común de la coagulación, es decir la conversión de fibrinógeno en fibrina mediada por trombina [Attard y col., 2013].

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

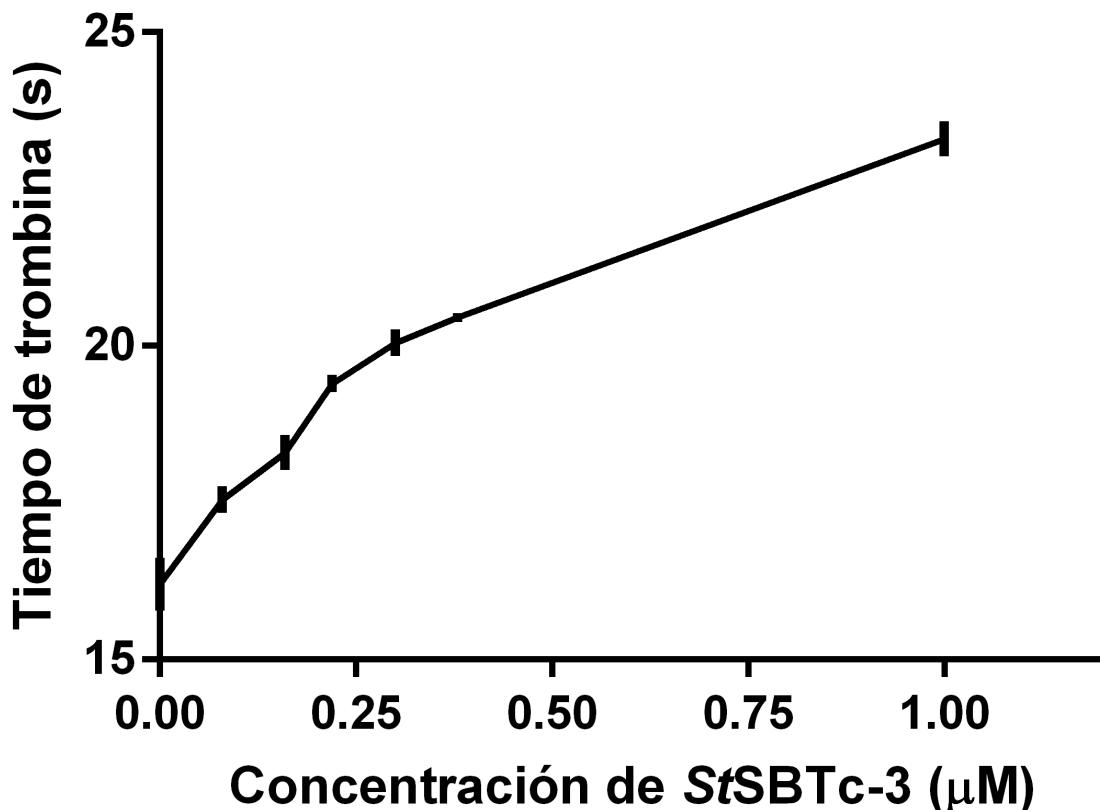


Figura 3.3: Determinación del TT en presencia de *StSBTc-3*. PPP fue incubado por 2 h a 37°C con diferentes concentraciones de *StSBTc-3*: 0 μM ; 0.08 μM ; 0.16 μM ; 0.22 μM ; 0.30 μM ; 0.38 μM ; 1 μM . Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos mostraron que *StSBTc-3* incrementa el TT del PPP de manera dosis dependiente (Figura 3.3). Como se puede observar en la Figura 3.3, concentraciones de *StSBTc-3* menores a 1 μM produjeron un incremento en el tiempo de trombina de un 40 % respecto del control. Este aumento resultó significativo y fue comparable al producido por otras serín proteasas de origen vegetal [Siritapetawee y col., 2012, Siritapetawee y col., 2015]. Al adicionar trombina se evalúa la conversión de fibrinógeno en fibrina (vía final común) omitiendo los pasos previos de la cascada de coagulación (Figura 3.1). Por este motivo, el hecho de que la medida

del TT se vea afectada puede deberse a diversos factores como deficiencias en el fibrinógeno o una disminución en la concentración del mismo [Attard y col., 2013]. El resultado obtenido podría explicarse debido a la posible actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*.

3.2.3. Actividad fibrinogenolítica y fibrinolítica de *StSBTc-3*

Con el objetivo de determinar si *StSBTc-3* es capaz de degradar al heterotrímero de fibrinógeno se analizó la actividad fibrinogenolítica subunidad específica según lo descripto en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.4. *StSBTc-3* fue capaz de degradar las tres cadenas de fibrinógeno (α ; β y γ) a todas las concentraciones ensayadas de manera dosis dependiente a partir de 0,8 μM de *StSBTc-3*. Este resultado es consistente con los previamente reportados para otras serín proteasas de origen vegetal con actividad fibrinolítica [Siritapetawee y col., 2012, Choi y col., 2014]. Las concentraciones de *StSBTc-3* son del mismo orden de magnitud que las reportadas para AMP48 aislada del latex de *Artocarpus heterophyllus* [Siritapetawee y col., 2012].

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

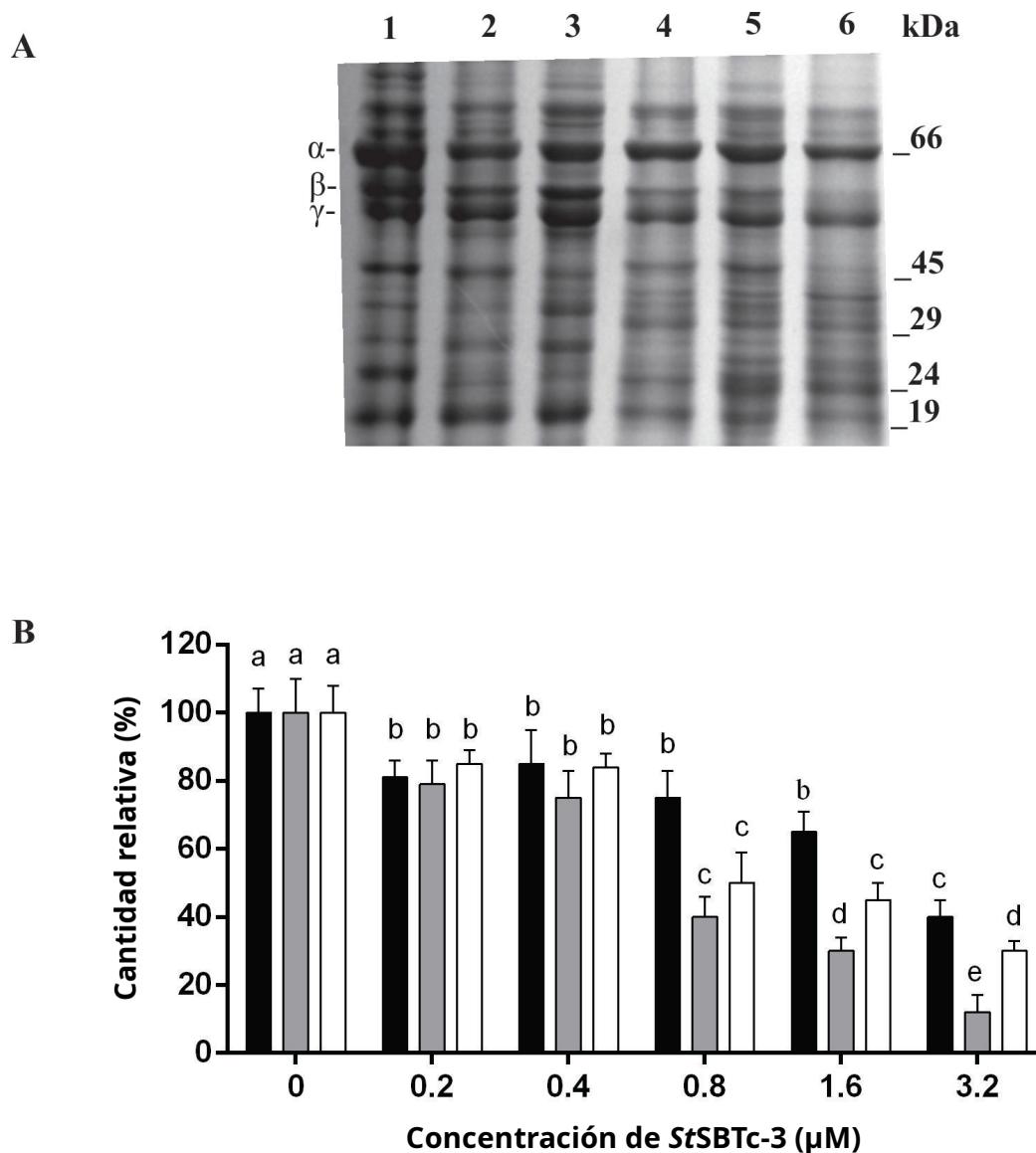


Figura 3.4: Actividad fibrinolítica de *StSBTc-3* en función de la concentración. Los patrones de hidrólisis de la fracción enriquecida de fibrinógeno se muestran en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %. **(A)**. Se incubó la fracción enriquecida en fibrinógeno proveniente de plasma humano (40 μg) con diferentes concentraciones de *StSBTc-3*: 0 μM (calle 1), 0,2 μM (calle 2), 0,4 μM (calle 3), 0,8 μM (calle 4), 1,6 μM (calle 5) y 3,2 μM (calle 6) por 2 horas a 37 °C. **(B)**. Densitometría correspondiente a la abundancia de las 3 cadenas de fibrinógeno de los geles mostrados en **A**: cadena α (negro), cadena β (gris), cadena γ (blanco). Los valores graficados representan la media de tres experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias significativas con p menor a 0,001 y p menor a 0,01 para ANOVA de 1 vía y test de Tukey respectivamente.

3.2 Resultados y discusión

En la Figura 3.5 se muestra el patrón de degradación de fibrinógeno (subunidades α , β y γ) posteriormente a su incubación con *StSBTc-3*. Como se puede observar, *StSBTc-3* degrada las subunidades a los tiempos ensayados. Los resultados obtenidos muestran una mayor degradación de la cadena β por parte de la proteasa respecto a las otras dos cadenas. Este resultado difiere de los resultados reportados para la serín proteasa aislada del látex de *Euphorbia milii*, los cuales muestran una degradación preferencial de las cadenas α y γ del fibrinógeno [Fonseca y col., 2010].

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

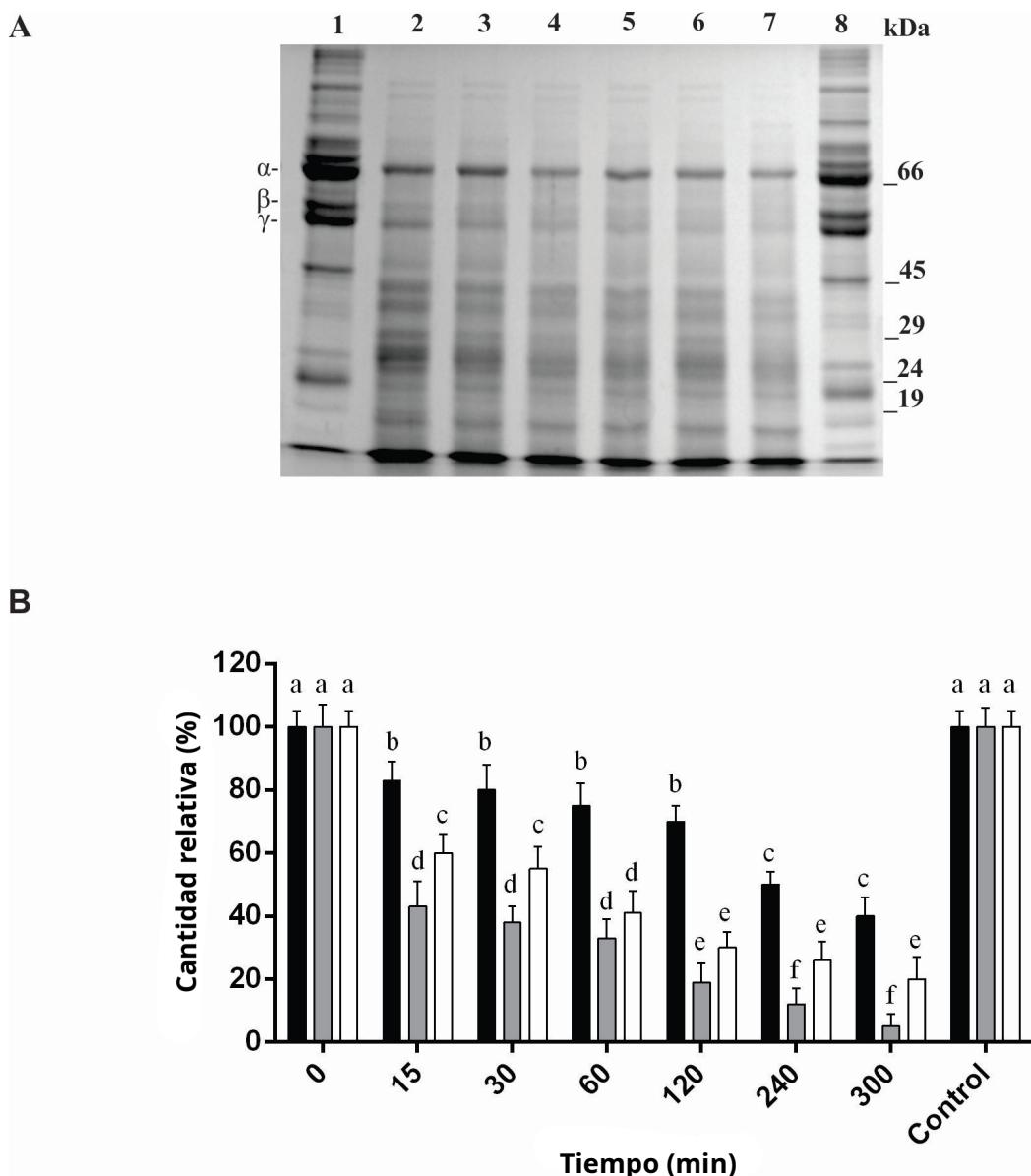


Figura 3.5: Actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* en función del tiempo. Los patrones de hidrólisis de la fracción enriquecida de fibrinógeno se muestran en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %. **(A)**. Se incubó la fracción enriquecida en fibrinógeno proveniente de plasma humano (40 µg) con *StSBTc-3* (1 µM) durante diferentes tiempos: 0 min (calle 1), 15 min (calle 2), 30 min (calle 3), 60 min (calle 4), 120 min (calle 5), 240 min (calle 6), 300 min (calle 7) y 300 min sin *StSBTc-3* (calle 8) a 37 °C. **(B)**. Densitometría correspondiente a la abundancia de las 3 cadenas de fibrinógeno de los geles mostrados en A: cadena α (negro), cadena β (gris), cadena γ (blanco). Los valores graficados representan la media de tres experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias significativas con p menor a 0,001 y p menor a 0,01 para ANOVA de 1 vía y test de Tukey respectivamente.

Estas diferencias podrían explicarse debido a las diferentes especificidades de cada enzima por un sustrato. Previamente se analizaron los sitios de corte de *StSBTc-3* sobre la cadena β de insulina oxidada [Pepe y col., 2016]. Se identificaron siete sitios de clivado para la acción de *StSBTc-3* sobre la cadena β de la insulina oxidada: Asn3-Gln4; Cys7-Gly8; Glu13-Ala14; Leu15-Tyr16; Tyr16-Leu17; Arg22-Gly23 y Phe25-Tyr26. *StSBTc-3* hidrolizó preferentemente los enlaces peptídicos presentes a continuación de los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Tyr y Phe. Esto concuerda con el patrón de especificidad reportado para las serín proteasas del tipo subtilisina [Graycar y col., 2013]. Además, *StSBTc-3* fue capaz de escindir los enlaces peptídicos entre los residuos Glu13-Ala14 y Cys7-Gly8. Se ha reportado un patrón de escisión comparable para otras serín proteasas de origen vegetal como la denominada cucumisina de *Cucumis melo* [Kaneda y Tominaga, 1975], partenina de *Parthenium agentatum* [Lynn y Clevette-Radford, 1988] y macluralisina de *Maclura pomifera* [Rudenskaya y col., 1995]. Al igual que lo reportado para la proteasa aislada de *Helianthus annuus* [Kouzuma y col., 1996] y para la plasmina humana [Yadav y col., 2006], *StSBTc-3* hidrolizó el enlace peptídico entre Arg22-Gly23. Sin embargo, *StSBTc-3* no fue capaz de clivar el enlace entre Lys29-Ala30 reportado previamente para la plasmina humana [Groskopf y col., 1968]. A diferencia de lo observado para *StSBTc-3*, estudios electroforéticos del proceso inicial de degradación del fibrinógeno por plasmina indicaron que la cadena α es la más susceptible a la degradación [Reganon y col., 1978]. Las diferencias encontradas en el perfil de degradación de la cadena β de insulina oxidada podrían explicar las diferencias en la afinidad por las cadenas del fibrinógeno entre *StSBTc-3* y plasmina.

Con el fin de determinar el efecto de *StSBTc-3* sobre el coágulo de fibrina se realizó un ensayo de lisis *in vitro* del polímero de fibrina [Choi y col., 2013] según lo descripto en Materiales y

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

Métodos. El coágulo se formó por el agregado de trombina y luego se incubó con 3 concentraciones diferentes (0,5; 1 y 2 μ M) de *StSBTc-3*. La actividad fibrinolítica de *StSBTc-3* fue determinada mediante un ensayo turbidimétrico descripto en Materiales y Métodos. Se observó que *StSBTc-3* fue capaz de lisar el coágulo de fibrina (Figura 3.6), alcanzando un 50 % de lisis del coágulo a las 15 h de incubación a una concentración aproximada de 2 μ M. Este valor de concentración fue similar al reportado para la Codiasa, una serín proteasa con actividad fibrinolítica proveniente del alga *Codium fragile* [Choi y col., 2013]. Así mismo este resultado fue consistente con el obtenido para la proteasa AMP48 proveniente del latex de *Artocarpus heterophyllus*, la cual genera productos de degradación de fibrina a concentraciones de 1.6 μ M y 3.2 μ M a las 14 h de incubación [Siritapetawee y col., 2012].

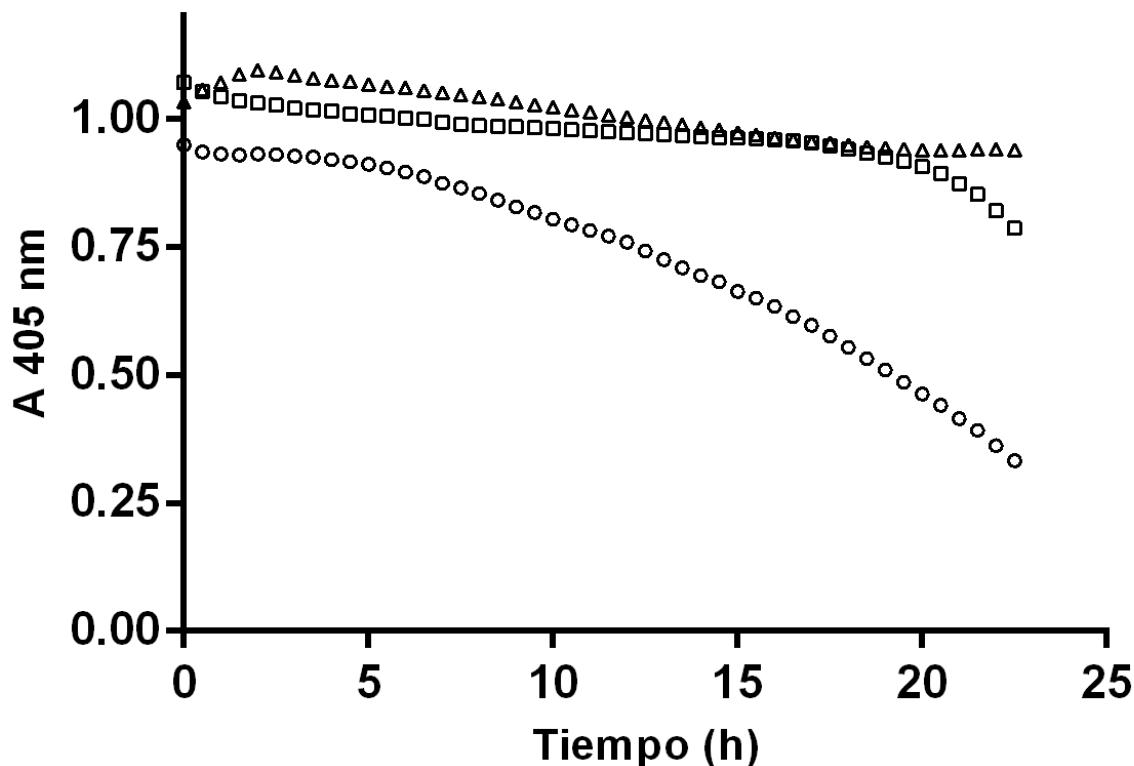


Figura 3.6: Actividad fibrinolítica de *StSBTc-3*. La lisis del coágulo de fibrina fue determinada a través de un ensayo turbidimétrico. El coágulo se preparó según lo descripto en Materiales y Métodos. La lisis se inició con el agregado de distintas concentraciones de *StSBTc-3*: 0,5 μ M (triángulos), 1 μ M (cuadrados), 2 μ M (círculos). El descenso en la turbidez se midió durante 24 h a 405 nm. Menor absorbancia indica mayor redisolución del coágulo. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

Los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad fibrinogenolítica y la estabilidad de *StSBTc-3* fueron similares los reportados para otras serín proteasas de plantas, bacterias y algas [Majumdar y col., 2014, Siritapetawee y col., 2012, Siritapetawee y col., 2015, Kim y col., 2015, Choi y col., 2013]. Los resultados obtenidos mostraron que *StSBTc-3* presenta actividad fibrinogenolítica en un rango de pH de 4 a 11 (Figura 3.7) y en un intervalo de temperaturas

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

entre 10 °C y 70 °C (Figura 3.8). El pH óptimo para la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* fue 8 mientras que la temperatura óptima fue de 37 °C. Se encontró además que la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* fue estable para valores de pH entre 3 y 12 (manteniéndose del 75 a 100 % de la actividad relativa) y para temperaturas de 10 a 60 °C (manteniéndose del 75 a 100 % de la actividad relativa). Estos resultados fueron consistentes con los resultados previamente reportados para la actividad DEVDasa de *StSBTc-3* [Fernández y col., 2012].

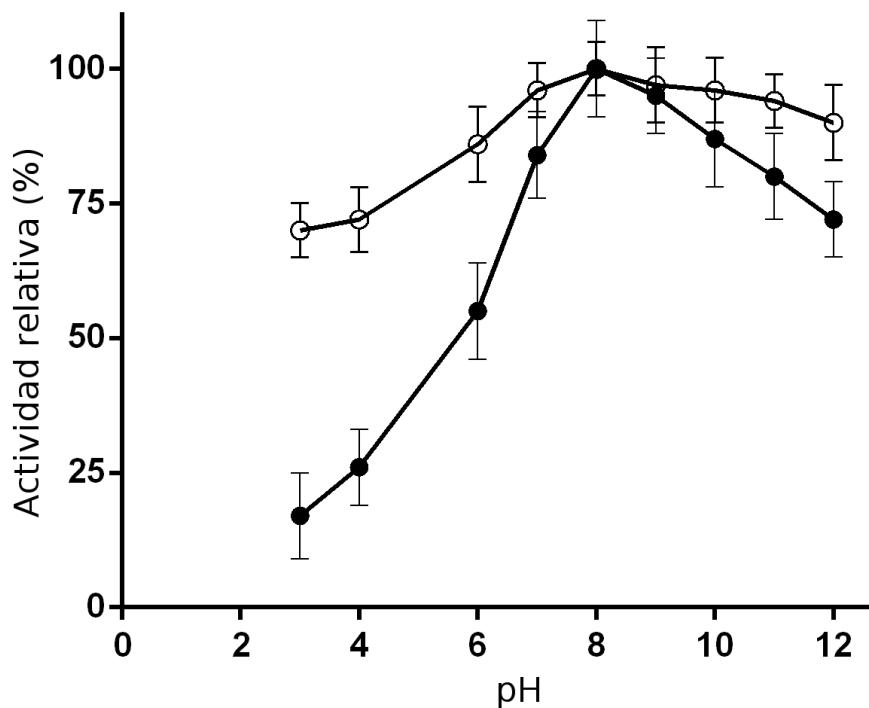


Figura 3.7: Efecto del pH en la actividad fibrinolítica de *StSBTc-3*. El pH óptimo (puntos negros) y la estabilidad (puntos blancos) para la actividad fibrinolítica fue determinado digiriendo fibrinógeno humano (40 µg) con *StSBTc-3* (1 µM) durante 24 h a 37 °C en un rango de pH entre 3 y 12. La actividad fue evaluada según lo descripto en Materiales y Métodos. Los valores graficados representan la media de tres medidas independientes.

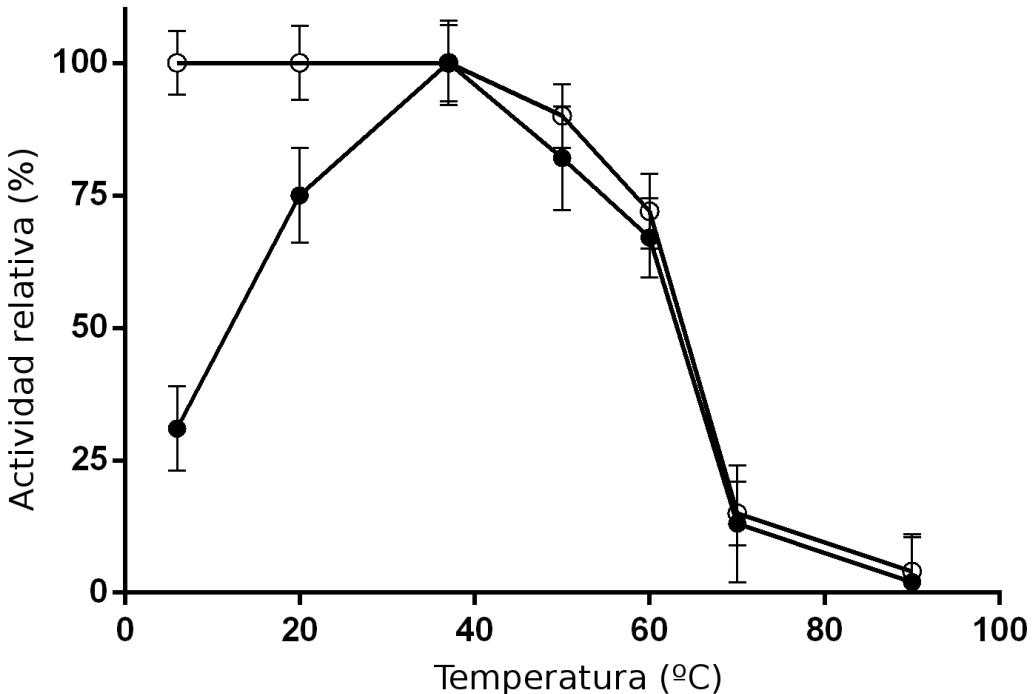


Figura 3.8: Efecto de la temperatura en la actividad fibrinolítica de *StSBTc-3*. La temperatura óptima (puntos negros) y la estabilidad (puntos blancos) de la actividad fibrinolítica fue determinada digiriendo fibrinógeno humano (40 µg) con *StSBTc-3* (1 µM) durante 24 h a pH 8 en un rango de temperaturas entre 5 °C y 90 °C. La actividad fue evaluada según lo descripto en Materiales y Métodos. Los valores graficados representan la media de tres medidas independientes.

3.2.4. Actividad hemolítica de *StSBTc-3*

Con el fin de evaluar la toxicidad de *StSBTc-3*, se ensayó la actividad hemolítica *in vitro* sobre glóbulos rojos humanos según lo descripto en Materiales y Métodos. *StSBTc-3* no presentó actividad hemolítica sobre los eritrocitos a ninguna de las concentraciones ensayadas (Tabla 3.1). Estos resultados fueron consistentes con los reportados por Majumdar y col. para una serín proteasa aislada de *Brevivacillus brevis*, la cual tampoco mostró actividad citotóxica frente a eritrocitos humanos [Majumdar y col., 2014].

3 Caracterización bioquímica de la actividad hemostática de *StSBTc-3*

Tabla 3.1: Actividad hemolítica de *StSBTc-3*. Eritrocitos frescos humanos fueron incubados en PBS con diferentes concentraciones de *StSBTc-3*: 0.2 μ M; 0.5 μ M; 0.8 μ M; 1.0 μ M. Control - (0 % de hemólisis): eritrocitos resuspendidos en PBS. Control + (100 % de hemólisis): eritrocitos resuspendidos en PBS + Triton X-100. La liberación de hemoglobina al sobrenadante fue medida a 550 nm. Los valores presentados representan la media de 3 medidas independientes.

Tratamiento	Concentración (μ M)	% de Hemólisis
PBS		0
<i>StSBTc-3</i>	0.2	0.19 \pm 0.05
<i>StSBTc-3</i>	0.5	0.21 \pm 0.10
<i>StSBTc-3</i>	0.8	0.26 \pm 0.08
<i>StSBTc-3</i>	1	0.27 \pm 0.12
Triton X-100		100

3.3. Conclusiones

En este capítulo se abordó la caracterización bioquímica de *StSBTc-3* en relación con la hemostasia. La hemostasia es un proceso complejo que suele ser dividido para su estudio en tres grandes subprocessos: la hemostasia primaria (agregación y activación plaquetaria), la cascada de coagulación y la fibrinólisis.

Se encontró que *StSBTc-3* es capaz de inhibir la retracción del coágulo in vitro afectando de manera notable la función plaquetaria. Además los resultados obtenidos mostraron que *StSBTc-3* posee tanto actividad fibrinolítica (disolución del coágulo de fibrina) como fibrinogenolítica (degradación de fibrinógeno soluble). Se encontró que *StSBTc-3* degrada preferencialmente la cadena β de fibrinógeno seguida de la γ y la α , mostrando diferencias respecto a la plasmina. Este hecho podría ser explicado debido a las diferencias encontradas entre ambas enzimas en los sitios de clivado sobre la cadena β de insulina oxidada. La concentración de *StSBTc-3*

necesaria para observar antiagregación en plaquetas ($0,5 \mu\text{M}$) fue menor que la necesaria para degradar al fibrinógeno ($1 \mu\text{M}$). Por otro lado los tiempos requeridos para observar la lisis del coágulo de fibrina (15 h), fueron mayores que los necesarios para observar degradación de fibrinógeno soluble (2 h). Estas observaciones resultan consistentes debido a que la degradación de fibrina insoluble ocurre en fase heterogénea y por lo tanto es un proceso más lento que la fibrinogenólisis. Se han reportado resultados similares para otras proteasas de plantas [Choi y col., 2013].

La caracterización bioquímica de *StSBTc-3* mostró que la proteasa presenta actividad fibrinogenolítica en un amplio rango de pH (entre 4 y 11) y temperaturas (entre 10 °C y 70 °C). Esto, sumado al hecho de no poseer actividad hemolítica *in vitro*, le confieren a *StSBTc-3* características deseables para su potencial uso como agente terapéutico dual (antitrombótico y/o antiplaquetario) ubicándola así como una hidrolasa potencialmente utilizable en biotecnología.

Los resultados descriptos en este capítulo fueron realizados con fines exploratorios para evaluar si *StSBTc-3* presentaba algún efecto relacionado con los procesos fisiológicos antes mencionados. Si bien, como se mencionó en la Introducción, existen numerosas proteasas vegetales con actividades trombolíticas, antiplaquetarias o fibrinogenolíticas, muchas veces estas actividades no son sinérgicas. Por lo tanto, el hecho de que *StSBTc-3* posea actividad tanto antiagregante como fibrino(geno)lítica, sin haber mostrado efectos procoagulantes en ninguno de los ensayos realizados, es un buen indicio para continuar con el estudio de esta proteasa para posibles aplicaciones biomédicas. Los siguientes capítulos abordarán con mayor detalle el estudio de los efectos de *StSBTc-3* sobre la agregación plaquetaria y la fibrinogenólisis.

Bibliografía

- [Adams y Bird, 2009] Adams, R. L. y Bird, R. J. (2009). Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, 14(5):462–470.
- [Attard y col., 2013] Attard, C., Van der Straaten, T., Karlaftis, V., Monagle, P., y Ignjatovic, V. (2013). Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(10):1850–1854.
- [Bombeli y Spahn, 2004] Bombeli, T. y Spahn, D. (2004). Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *British journal of anaesthesia*, 93(2):275–287.
- [Cesarman-Maus y Hajjar, 2005] Cesarman-Maus, G. y Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology*, 129(3):307–321.
- [Choi y col., 2014] Choi, J.-h., Kim, D.-w., Park, S.-e., Choi, B.-s., Sapkota, K., Kim, S., y Kim, S.-j. (2014). Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant Aster yomena (

Bibliografía

- Kitam .) Honda with anticoagulant activity : Puri fi cation and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx):4–9.
- [Choi y col., 2013] Choi, J.-H., Sapkota, K., Park, S.-E., Kim, S., y Kim, S.-J. (2013). Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from codium fragile. *Biochimie*, 95(6):1266–1277.
- [Ezihe-Ejiofor y Hutchinson, 2013] Ezihe-Ejiofor, J. A. y Hutchinson, N. (2013). Anticlotting mechanisms 1: physiology and pathology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 13(3):87–92.
- [Feghhi y Sniadecki, 2011] Feghhi, S. y Sniadecki, N. J. (2011). Mechanobiology of platelets: techniques to study the role of fluid flow and platelet retraction forces at the micro-and nano-scale. *International journal of molecular sciences*, 12(12):9009–9030.
- [Fernández y col., 2012] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2012). Devdase activity is induced in potato leaves during phytophthora infestans infection. *Plant physiology and biochemistry*, 61:197–203.
- [Flemmig y Melzig, 2012] Flemmig, M. y Melzig, M. F. (2012). Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(8):1025–1039.
- [Fonseca y col., 2010] Fonseca, K. C., Morais, N. C. G., Queiroz, M. R., Silva, M. C., Gomes, M. S., Costa, J. O., Mamede, C. C. N., Torres, F. S., Penha-Silva, N., Beletti, M. E., Canabrava, H. a. N., y Oliveira, F. (2010). Purification and biochemical characterization of Eumiliin from Euphorbia milii var. hislopia latex. *Phytochemistry*, 71(7):708–15.

[Graycar y col., 2013] Graycar, T., Bott, R., Power, S., y Estell, D. (2013). Handbook of proteolytic enzymes.

[Groskopf y col., 1968] Groskopf, W. R., Hsieh, B., Summaria, L., y Robbins, K. C. (1968). The specificity of human plasmin on the b-chain of oxidized bovine insulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 168(2):376–379.

[Hall, 2015] Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences.

[Hoffman y Pawlinski, 2014] Hoffman, M. y Pawlinski, R. (2014). Hemostasis: old system, new players, new directions. *Thrombosis research*, 133:S1–S2.

[Kaneda y Tominaga, 1975] Kaneda, M. y Tominaga, N. (1975). Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *The Journal of Biochemistry*, 78(6):1287–1296.

[Kim y col., 2015] Kim, D.-w., Choi, J.-h., Park, S.-e., Kim, S., Sapkota, K., y Kim, S.-j. (2015). International Journal of Biological Macromolecules Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Petasites japonicus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72:1159–1167.

[Kim, 2015] Kim, N. D. (2015). Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock.

[Kouzuma y col., 1996] Kouzuma, Y., Kawano, K., Kimura, M., Yamasaki, N., Kadowaki, T., y Yamamoto, K. (1996). Purification, characterization, and sequencing of two cysteine pro-

Bibliografía

- teinase inhibitors, sea and scb, from sunflower (*helianthus annuus*) seeds. *The Journal of Biochemistry*, 119(6):1106–1113.
- [Lasne y col., 2006] Lasne, D., Jude, B., y Susen, S. (2006). From normal to pathological hemostasis. *Canadian Journal of Anesthesia*, 53(2):S2–S11.
- [López-Otín y Bond, 2008] López-Otín, C. y Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*.
- [Lynn y Clevette-Radford, 1988] Lynn, K. y Clevette-Radford, N. (1988). Proteases of euphorbiaceae. *Phytochemistry*, 27(1):45–50.
- [Majumdar y col., 2014] Majumdar, S., Sarmah, B., Gogoi, D., Banerjee, S., Ghosh, S. S., Banerjee, S., Chattopadhyay, P., y Mukherjee, A. K. (2014). Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (brevithrombolase) purified from *brevibacillus brevis* strain ff02b. *Biochimie*, 103:50–60.
- [Mann y col., 2003] Mann, K., Brummel, K., y Butenas, S. (2003). What is all that thrombin for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7):1504–1514.
- [Marder y col., 1969] Marder, V. J., Shulman, N. R., y Carroll, W. R. (1969). High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin i. physicochemical and immunological characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 244(8):2111–2119.
- [Munday y López, 2013] Munday, A. D. y López, J. A. (2013). Factor xiii: sticking it to platelets. *Blood*, 122(19):3246–3247.

- [Nicholl y col., 2006] Nicholl, S. M., Roztocil, E., y Davies, M. G. (2006). Plasminogen activator system and vascular disease. *Current Vascular Pharmacology*, 4(2):101–116.
- [Owens III y Mackman, 2010] Owens III, A. P. y Mackman, N. (2010). Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thrombosis and haemostasis*, 104(3):432.
- [Pepe y col., 2016] Pepe, A., Frey, M. E., Munoz, F., Fernández, M. B., Pedraza, A., Galbán, G., García, D. N., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2016). Fibrin (ogen)olytic and antiplatelet activities of a subtilisin-like protease from solanum tuberosum (stsbtc-3). *Biochimie*, 125:163–170.
- [Previtali y col., 2011] Previtali, E., Bucciarelli, P., Passamonti, S. M., y Martinelli, I. (2011). Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfusion*, 9(2):120.
- [Reganon y col., 1978] Reganon, E., Aznar, J., y Vila, V. (1978). Degradation of human fibrinogen by plasmin. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 7(1):26–34.
- [Rudenskaya y col., 1995] Rudenskaya, G., Boganova, E., Revina, L., Golovkin, B., y Stepanov, V. (1995). Macularisin—a serine proteinase from fruits of maclura pomifera (raf.) schneid. *Planta*, 196(1):174–179.
- [Samson y col., 2017] Samson, A. L., Alwis, I., Maclean, J. A., Priyananda, P., Hawkett, B., Schoenwaelder, S. M., y Jackson, S. P. (2017). Endogenous fibrinolysis facilitates clot retraction in vivo. *Blood*, 130(23):2453–2462.
- [Schneider y col., 2012] Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671.

Bibliografía

- [Siritapetawee y col., 2015] Siritapetawee, J., Sojikul, P., y Klaynongsruang, S. (2015). Plant Physiology and Biochemistry Biochemical characterization of a new glycosylated protease from Euphorbia cf . lactea latex. *Plant Physiology et Biochemistry*, 92:30–38.
- [Siritapetawee y col., 2012] Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P., y Thammasirirak, S. (2012). Biochimica et Biophysica Acta A novel serine protease with human fibrinolytic activities from Artocarpus heterophyllus latex. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1824(7):907–912.
- [Triplett, 2000] Triplett, D. A. (2000). Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clinical chemistry*, 46(8):1260–1269.
- [Turk, 2006] Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews Drug discovery*, 5(9):785.
- [Watson, 2009] Watson, S. P. (2009). Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Current pharmaceutical design*, 15(12):1358–1372.
- [Yadav y col., 2006] Yadav, S. C., Pande, M., y Jagannadham, M. (2006). Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant euphorbia milii. *Phytochemistry*, 67(14):1414–1426.

4 Optimización de la actividad

fibrinogenolítica de StSBTc-3

4.1. Introducción

La hemostasia se define como el mantenimiento de la fluidez de la sangre en el interior de los vasos sanguíneo y la protección contra el sangrado. Esto se logra a través de un complejo mecanismo que involucra a las plaquetas, el endotelio, la coagulación y el sistema fibrinolítico [Palta y col., 2014]. Las serín proteasas son cruciales para la hemostasia ya que están involucradas en diversas vías que llevan a la formación del tapón plaquetario y la redisolución del mismo [Walsh y Ahmad, 2002].

En el capítulo anterior (Capítulo 3) se describió la caracterización bioquímica de la subtilisina de *Solanum tuberosum* StSBTc-3. Se mostró que StSBTc-3 fue capaz de degradar todas las cadenas de fibrinógeno, aunque siendo más notable la degradación de la cadena β .

La actividad enzimática se ve afectada por un gran número de variables, como el pH, la temperatura y la concentración enzimática. En el Capítulo 3 se llevó a cabo un estudio preliminar

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

sobre el efecto que estas variables tenían sobre la concentración enzimática. Sin embargo el enfoque utilizado no consideró la posible interacción entre variables.

El objetivo del presente capítulo fue optimizar la actividad fibrinogenolítica *in vitro* de StSBTc-3, analizando el efecto del pH, la temperatura y la concentración enzimática a través de RSM, una técnica utilizada satisfactoriamente para la optimización de varias reacciones enzimáticas [Shieh y col., 1995, Hourigan y Chesterman, 1997, Guan y Yao, 2008, Bernal y col., 2006, Amira y col., 2017].

4.1.1. RSM

RSM involucra un conjunto de técnicas estadísticas usadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés depende de varios factores de carácter cuantitativo. El uso de esta técnica consiste en diseñar un experimento que proporcione valores de la variable dependiente (respuesta) y luego determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos obtenidos. Esta metodología suele utilizarse para optimizar los valores de los factores que maximizan el valor de la respuesta y obtener un modelo que permita predecir la misma para ciertos valores dados de los factores.

La aplicación de RSM permite reducir los costos y el tiempo de los métodos de análisis convencional. El valor de la variable dependiente, está influido por los niveles de los factores cuantitativos. Podemos decir entonces que el valor real esperado η es función de los factores cuantitativos X_i .

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (4.1)$$

Por lo tanto, la respuesta obtenida Y es:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_n) + \varepsilon \quad (4.2)$$

Donde ε es el error esperado en la respuesta. La superficie representada por $f(x_i)$ es conocida como superficie de respuesta. Esta puede ser representada en 2 o 3 dimensiones como diagramas de contorno que ayudan a visualizar la forma de la superficie. Los contornos se definen como curvas en las que el valor de la respuesta es constante, dibujados en el plano x_i, x_j manteniendo todas las otras variables fijas.

Generalmente la estructura de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. El primer paso en RSM es encontrar una aproximación a la relación verdadera. Las aproximaciones más comunes son polinomios de primer y segundo grado. Los coeficientes de regresión incluidos en el modelo aproximado se llaman parámetros y son estimados minimizando la suma del cuadrado de los errores.

La construcción de estos modelos es un proceso iterativo. Una vez que se obtiene el primer modelo aproximado, se evalúa si la solución es o no satisfactoria. Si no es el caso pueden realizarse más experimentos o aumentar el grado del polinomio agregando otros parámetros para mejorar el ajuste del modelo [Box y Draper, 1987].

Los factores son las condiciones del proceso que influencian la variable de respuesta. Estos pueden ser cuantitativos o cualitativos. En este capítulo los factores que se estudiarán son la **concentración enzimática**, la **temperatura** y el **pH**, siendo los tres variables cuantitativas.

La variable respuesta es una cantidad medible cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores, siendo el objetivo de este tipo de análisis optimizar dicho valor. La respuesta que

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

se estudiará en este capítulo es la actividad fibrinogenolítica que fue medida según lo descripto en Materiales y Métodos.

4.1.2. Diseño de experimentos

Un aspecto importante de RSM es el diseño experimental [Box y Draper, 1987]. El objetivo del *Diseño de experimentos* (DdE) es la selección de puntos donde se evaluará la respuesta. La elección del diseño experimental puede tener una gran influencia en la precisión del modelo y en el costo de la construcción de la superficie de respuesta.

Con el propósito de identificar qué variables poseen mayor efecto en la respuesta y en qué rango, es necesario realizar experimentos preliminares . Los experimentos del Capítulo 1 se utilizaron aquí para establecer el dominio de las variables independientes estudiadas. Para una descripción detallada de la teoría de DdE pueden revisarse los artículos de Box y Draper [Box y Draper, 1987] y de Montgomery [Montgomery, 2006].

Una combinación particular de ensayos define un diseño experimental en particular. Los distintos valores que pueden tomar las variables independientes en el espacio N-dimensional se denominan niveles. A continuación se describen algunos de los diferentes diseños existentes.

Diseño factorial completo

Para construir un modelo aproximado que pueda capturar las interacciones entre N variables puede ser necesario un diseño factorial completo que investigue todas las combinaciones posibles. En un diseño factorial se varían los niveles de las distintas variables de manera simultánea, no de forma individual, como suele hacerse en las optimizaciones tradicionales [Box y Draper,

1987].

Deben definirse los límites inferior y superior para cada una de las N variables en la optimización. Luego se requiere discretizar el rango en diferentes niveles. Si cada una de las variables es definida sólo en los límites superior e inferior (2 niveles), el diseño experimental se conoce como un diseño factorial completo 2^N . Si también se incluyen los valores medios de los respectivos rangos el diseño será 3^N (Figura 4.1).

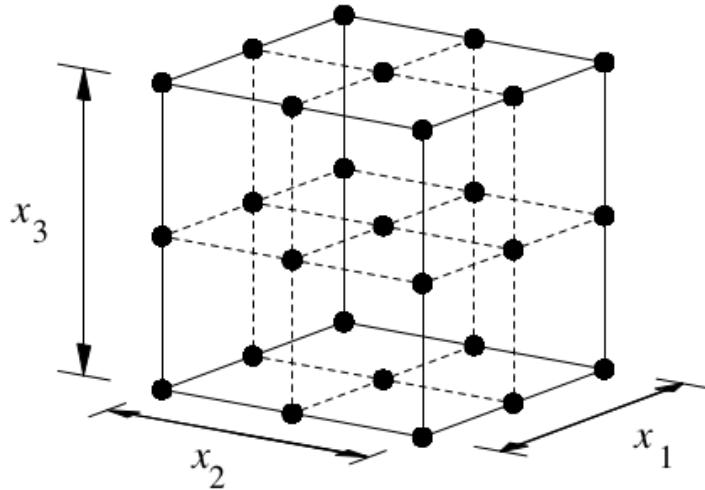


Figura 4.1: Diseño factorial completo 3^3 (27 ensayos)

Los diseños factoriales pueden utilizarse para ajustar modelos de segundo orden. Este tipo de modelos puede mejorar significativamente la optimización del proceso cuando el modelo de primer orden no se ajusta de manera adecuada. En general, un modelo de segundo orden se define como:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n a_{ij} x_i x_j \quad (4.3)$$

Donde x_i y x_j son las variables del diseño (factores) y los a son los parámetros de "sintonía".

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

zación" (*tunning*). Se requieren evaluar por lo menos $(N + 1)(N + 2)/2$ puntos. El número de experimentos necesario crece exponencialmente con el número de variables a estudiar.

Diseño de Box-Behnken (BBD)

Este diseño permite utilizar una fracción del diseño factorial completo evaluando sólo algunas de las combinaciones posibles entre las variables.

El BBD es una clase de diseño de segundo orden basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles [Ferreira y col., 2007]. Para un diseño de tres factores, la representación gráfica se muestra en la Figura 4.2.

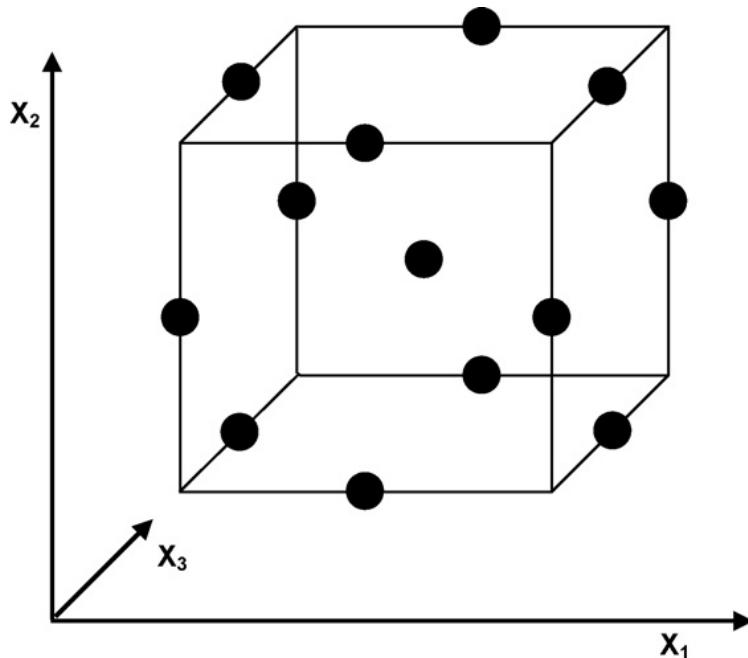


Figura 4.2: Representación gráfica de un BBD de tres factores. Los puntos negros indicados corresponden al punto central del cubo y a los puntos medios de las aristas en el dominio de variables.

La tabla 4.1 contiene las variables codificadas para un diseño de 3 factores. x_1 , x_2 , x_3 son las variables codificadas. Los valores -1, 1 y 0 corresponden al valor mínimo, máximo y medio del

rango para cada variable (puntos negros en la Figura 4.2).

Tabla 4.1: Niveles de factores codificados para un diseño de Box-Behnken correspondiente a un sistema de 3 variables independientes.

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

4.1.3. Análisis de datos

Se utilizó RSM para optimizar la actividad fibrinolítica de *StSBTc-3* *in vitro*. Se realizaron 15 ensayos bajo diferentes combinaciones de pH, temperatura y concentración enzimática. Se midió la actividad fibrinolítica como variable respuesta. Se eligió un BBD de 3 factores como diseño experimental para realizar el análisis estadístico.

Las tres variables independientes estudiadas fueron el pH, la temperatura y la concentración enzimática. Los tres niveles elegidos para cada variable se muestran en la Tabla 4.2 y fueron seleccionados en base a la caracterización preliminar realizada en el Capítulo 3.

Las variables independientes X_i fueron codificadas como x_i y se definieron en forma adimensional de acuerdo con la ecuación 4.4.

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \quad (4.4)$$

ΔX_i corresponde al rango para cada variable. X_0 es el valor real en el centro del dominio de variables, X_i es el valor real de cada variable y x_i es el correspondiente valor codificado. Las variables independientes y sus niveles son presentados en la Tabla 4.2. Los 15 ensayos fueron realizados de manera aleatoria con el objetivo de minimizar posibles tendencias asociadas al error experimental. Se realizaron dos réplicas para cada experimento y el promedio de ambas fue utilizada como variable respuesta. Las respuestas obtenidas son presentadas en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2: Variables independientes y sus niveles correspondientes a un BBD de tres factores para la optimización de la actividad enzimática de *StSBTc-3*

Variable independiente	Símbolo		Niveles		
	Sin codificar	Codificada	-1	0	1
Concentración enzimática (μM)	X_1	x_1	0.2	2.6	5.0
pH	X_2	x_2	6	8	10
Temperatura (C)	X_3	x_3	20	35	50

El modelo de segundo orden utilizado para describir la relación entre la variable respuesta (Y = actividad fibrinogenolítica) y las tres variables codificadas se encuentra representado por la ecuación 4.5:

$$\begin{aligned} Y = & b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_{12} + b_{22} X_{22} + b_{33} X_{32} \\ & + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 \end{aligned} \quad (4.5)$$

Donde Y es la variable respuesta, x_i son las variables codificadas, b_0 la constante del modelo,

b_i el efecto lineal de x_i , b_{ii} el efecto cuadrático de x_i y b_{ik} el coeficiente de interacción entre x_i and x_k .

Para realizar el análisis de regresión de los datos obtenidos, la construcción del modelo cuadrático y la representación de los gráficos de iso-respuesta se llevó a cabo la implementación del paquete *rsm* [Lenth, 2009] en el entorno de trabajo R [R Development Core Team, 2008]. Se utilizó ANOVA para evaluar la significancia de los coeficientes. La calidad del modelo generado fue evaluada a través del coeficiente R^2 .

4.1.4. Verificación y validación del modelo

Para la verificación del modelo, la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* fue medida experimentalmente bajo las condiciones óptimas, de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. Para determinar la validez del modelo se compararon los datos obtenidos experimentalmente con los predichos por el modelo (Ecuación 4.6).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Ajuste del modelo

Se utilizó RSM para generar un modelo que permita predecir la actividad fibrinogenolítica *in vitro* de *StSBTc-3* en función de las variables a optimizar (pH, temperatura y concentración de enzima). Las condiciones experimentales y las respuestas obtenidas correspondientes al BBD se muestran en la Tabla 4.3.

Se analizaron las variables dependientes y sus respuestas y se obtuvieron los coeficientes para

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

Tabla 4.3: BBD utilizado y respuestas obtenidas para la optimización de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

N	Concentración enzimática (μM)	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	Actividad fibrinogenolítica (ur)
1	0.2	6	35	0.12
2	0.2	10	35	0.15
3	0.2	8	20	0.17
4	0.2	8	50	0.14
5	2.6	10	20	0.35
6	2.6	10	50	0.37
7	2.6	6	20	0.25
8	2.6	6	50	0.27
10	5	8	50	0.75
11	5	6	35	0.62
12	5	10	35	0.59
13	2.6	8	35	0.61
14	2.6	8	35	0.65
15	2.6	8	35	0.59

la ecuación 4.5. Los valores de los coeficientes fueron calculados mediante RSM y se muestran en la Tabla 4.4. El modelo que predice la actividad fibrinogenolítica (Y) se representa entonces mediante la ecuación 4.6.

$$\begin{aligned}
 Y = & 6,17e^{-01} + 2,29e^{-01}x_1 + 2,50e^{-02}x_2 + 3,88e^{-02}x_3 - 8,96e^{-02}x_1^2 \\
 & - 1,57e^{-01}x_2^2 - 1,50e^{-01}x_3^2 - 1,50e^{-02}(x_1x_2) + 8,25e^{-02}(x_1x_3) - 6,31e^{-18}(x_2x_3)
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

El gráfico de las respuestas experimentales versus las predichas por el modelo indica un buen ajuste (Figura 4.3). Los resultados obtenidos del análisis de varianza (Tabla 4.5) muestran que la contribución del término cuadrático puro (PQ) es significativa para el modelo, por lo que el análisis de segundo orden es relevante. Las interacciones entre variables (TWI), en cambio, no

Tabla 4.4: Coeficientes de regresión obtenidos mediante RSM. Códigos de significación: 0 "****", 0.001 **", 0.01 "*", 0.05 ".", 0.1 . Múltiple R^2 : 0.979. R^2 ajustado: 0.9411.

Término	Coeficiente	Error estándar	t valor	P valor	
B_0	6.17E-01	3.03E-02	20.34	5.3E-06	***
x_1	2.29E-01	1.86E-02	12.32	6.2E-05	***
x_2	2.50E-02	1.86E-02	1.35	2.4E-01	
x_3	3.88E-02	1.86E-02	2.09	9.1E-02	.
$x_1:x_2$	-1.50E-02	2.63E-02	-0.57	5.9E-01	
$x_1:x_3$	8.25E-02	2.63E-02	3.14	2.6E-02	*
$x_2:x_3$	-6.31E-18	2.63E-02	0.00	1.0E+00	
x_1^2	-8.96E-02	2.73E-02	-3.28	2.2E-02	*
x_2^2	-1.57E-01	2.73E-02	-5.75	2.2E-03	**
x_3^2	-1.50E-01	2.73E-02	-5.47	2.8E-03	**

resultaron significativas. Resultados similares fueron encontrados para otras proteasas [Gobbertia y col., 1999, Amira y col., 2017]. El coeficiente de determinación R^2 para el modelo obtenido fue de 0.94 (Tabla 4.5). Esto implica que el 94 % de las variaciones pudieron ser explicadas por el modelo.

Tabla 4.5: Análisis de varianza del modelo generado por RSM. Multiple R^2 : 0.979, R^2 ajustado: 0.9411. F: 25.87 con 9 y 5 grados de libertad, p-valor: 0.001132. FO: primer orden; TWI: interacción entre variables; PQ: término cuadrático puro.

Df	Suma	Cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr (>F)
FO(x_1, x_2, x_3)	3	0.43563	0.145208	52.6435	0.0003324
TWI(x_1, x_2, x_3)	3	0.02812	0.009375	3.3988	0.1105318
PQ(x_1, x_2, x_3)	3	0.17843	0.059477	21.5627	0.0027360
Residuales	5	0.01379	0.002758		
Falta de ajuste	3	0.01192	0.003975	4.2589	0.1959881
Error puro	2	0.00187	0.000933		

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*

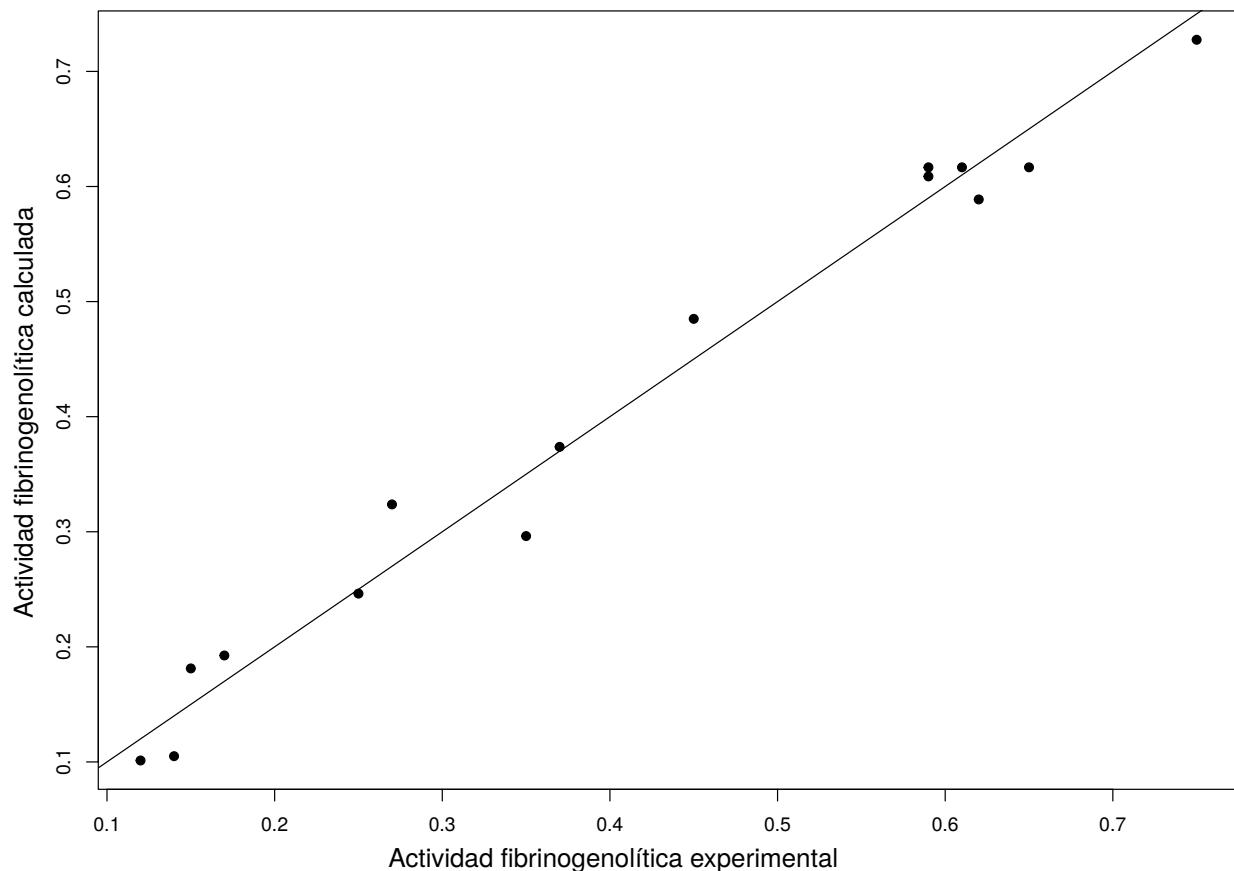


Figura 4.3: Validación del modelo propuesto. Se representa la correlación entre la actividad fibrinolítica calculada a partir del modelo generado por RSM y la actividad calculada experimentalmente según lo descripto en la sección de Materiales y Métodos.

4.2.2. Efecto de las variables independientes en la respuesta

Los efectos del pH, la temperatura y la concentración de *StSBTc-3* sobre la actividad fibrinolítica fueron analizados por RSM. Los coeficientes de regresión correspondientes al polinomio de segundo orden generado son presentados en la Tabla 4.4.

Las contribuciones de las tres variables estudiadas fueron relevantes para explicar las respuestas obtenidas. Las contribuciones cuadráticas y lineales fueron significativas para explicar

la varianza del modelo mientras que las interacciones entre variables no resultaron significativas (Tabla 4.5). La contribución del término lineal correspondiente a la concentración de *StSBTc-3* fue significativa ($P < 0,0001$), así como también fueron significativos los términos cuadráticos correspondientes al pH y la temperatura (Tabla 4.5).

La contribución lineal para la concentración enzimática ($2,29 \times 10^{-1}$) resultó un orden de magnitud mayor que el término cuadrático ($-8,96 \times 10^{-2}$). Esto implica que la relación entre la variable respuesta y este factor fue aproximadamente lineal. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos durante la caracterización bioquímica preliminar realizada en el Capítulo 3. Sin embargo, los términos cuadráticos correspondientes al pH y a la temperatura fueron mayores que los términos lineales (Tabla 4.4), implicando que en estos casos la contribución cuadrática a la respuesta fue relevante. La relación entre las variables estudiadas y la respuesta se muestra en los diagramas de contorno (Figura 4.4) y en los gráficos de superficie (Figura 4.5).

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

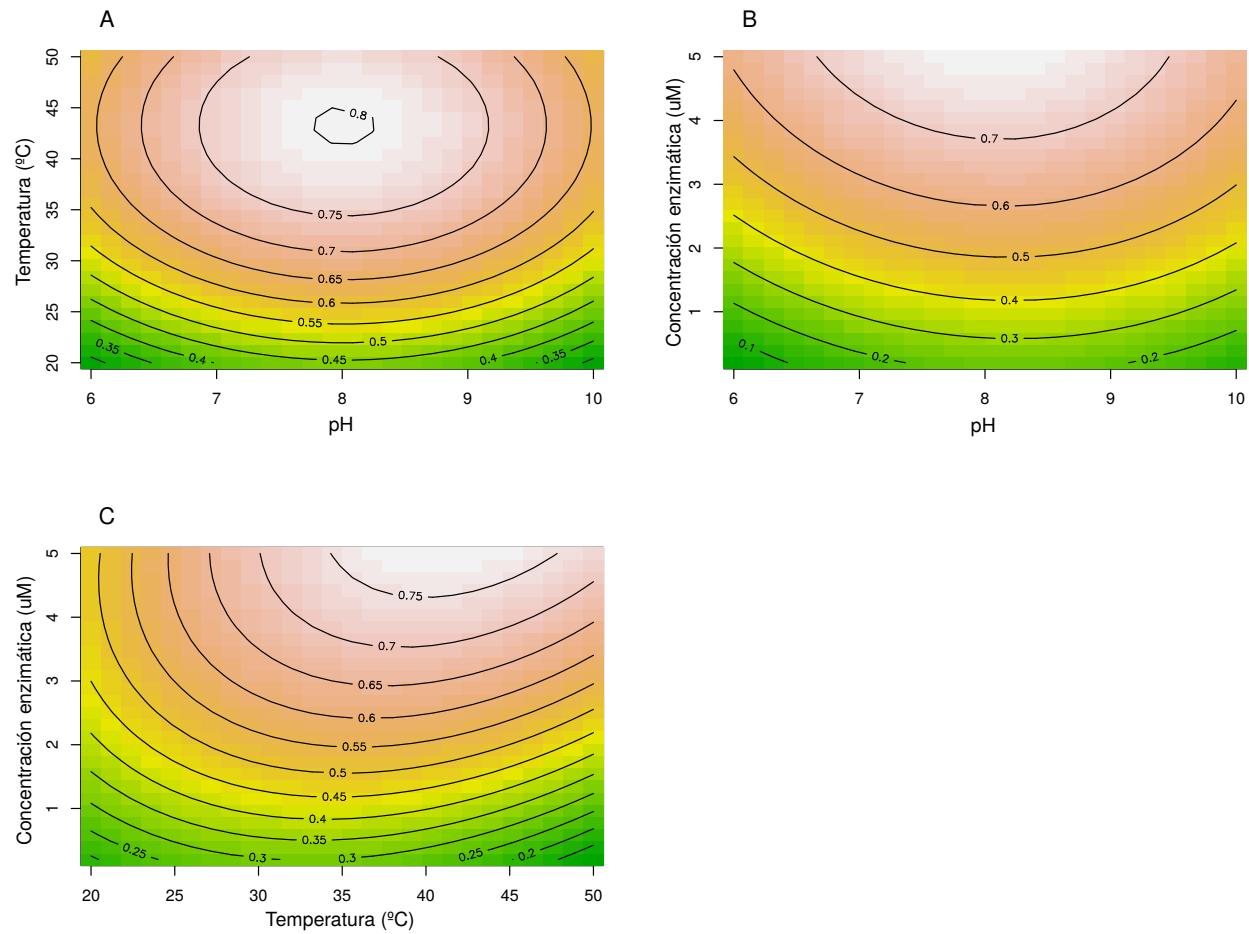


Figura 4.4: Mapas de contorno. Se muestran 2 de las variables independientes a la vez. La variable no mostrada en cada caso se mantuvo en el valor correspondiente a la respuesta óptima. A: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) vs pH, concentración enzymática: $5 \mu\text{M}$; B: Concentración enzymática (μM) vs pH, temperatura: 43°C ; C: Concentración enzymática (μM) versus temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH: 8.

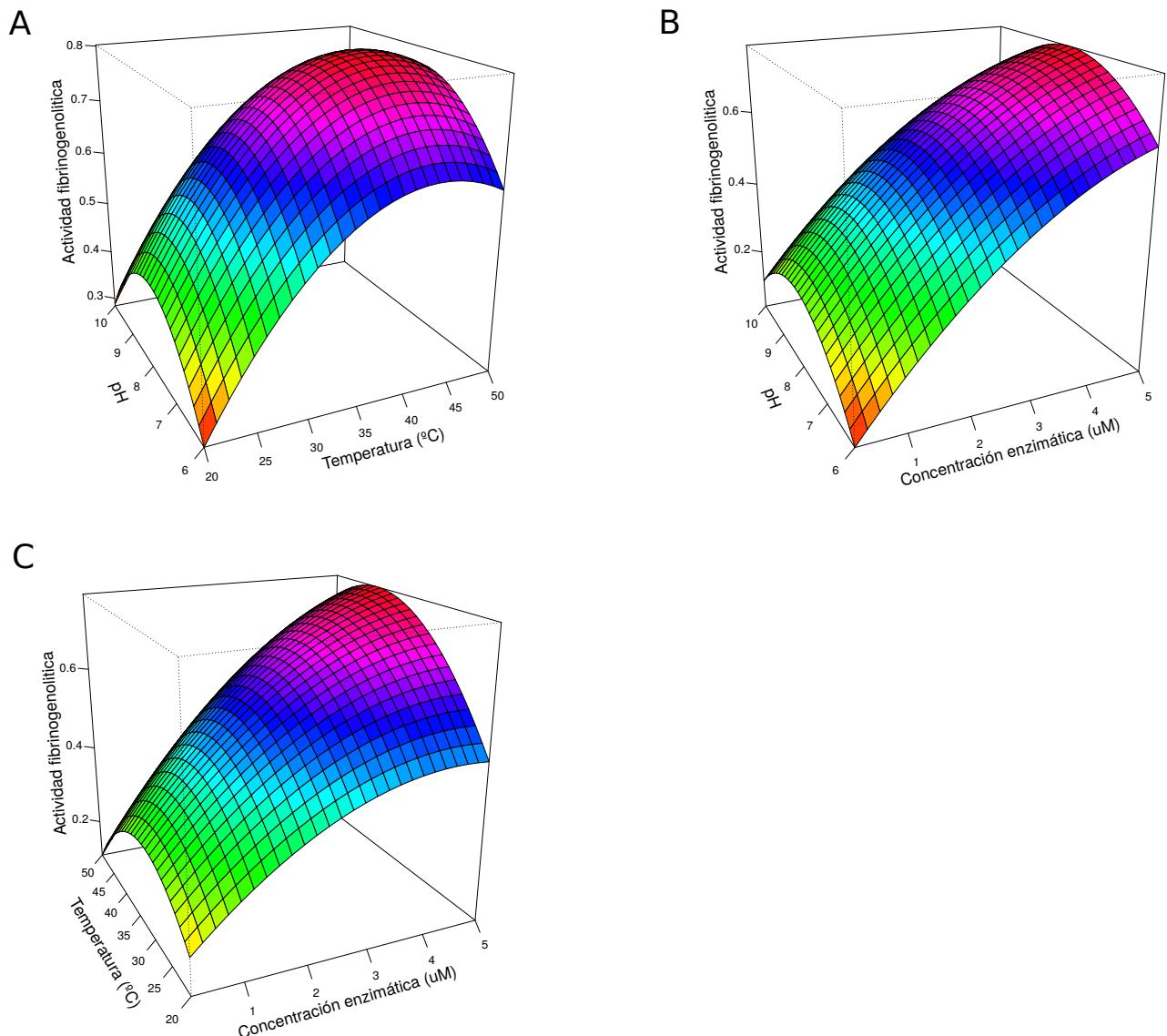


Figura 4.5: Diagramas de superficies generados por RSM. La variable no mostrada en cada caso se mantuvo en el valor correspondiente al óptimo. A: Temperatura (°C) vs pH, concentración enzimática: 5 μM ; B: Concentración enzimática (μM) vs pH, temperatura: 43 °C; C: Concentración enzimática (μM) vs temperatura (°C), pH: 8.

La concentración enzimática mostró un efecto lineal sobre la respuesta, implicando que la actividad fibrinolítica incrementa con el aumento de la concentración de *StSBTc-3* de manera dosis dependiente. Sin embargo el pH y la temperatura mostraron un efecto cuadrático en la variable respuesta. La actividad enzimática aumentó hasta llegar a un máximo centrado

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

en pH 8 y 43 °C, descendiendo posteriormente con un incremento en cualquiera de las variables (Figuras 4.5 y 4.4).

4.2.3. Condiciones óptimas y verificación del modelo

Los niveles óptimos correspondientes a los tres factores estudiados fueron obtenidos a partir del modelo generado (Ecuación 4.6). En estas condiciones (pH 8, concentración de enzima 5 μM y 43 °C de temperatura) el modelo predijo una actividad fibrinogenolítica de 0,62. La capacidad del modelo de predecir la respuesta fue puesta a prueba realizando experimentos adicionales usando las condiciones óptimas predichas. La actividad fibrinogenolítica encontrada experimentalmente (0,55) no fue significativamente diferente a la predicha por el modelo ($P < 0,01$)

Los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica realizada en el Capítulo 3 no fueron significativamente diferentes a los encontrados mediante el análisis por RSM. Esta evidencia experimental sugiere que la interacción mutua entre las variables no contribuye significativamente a la respuesta obtenida; la no significancia de los términos de interacción del modelo (Tabla 4.5) avala esta observación. Cada variable contribuye a la respuesta de manera independiente (Tabla 4.5)

El pH y la temperatura óptima obtenidos se encuentran en el mismo rango que los correspondientes previamente descriptos para otras serín proteasas de plantas con actividad fibrinogenolítica ([Siritapetawee y col., 2012]).

4.3. Conclusiones

Se encontraron las condiciones óptimas de pH, temperatura y concentración enzimática para la actividad fibrinolítica de *StSBTc-3* *in vitro* mediante RSM.

Del análisis resultaron las condiciones óptimas de pH (8) y temperatura (43 °C). El efecto de la concentración de enzima en la respuesta fue lineal en el intervalo de concentraciones utilizados, donde concentraciones más altas de enzima produjeron actividades enzimáticas mayores. La actividad enzimática correspondiente a las condiciones óptimas fue verificada por experimentos adicionales. Bajo estas condiciones, la actividad experimental resultó similar a la predicha por el modelo. Además se pudo determinar que *StSBTc-3* mantuvo su actividad fibrinolítica en condiciones fisiológicas (pH 7,45 y temperatura 37°C), lo que la hace adecuada para una posible aplicación biomédica.

Aunque como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos mediante este análisis no resultaron significativamente diferentes a los obtenidos en la caracterización bioquímica realizada previamente (Capítulo 3), el análisis por rsm implicó una mejora sustantiva debido a las siguientes razones. El BBD utilizado permitió reducir el número de experimentos requeridos para obtener un modelo estadísticamente robusto. El análisis por RSM implementado a través del paquete *rsm* en el entorno de trabajo R [Lenth, 2009] resultó una herramienta conveniente para obtener la información requerida, ya que no sólo pudo obtenerse la respuesta en las condiciones óptimas sino que se generó un modelo que es capaz de predecir la respuesta en todo el dominio de variables estudiadas. Esto es particularmente relevante en esta tesis debido a que uno de los objetivos futuros es unir covalentemente *StSBTc-3* a una superficie polimérica, implicando procesos de derivatización [Fischer y col., 2018]. El modelo podría entonces ser capaz

4 Optimización de la actividad fibrinogenolítica de StSBTc-3

de predecir la actividad enzimática durante los diversos pasos de dichos procesos.

A través del análisis por RSM fue posible determinar el rango dentro del dominio de variables que corresponde a las mayores actividades. Esto permitió predecir la respuesta en condiciones fisiológicas, siendo deseable que la proteasa *StSBTc-3* mantenga su actividad fibrinogenolítica en dichas condiciones como requisito para poder ser considerada para aplicaciones biomédicas.

Bibliografía

- [Amira y col., 2017] Amira, A. B., Mokni, A., Yaich, H., Chaabouni, M., Besbes, S., Blecker, C., y Attia, H. (2017). Technological properties of milk gels produced by chymosin and wild cardoon rennet optimized by response surface methodology. *Food Chemistry*, 237:150–158.
- [Bernal y col., 2006] Bernal, C., Diaz, I., y Coello, N. (2006). Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. *Canadian journal of microbiology*, 52(5):445–450.
- [Box y Draper, 1987] Box, G. E. P. y Draper, N. (1987). *Wiley series in probability and mathematical statistics. Empirical model-building and response surfaces*, volume 4 of 10. John Wiley and Sons, Oxford, England.
- [Ferreira y col., 2007] Ferreira, S., Bruns, R., Ferreira, H., Matos, G., David, J., Brandão, G., da Silva, E., Portugal, L., dos Reis, P., Souza, A., y dos Santos, W. (2007). Box-behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2):179 – 186.
- [Fischer y col., 2018] Fischer, M., Maitz, M., y Werner, C. (2018). Coatings for biomaterials to

Bibliografía

- improve hemocompatibility. In *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*, pages 163–190. Elsevier.
- [Gobbettia y col., 1999] Gobbettia, M., Lanciotti, R., De Angelis, M., Corbo, M. R., Massini, R., y Fox, P. (1999). Study of the effects of temperature, ph, nacl, and aw on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(10):795–809.
- [Guan y Yao, 2008] Guan, X. y Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food chemistry*, 106(1):345–351.
- [Hourigan y Chesterman, 1997] Hourigan, J. A. y Chesterman, C. F. (1997). Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2):141–146.
- [Lenth, 2009] Lenth, R. (2009). Response-surface methods in r, using rsm. *Journal of Statistical Software, Articles*, 32(7):1–17.
- [Montgomery, 2006] Montgomery, D. C. (2006). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- [Palta y col., 2014] Palta, S., Saroa, R., y Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia*, 58(5):515.
- [R Development Core Team, 2008] R Development Core Team (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

- [Shieh y col., 1995] Shieh, C.-J., Akoh, C. C., y Koehler, P. E. (1995). Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(6):619–623.
- [Siritapetawee y col., 2012] Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P., y Thammasirirak, S. (2012). A novel serine protease with human fibrino (geno) lytic activities from artocarpus heterophyllus latex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(7):907–912.
- [Walsh y Ahmad, 2002] Walsh, P. N. y Ahmad, S. S. (2002). Proteases in blood clotting. *Essays in biochemistry*, 38:95–112.

5 Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

5.1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en el mundo. Las terapias antiplaquetarias y anticoagulantes han mejorado en las últimas décadas, sin embargo todavía es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos y el mejoramiento de dichas terapias [Valgimigli y col., 2017]. Los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta tesis demostraron que *StSBTc-3* inhibió la retracción del coágulo *in vitro*. Aunque se encuentra ampliamente reportado en bibliografía que la retracción del coágulo es en parte dependiente de la vía de señalización a partir de la integrina $\alpha 2b\beta 3$, el mecanismo no se ha dilucidado de manera completa por lo que se emplea como un ensayo general de la función plaquetaria [Flevaris y col., 2009, Suzuki-Inoue y col., 2007]. El objetivo del presente capítulo fue profundizar en la caracterización de la actividad antiplaquetaria descripta para la enzima *StSBTc-3*.

En primer lugar, es necesario comprender los mecanismos básicos de agregación. Las plaquetas son pequeñas células anucleadas generadas a partir de megacariocitos en la médula ósea. Aunque la generación, maduración y liberación al torrente sanguíneo de las plaquetas aún no se comprenden completamente, se han logrado avances significativos en las últimas décadas.

5 Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

Durante la circulación sanguínea, las plaquetas pueden adherirse y agregarse rápidamente en los sitios de lesión vascular, formando lo que se conoce como tapón plaquetario. Las plaquetas activadas también pueden proporcionar una superficie de membrana rica en fosfatidilserina cargada negativamente que promueve la generación de trombina y por ende la coagulación de la sangre. Las plaquetas, por lo tanto, juegan un rol central en la hemostasia. Sin embargo, el mismo proceso de hemostasia puede causar también trombosis y oclusión de los vasos, siendo los mecanismos más comunes que conducen a ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares después de lesiones ateroscleróticas rotas [Hou y col., 2015]. Se mencionarán aquí brevemente los mecanismos de acción plaquetaria.

5.1.1. Plaquetas en hemostasia y trombosis

Previamente se definió a la hemostasia como el proceso fisiológico que permite detener el sangrado durante una lesión y mantener la sangre de manera fluida dentro de los vasos. La acumulación de plaquetas en el sitio de la lesión se considera la primera fase de la hemostasia, mientras que la segunda está mediada por la coagulación de la sangre [Wang y col., 2014]. Las plaquetas desempeñan un papel central en una serie de eventos secuenciales durante la formación del tapón plaquetario (es decir, la adhesión, activación y agregación de las plaquetas), además participan activamente en la generación de trombina que amplifica notablemente la cascada de coagulación de la sangre. Así, las plaquetas contribuyen tanto a la primera como a la segunda fase de la hemostasia [Wang y col., 2012, Ni y Freedman, 2003].

En la Figura 5.1 se resumen los procesos involucrados durante la agregación plaquetaria. Luego de la lesión vascular, las proteínas de la matriz subendotelial, como el colágeno, se

exponen a los componentes de la sangre. El factor de von Willebrand (VWF), originado a partir de células endoteliales, megacariocitos y plaquetas, se encuentra en el plasma sanguíneo y puede anclarse al colágeno. El receptor de VWF en las plaquetas (glicoproteína (GP)Iba), a través de la interacción con el VWF unido a colágeno, inicia posteriormente el anclaje de las plaquetas en el sitio de la lesión [Ruggeri, 1997, Ni y col., 2000]. Luego de dicho anclaje, GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$ pueden interactuar con el colágeno y generar señales de activación a las plaquetas [Ruggeri, 1997, Nieswandt y col., 2001]. Posteriormente, la adhesión estable de las plaquetas es mediada por la unión de varias integrinas a sus ligandos en la pared del vaso (por ejemplo, integrina $\alpha IIb\beta 3$ a fibrinógeno/fibrina y fibronectina, $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina o colágeno, y $\alpha 2\beta 1$ a colágeno, etc.) [Ni y Freedman, 2003, Wilkins y col., 1996, Ni y Wilkins, 1998].

Las interacciones primarias entre los receptores de la superficie de las plaquetas (por ejemplo GPIba e integrinas) y sus ligandos (por ejemplo, VWF, colágeno, fibrinógeno / fibrina, etc.) pueden conducir a la activación de las plaquetas [Wang y col., 2012]. Por otra parte, luego de la lesión vascular, se inicia la cascada de coagulación generando el factor de activación plaquetario más potente, la trombina. Mediante la escisión de los receptores activados por proteasa (PAR) y la unión a GPIba, la trombina produce activación plaquetaria [Sambrano y col., 2001].

La activación plaquetaria expone fosfatidil serina (PS) en la superficie de la membrana impulsando la generación de trombina y facilitando la activación plaquetaria adicional [Reheman y col., 2010, Yang y col., 2006]

Las señales de activación inducidas por trombina, colágeno o los ligandos de los receptores de adhesión, pueden conducir a la liberación de gránulos de plaquetas. Moléculas de adhesión plaquetaria, P-selectina, integrinas, VWF, fibrinógeno, fibronectina [Ni, 2006], vitronectina [Ni y

5 Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

Freedman, 2003], multimerina [Reheman y col., 2010], factor plaquetario 4 y aproximadamente 300 proteínas adicionales están contenidas dentro de los α -gránulos [Rao, 2013]. Los gránulos densos liberan adenosín di-fosfato (ADP) [Johnston-Cox y col., 2011]. La liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico y los gránulos densos a través del sensor de Ca^{2+} , la molécula de interacción estromal (STIM) 1, y el canal de Ca^{2+} , Orai, también contribuyen significativamente a la activación de las plaquetas [Bergmeier y Stefanini, 2009, Varga-Szabo y col., 2011]. Existen variados ciclos de retroalimentación positiva durante la activación de plaquetas / liberación de gránulos. En particular, el ADP, probablemente a través de la interacción con sus receptores en las plaquetas, inicia la generación de trombina y la activación de plaquetas / liberación de gránulos adicional. Estos eventos de secreción actúan como segundos mensajeros y, en combinación con la generación de tromboxano (Tx) A₂ y especies reactivas de oxígeno, amplifican el proceso de activación y señalización de adentro hacia afuera de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, que a su vez recluta más plaquetas para la agregación [Jin y col., 2002, Arthur y col., 2008, Carrim y col., 2014, Walsh y col., 2014, Chen y col., 2014].

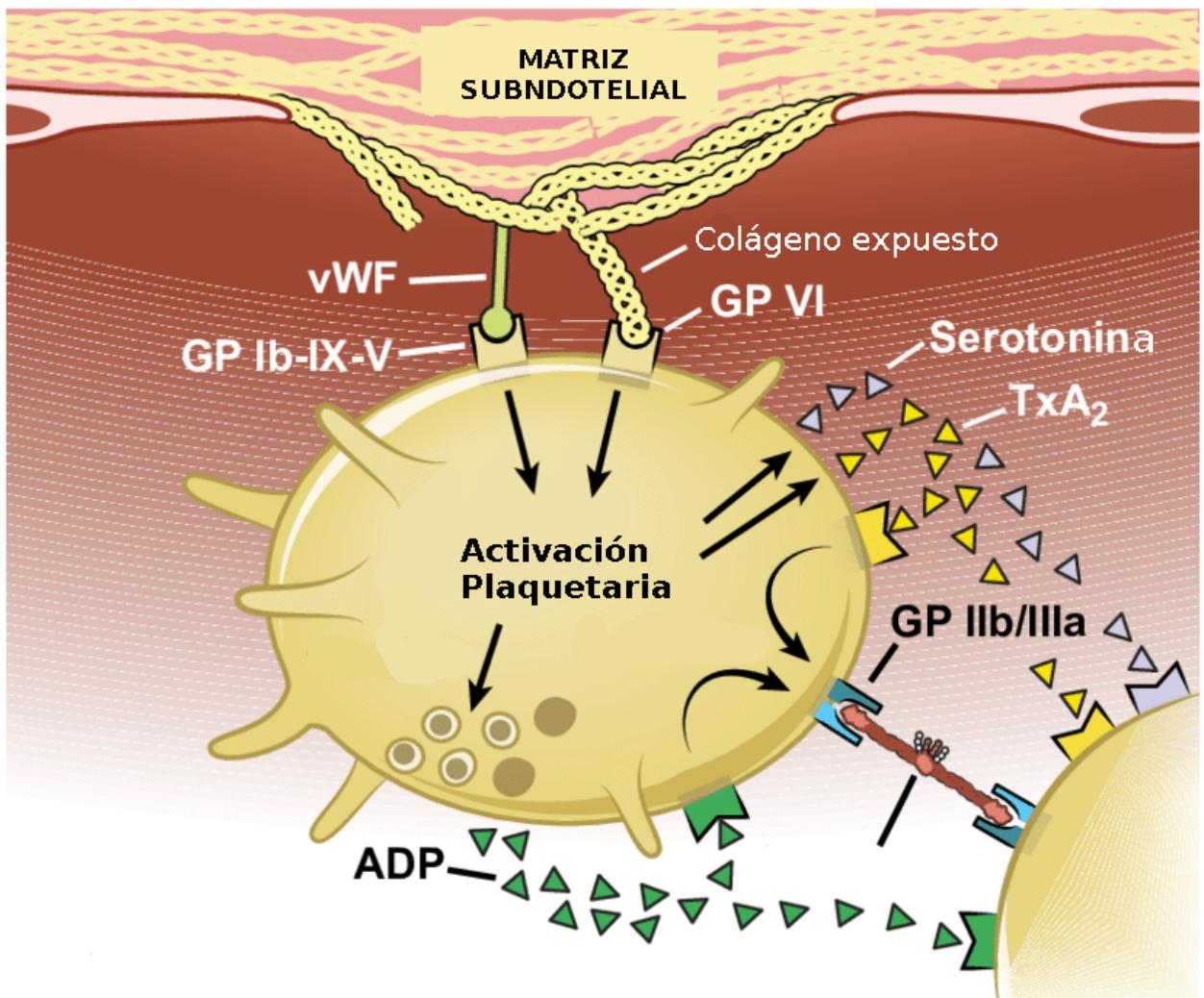


Figura 5.1: Cascada de agregación plaquetaria. La exposición de la matriz subendotelial permite la adhesión de las plaquetas a las paredes de los vasos, su activación y finalmente la agregación plaquetaria. ADP: adenósín difosfato, GP: glicoproteína; TxA₂: tromboxano A2; vWF = factor de Von Willebrand. Imagen adaptada [Halkar y Lincoff, 2016]

5.2. Resultados y discusión

Ensayos preliminares presentados en el Capítulo 3 mostraron que *StSBTc-3* inhibió la retracción del coágulo *in vitro*, al ser incubada con plaquetas lavadas humanas suplementadas con fibrinógeno y trombina. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, este ensayo resulta útil para evaluar de forma general la función plaquetaria, pero no da indicios acerca del posible mecanismo de acción. Debido a que la activación plaquetaria es un proceso sinérgico que puede iniciarse a partir de señales diversas, se requiere un estudio con agonistas específicos para cada vía de activación.

La activación plaquetaria es iniciada por la unión de los distintos agonistas a su receptor en la membrana de las plaquetas. El receptor ocupado puede entonces activarse a través de un sistema de transducción de señales, como la vía de la fosfolipasa C. Esta activación es seguida de la producción de segundos mensajeros, como inositol trifosfato y diacilglicerol, que provocan la apertura de canales de Ca^{2+} y el concomitante aumento del mismo en el citoplasma de la plaqueta. Este proceso desemboca en la excreción del contenido de los gránulos situados dentro de las plaquetas y por último la agregación plaquetaria [Francischetti y col., 1998]. El colágeno inicia la activación plaquetaria uniéndose al receptor GPVI en la membrana de la plaqueta [Roberts y col., 2004]; la convulxina es una lectina de tipo C que produce la agregación plaquetaria de manera similar al colágeno mientras que por otro lado, la trombina ejerce su acción a través de la activación de los receptores activados por proteasas PAR1 y PAR4 [Sangkuhl y col., 2011]. Por último el compuesto A231787 es un iónoforo que permite la agregación plaquetaria a través de la apertura de los canales de Ca^{2+} [de la Ossa y col., 1992].

Teniendo en cuenta lo descripto anteriormente, se realizaron ensayos para determinar la agre-

5.2 Resultados y discusión

gación plaquetaria usando 4 inductores de agregación distintos: A23187, convulxina, colágeno y trombina; con y sin el agregado de la proteasa *StSBTc-3*.

5 Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

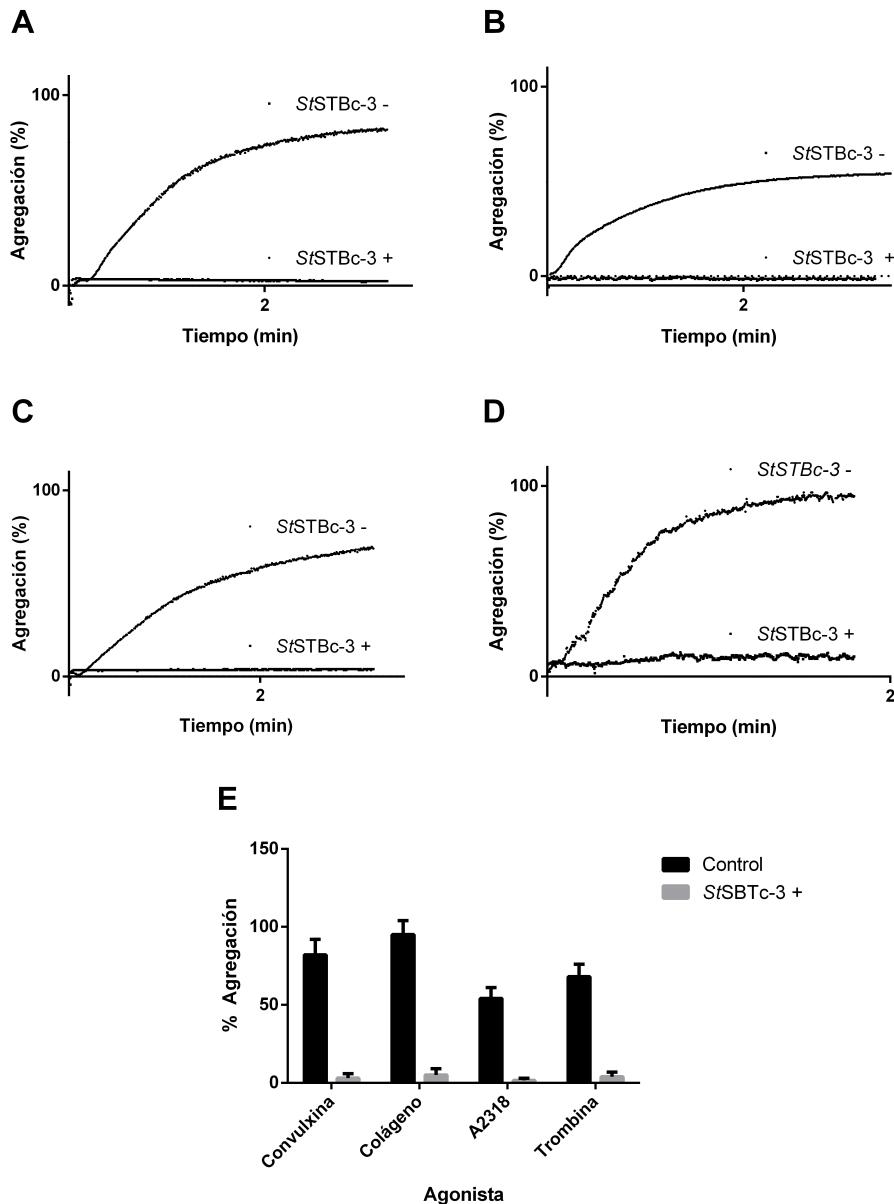


Figura 5.2: Efecto de StSBTc-3 sobre la agregación plaquetaria inducida por distintos agonistas. Se diluyeron plaquetas humanas lavadas a un valor de 3×10^8 plaquetas/ml y se preincubaron con StSBTc-3 ($1 \mu\text{M}$). Las muestras fueron supplementadas con CaCl_2 (0.7 mM). Se representa el incremento en la transmitancia (agregación plaquetaria) en función del tiempo al utilizarse (A) convulxina 0.5 U/ml , (B) A23187 $2 \mu\text{M}$, (C) trombina 0.5 U/ml y (D) colágeno 5 mg/ml como inductores de la agregación. La enzima StSBTc-3 fue agregada a las muestras 1 minuto antes que los agonistas. (E) Porcentajes de máximos de agregación alcanzados en los ensayos anteriores. Las medidas corresponden al promedio de 3 medidas diferentes. En todos los casos las diferencias respecto a los controles resultaron significativas ($P < 0,05$)

5.2 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos mostraron que *StSBTc-3* inhibió la agregación plaquetaria inducida por los 4 agonistas utilizados (Figura 5.2).

Adicionalmente, se evaluó la agregación plaquetaria inducida por trombina en función de la concentración de *StSBTc-3*. Los resultados obtenidos (Figura 5.3) mostraron que el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria inducida por trombina fue dosis-dependiente de la concentración de *StSBTc-3*.

5 Actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3*

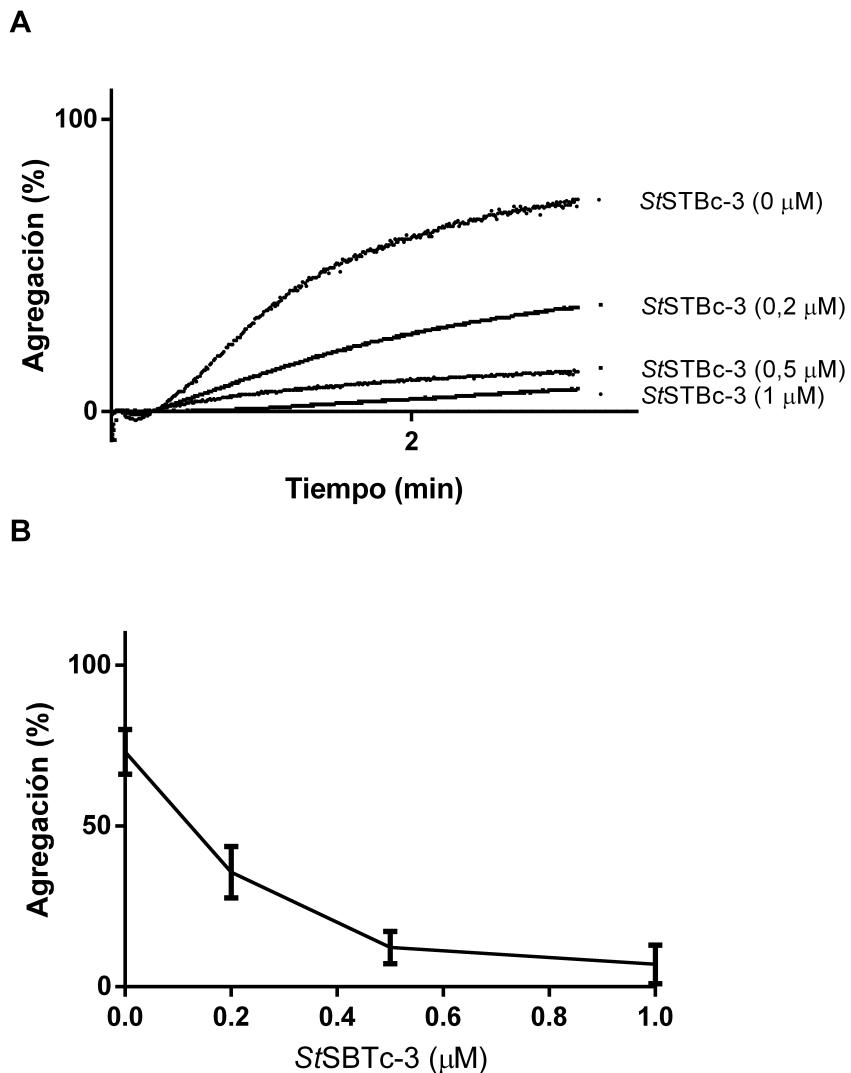


Figura 5.3: Efecto de *StSBTc-3* sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina en función de la dosis. (A): se diluyeron plaquetas humanas lavadas a un valor de 3×10^8 plaquetas/ml y se preincubaron con distintas concentraciones de *StSBTc-3* (0, 0,2, 0,5 y 1 μ M). Las muestras se complementaron con CaCl_2 (0.7 mM). Se representa el incremento en la transmitancia (agregación plaquetaria) en función del tiempo. Se utilizó trombina 0.5 U/ml como agonista. *StSBTc-3* fue agregada en las muestras 1 minuto antes que la trombina. (B): Porcentaje máximo de agregación plaquetaria alcanzado en función de la concentración de *StSBTc-3*. Las medidas corresponden al promedio de 3 medidas diferentes.

Con el objetivo de vincular la actividad proteolítica de *StSBTc-3* con la actividad antipla-

quetaria observada se realizaron ensayos incubando previamente la enzima con el inhibidor irreversible de serín proteasas PMSF, en concentraciones previamente ensayadas que garantizaran la inhibición de la actividad de la enzima [Fernández y col., 2015]. La incubación se realizó durante 2 h a 25 °C para asegurarse de que el inhibidor remanente no unido covalentemente al sitio activo de la enzima se hidrolizara, de acuerdo a lo descripto por James y col. (1978) quienes reportaron que al cabo de 1 h a 25 °C, la fracción de PMSF (100 μ M) no unida a proteasas pierde toda su actividad inhibitoria en soluciones acuosas [James, 1978]. Este procedimiento aseguró la eliminación de posibles restos de PMSF que podrían inhibir a la trombina, el agonista utilizado en estos experimentos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.4 A. Como se puede observar el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria determinado en presencia de *StSBTc-3* inhibida con PMSF fue similar al determinado para la misma concentración de *StSBTc-3* activa (no hubo diferencias significativas para un valor $P < 0,05$) (Figura 5.4 B). Este resultado sugiere que la actividad antiagregante de plaquetas de *StSBTc-3* no está relacionada con la actividad proteolítica de la enzima. Por otra parte se analizó el porcentaje de agregación plaquetaria en presencia de *StSBTc-3* desnaturizada (hervida durante 10 min) utilizando como inductor de la agregación trombina. Como se puede observar en la Figura 5.4, *StSBTc-3* no presentó actividad antiplaquetaria, por lo que se podría inferir que es necesaria su estructura terciaria para dicha actividad.

5 Actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3*

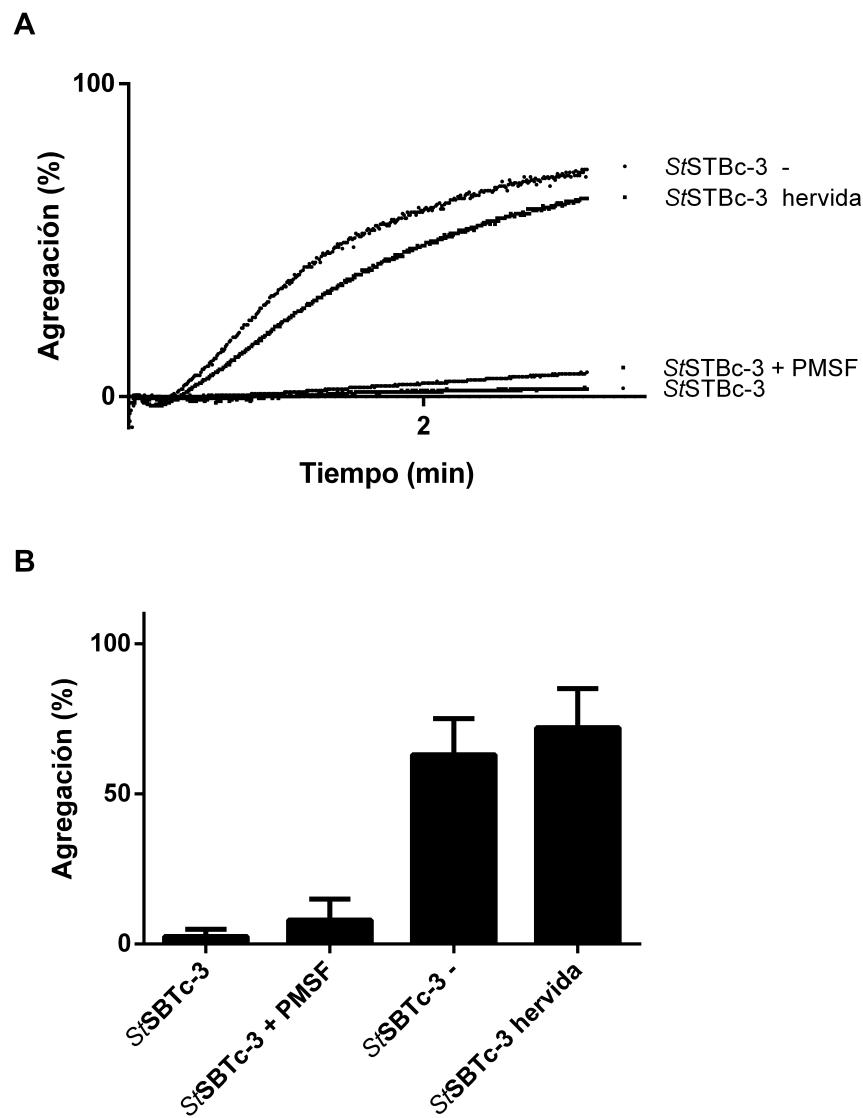


Figura 5.4: Efecto de *StSBTc-3* inhibida por PMSF y desnaturalizada sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina. **(A):** Se diluyeron plaquetas humanas lavadas a un valor de 3×10^8 plaquetas/ml y se preincubaron con *StSBTc-3* ($1 \mu\text{M}$), *StSBTc-3* hervida y *StSBTc-3* previamente inhibida con PMSF ($0,1 \text{ mM}$). Como control de la función plaquetaria se realizaron ensayos en ausencia de la enzima. Las muestras fueron suplementadas con CaCl_2 (0.7 mM final). Se representa el incremento en la transmitancia (agregación plaquetaria) en función del tiempo. Se utilizó trombina $0.5 \text{ U}/\text{ml}$ como agonista. *StSBTc-3* fue agregada en las muestras 1 minuto antes que el agonista. **(B):** Porcentajes máximos de agregación alcanzados en los ensayos anteriores. Las medidas corresponden al promedio de 3 medidas diferentes.

Para iniciar la activación plaquetaria, los agonistas activan receptores ubicados en la membrana de las plaquetas. Cada agonista posee receptores específicos, sin embargo la activación de cualquiera de ellos culmina con la liberación del Ca^{2+} en el citoplasma plaquetario. El hecho de que *StSBTc-3* inhibía la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por los agonistas A231787, convulxina, colágeno y trombina sugiere que la acción de la proteasa es posterior al incremento de Ca^{2+} en el citosol. La agregación plaquetaria se produce en última instancia cuando, luego de la liberación del Ca^{2+} , se activa el receptor $\alpha 2b\beta 3$ que concluye en la unión del mismo al fibrinógeno (previa liberación de los gránulos de las plaquetas durante la activación). El fibrinógeno crea así un "puente" que une a las plaquetas entre sí permitiendo la agregación [Sangkuhl y col., 2011].

Previamente se mostró que *StSBTc-3* posee actividad fibrinogenolítica. Sin embargo, dicha actividad no puede explicar por sí sola la inhibición de la agregación plaquetaria debido a que los resultados obtenidos para la enzima inhibida con PMSF no mostraron restitución de la agregación plaquetaria significativa (Figura 5.4). Esto sugiere que la falta de agregación es independiente (o por lo menos no depende totalmente) de la actividad proteolítica. Por otro lado, el tiempo de incubación de la proteasa con las plaquetas lavadas para la realización de los ensayos de agregación fue de 1 min. La cinética descripta para la actividad fibrinogenolítica en el Capítulo 3 mostró que los tiempos necesarios para observar actividad fibrinogenolítica fueron mayores (de 30 min a 2 h). Esto, sumado al hecho de que las muestras fueron suplementadas con fibrinógeno en exceso, parecería indicar que si bien la actividad proteolítica podría explicar la actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3* no parece ser el factor que más contribuye a la misma. Por lo tanto, estos resultados avalarían la hipótesis de que *StSBTc-3* podría actuar como

5 Actividad antiplaquetaria de StSBTc-3

un inhibidor del receptor $\alpha 2b\beta 3$ impidiendo la unión del mismo al fibrinógeno y evitando así la agregación plaquetaria. Dicha hipótesis permitiría explicar la inhibición de la agregación, incluso en ausencia de actividad proteolítica. El hecho de hervir la enzima previamente a la incubación con las plaquetas (Figura 5.4) podría haber generado un cambio conformacional en la estructura terciaria de la proteasa, impidiendo que cierto dominio de StSBTc-3 se una al receptor en la superficie de las plaquetas y evitando así la inhibición plaquetaria. Esta hipótesis será explorada en el Capítulo 6.

5.3. Conclusiones

StSBTc-3 inhibió la retracción del coágulo y la agregación plaquetaria inducida por trombina, colágeno, el ionoforo A23187 y convulxina. La trombina, la convulxina y el colágeno actúan al comienzo de la cascada de señalización que produce la agregación plaquetaria, activando receptores específicos en la membrana de las plaquetas. Por otro lado, el ionóforo A23187 actúa al final de la vía de señalización provocando la apertura de los canales de calcio. El hecho de que StSBTc-3 mostró inhibición plaquetaria frente a los cuatro agonistas utilizados, sumado a la ausencia de retracción del coágulo formado *in vitro* (Capítulo 3), sugiere que la enzima podría estar actuando como un inhibidor de la glicoproteína $\alpha 2b\beta 3$ al impedir su unión al fibrinógeno. El aporte de la actividad fibrinogenolítica al mecanismo de inhibición de agregación plaquetaria de StSBTc-3 fue descartado ya que los ensayos realizados con la enzima previamente inactivada con PMSF mostraron que aún en presencia de la enzima inhibida no hay agregación plaquetaria.

Bibliografía

- [Arthur y col., 2008] Arthur, J. F., Gardiner, E. E., Kenny, D., Andrews, R. K., y Berndt, M. C. (2008). Platelet receptor redox regulation. *Platelets*, 19(1):1–8.
- [Bergmeier y Stefanini, 2009] Bergmeier, W. y Stefanini, L. (2009). Novel molecules in calcium signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7:187–190.
- [Carrim y col., 2014] Carrim, N., Walsh, T. G., Consonni, A., Torti, M., Berndt, M. C., y Metharom, P. (2014). Role of focal adhesion tyrosine kinases in gpvi-dependent platelet activation and reactive oxygen species formation. *PloS one*, 9(11):e113679.
- [Chen y col., 2014] Chen, W., Thielmann, I., Gupta, S., Subramanian, H., Stegner, D., Van Kruchten, R., Dietrich, A., Gambaryan, S., Heemskerk, J., Hermanns, H., y col. (2014). Orai1-induced store-operated ca²⁺ entry enhances phospholipase activity and modulates canonical transient receptor potential channel 6 function in murine platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(4):528–539.
- [de la Ossa y col., 1992] de la Ossa, J. C., Malago, M., y Gewertz, B. L. (1992). Neutrophil-

Bibliografía

- endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. *Journal of Surgical Research*, 53(1):103–107.
- [Fernández y col., 2015] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a solanum tuberosum subtilisin-like protein with caspase-3 activity (stsbtc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86:137–146.
- [Flevaris y col., 2009] Flevaris, P., Li, Z., Zhang, G., Zheng, Y., Liu, J., y Du, X. (2009). Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel rac1-mapk-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*, 113(4):893–901.
- [Francischetti y col., 1998] Francischetti, I., Carlini, C., y Guimaraes, J. (1998). Human platelets activation by convulxin is accompanied by tyrosyl-phosphorylation of plcgamma2 and occurs independently of integrin alpha1bbeta3. *Platelets*, 9(3-4):185–189.
- [Halkar y Lincoff, 2016] Halkar, M. y Lincoff, A. M. (2016). Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How long to continue? *Cleveland Clinic journal of medicine*, 83(9):675–688.
- [Hou y col., 2015] Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, R. C., Marshall, A., y Ni, H. (2015). Platelets in hemostasis and thrombosis: novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *Journal of biomedical research*, 29(6):437.
- [James, 1978] James, G. T. (1978). Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical biochemistry*, 86(2):574–579.

- [Jin y col., 2002] Jin, J., Quinton, T. M., Zhang, J., Rittenhouse, S. E., y Kunapuli, S. P. (2002). Adenosine diphosphate (adp)-induced thromboxane a₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin $\alpha IIb\beta 3$ and adp receptors. *Blood*, 99(1):193–198.
- [Johnston-Cox y col., 2011] Johnston-Cox, H. A., Yang, D., y Ravid, K. (2011). Physiological implications of adenosine receptor-mediated platelet aggregation. *Journal of cellular physiology*, 226(1):46–51.
- [Ni, 2006] Ni, H. (2006). Unveiling the new face of fibronectin in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(5):940–942.
- [Ni y col., 2000] Ni, H., Denis, C. V., Subbarao, S., Degen, J. L., Sato, T. N., Hynes, R. O., y Wagner, D. D. (2000). Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von willebrand factor and fibrinogen. *The Journal of clinical investigation*, 106(3):385–392.
- [Ni y Freedman, 2003] Ni, H. y Freedman, J. (2003). Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfusion and Apheresis Science*, 28(3):257–264.
- [Ni y Wilkins, 1998] Ni, H. y Wilkins, J. A. (1998). Localisation of a novel adhesion blocking epitope on the human $\beta 1$ integrin chain. *Cell adhesion and communication*, 5(4):257–271.
- [Nieswandt y col., 2001] Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H., y Fässler, R. (2001). Glycoprotein vi but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal*, 20(9):2120–2130.

Bibliografía

- [Rao, 2013] Rao, A. K. (2013). Inherited platelet function disorders: overview and disorders of granules, secretion, and signal transduction. *Hematology/Oncology Clinics*, 27(3):585–611.
- [Reheman y col., 2010] Reheman, A., Tasneem, S., Ni, H., y Hayward, C. P. (2010). Mice with deleted multimerin 1 and α -synuclein genes have impaired platelet adhesion and impaired thrombus formation that is corrected by multimerin 1. *Thrombosis research*, 125(5):e177–e183.
- [Roberts y col., 2004] Roberts, D. E., McNicol, A., y Bose, R. (2004). Mechanism of collagen activation in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19):19421–19430.
- [Ruggeri, 1997] Ruggeri, Z. M. (1997). Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thrombosis and haemostasis*, 78(01):611–616.
- [Sambrano y col., 2001] Sambrano, G. R., Weiss, E. J., Zheng, Y.-W., Huang, W., y Coughlin, S. R. (2001). Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, 413(6851):74.
- [Sangkuhl y col., 2011] Sangkuhl, K., Shuldiner, A. R., Klein, T. E., y Altman, R. B. (2011). Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(8):516.
- [Suzuki-Inoue y col., 2007] Suzuki-Inoue, K., Hughes, C. E., Inoue, O., Kaneko, M., Cuyun-Lira, O., Takafuta, T., Watson, S. P., y Ozaki, Y. (2007). Involvement of src kinases and $plc\gamma 2$ in clot retraction. *Thrombosis research*, 120(2):251–258.
- [Valgimigli y col., 2017] Valgimigli, M., Bueno, H., Byrne, R. A., Collet, J.-P., Costa, F., Jepps-son, A., Jüni, P., Kastrati, A., Kolh, P., Mauri, L., y col. (2017). 2017 esc focused update on

- dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with eacts. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 53(1):34–78.
- [Varga-Szabo y col., 2011] Varga-Szabo, D., Braun, A., y Nieswandt, B. (2011). Stim and orai in platelet function. *Cell calcium*, 50(3):270–278.
- [Walsh y col., 2014] Walsh, T., Berndt, M., Carrim, N., Cowman, J., Kenny, D., y Metharom, P. (2014). The role of nox1 and nox2 in gpvi-dependent platelet activation and thrombus formation. *Redox biology*, 2:178–186.
- [Wang y col., 2012] Wang, Y., Andrews, M., Yang, Y., Lang, S., W Jin, J., Cameron-Vendrig, A., Zhu, G., Reheman, A., y Ni, H. (2012). Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*, 12(2):126–132.
- [Wang y col., 2014] Wang, Y., Reheman, A., Spring, C. M., Kalantari, J., Marshall, A. H., Wolberg, A. S., Gross, P. L., Weitz, J. I., Rand, M. L., Mosher, D. F., y col. (2014). Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(10):4281–4293.
- [Wilkins y col., 1996] Wilkins, J. A., Li, A., Ni, H., Stupack, D. G., y Shen, C. (1996). Control of integrin function localization of stimulatory epitopes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(6):3046–3051.
- [Yang y col., 2006] Yang, H., Reheman, A., Chen, P., Zhu, G., Hynes, R., Freedman, J., Wagner, D., y Ni, H. (2006). Fibrinogen and von willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(10):2230–2237.

6 Expresión de *StSBTc-3* en *E. coli*

6.1. Introducción

Previamente, Fernandez y col. (2015) purificaron y caracterizaron una serín proteasa de *Solanum tuberosum* denominada *StSBTc-3*. La proteína en estudio fue secuenciada por MALDI TOF-TOF. Las búsquedas mediante BLASTp y BLASTn contra la base de datos del genoma de papa reveló 100 % de identidad con una subtilisina de *Solanum tuberosum* (ID del transcripto y la proteína: PGSC0003DMT400027148 y PGSC0003DMP400018521 respectivamente). La proteína fue clasificada como una subtilisin proteasa perteneciente a la subfamilia S8 de serín proteasas. Hasta la fecha la base de datos de papa contiene diversas secuencias de subtilisinas predichas a partir de ARNm derivados del genoma secuenciado, pero no hay reportes de proteómica o transcriptómica realizados en papa, sin embargo la secuencia aminoacídica deducida para *StSBTc-3* mostró homología con SBT3 y SBT1 de tomate [Fernández y col., 2015].

Con el objetivo de profundizar el estudio de las propiedades farmacológicas y clínicas se decidió clonar y expresar en un sistema heterólogo (*E. coli*) la proteasa *StSBTc-3*. Esta decisión se tomó teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido mediante el proceso de purificación [Fernández y col., 2012].

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Clonado de *StSBTc-3*

Como primera estrategia de clonado de *StSBTc-3* se diseñaron primers teniendo en cuenta el marco abierto de lectura (1,7 Kpb) correspondiente a la secuencia nucleotídica (PGSC0003DMT400027148) previamente relacionada con *StSBTc-3* [Fernández y col., 2015].

Como templado, se utilizó ADNc proveniente de hojas de papa. La secuencia de los primers (PF1 y PR2) y los vectores utilizados se indican en el Capítulo de Materiales y Métodos.

Los intentos de amplificación del mismo a partir de ADNc de hojas de *Solanum tuberosum* no fueron exitosos. Se realizaron numerosas pruebas cambiando las condiciones de amplificación (Tm entre 45 y 70 °C, templado entre 0,01 y 1 µg), sin embargo no se logró obtener ningún producto de amplificación.

Como segunda estrategia de clonado se decidió utilizar como templado ADN genómico aislado a partir de tubérculos de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. Esta estrategia se basó en un trabajo previamente reportado por Meichtry y col. (1999) quienes realizaron una caracterización de las secuencias nucleotídicas correspondientes a la familia de subtilasas de tomate a partir del análisis de librerías de ADNc, encontrando 12 nuevas subtilasas que mostraron no poseer intrones, entre las cuales se encontraron SBT1 y SBT3 [Meichtry y col., 1999]. A partir de estos resultados y basados en la homología entre las subtilasas de tomate y de papa [Norero y col., 2016] se decidió utilizar ADN genómico como templado para la amplificación de la porción del gen codificante de *StSBTc-3* por PCR.

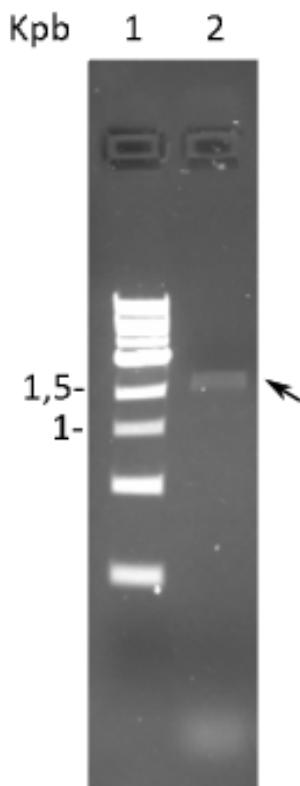


Figura 6.1: Análisis en gel de agarosa (0.75 %) del producto de PCR purificado. Calle 1: marcadores de peso molecular (1Kb), calle 2: amplicón correspondiente al gen codificante de *StSBTc-3*. La banda se indica con una flecha.

Como puede observarse en la Figura 6.1, al utilizar ADN genómico como templado para la amplificación por PCR se obtuvo una banda del peso molecular esperado (1,9 Kpb). El fragmento amplificado se clonó en el vector pProEX-HTb (Qiagen) y el producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* rosetta (DE3) de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. La selección de colonias de *E. coli* transformadas se realizó en agar LB mediante el agregado de cloranfenicol y ampicilina según lo establecido en Materiales y Métodos. Posteriormente se purificó ADN plasmídico de las colonias seleccionadas, confirmándose la construcciones por secuenciación (*Macrogen sequencing service*).

Como resultado de la secuenciación del producto de amplificación (Figura 6.1) se obtuvo un

6 Expresión de StSBTc-3 en *E. coli*

ADNc de 1970 pb cuya secuencia de nucléótidos se muestra en la Figura 6.2. Se puede observar

la presencia de los péptidos trípticos previamente identificados por Fernández y col. (2015).

```

1      M V E A H T T H T S E F L K L N P A S G L W P A S G F G Q D V I I G
1      ATGGTTGAAGCTCACACAACTCATACCTCAAGCTTCTTAAGCTCAATCCTGCATCTGACTATGGCCAGCTTCTGCTTTGGTCAGATGTTATCATCG
35     V L D S G V W P E S A S F S E D G L P E I P K R W K G I C K A G T
101    GTGTACTCGACTCTGGTGTGCCAGAACTGCTAGTTCAAGGATGGATTGCCTAATTCCAAAAGGTGGAAGGGAATTGCAAGGCAGGAAC
68     D F N S S L C N R K I I G A N Y F N K G I L A D N P T V N I S M N
201    AGATTTAATTCTCATTGTAACAGAAAATCATTGGGCTAATTATTCAACAAAGGATTTGGCTGATAATCCTACTGTGAATATTCAATGAAT
101    S A R D T R G H G T H V A S I A A G N F A K G A S Y F G Y A T G T A
301    TCTGCAAGGGATACTAGAGGTCATGGAACACATGTTGCCCCCATTGCTGCTGGTAATTTTGCTAAAGGCGCTTCATATTGGATATGCTACTGGAACAG
135    R G M A P R A R I A V Y F N S E E G T F T S D L I A A M D Q A V
401    CAAGAGGTATGGGCCCACAGGCTAGGATAGCTGTATAAGTTAGCTTGGAGAAGGAACCTTCACTCTGATTTAATTGCTGCAATGGATCAAGCTGT
168    A D G V D I I T I S Y G W V R I P V Y Q D S I A I A S F G A M M K
501    TGCAGATGGTGTGACATAATAACTATTCTTATGGGGGGTTAGGATCCAGTGTATCAAGATTCAATTGCGATAGCTCTTGGTGCCATGATGAAA
201    G V L I S A S A G N S G P E M G T I N N G V P W I F T V A S C S T D
601    GGTGCTTAATCTGCTTCAGCTGAAATAGTGGCCCTGAAATGGGAACTATAAAATGGTGTCCTTGGATCTTACTGTGGCGTCATGCAGTACTG
235    R A F Y G T L T L G N G V N I T G F S L P V K T I I K N F P V L
701    ATCGAGCATTCTATGGGACTTAACTCTTGGGATGGCTAAATATTACTGGATTAGCTTCCAGTGTAAACATCATCAAGAATTTCCAGTGCT
268    Y N E S I S P C D S S D V L A K V P N G G R S I M I C F S N A V E
801    TTACAACGAAAGTATATCACCTGTGATTCATCTGATGTTAGCCAAGTCCTTAAGTGGACGTAGCATTATGATTGTTTAGTAATGCAGTAGAA
301    V E D Q M A A I S E S K F G G A I Y I S D D P D V L S S N F F P N P
901    GTAGAGGACCAAATGGCGCGTCAGAGTCGAAATTTGGAGGAGCCATTATATTCTGATGATCCAGATGTATTGTCATCCAATTTTTCCAAATC
335    G V V I S T K E G K Q V I D Y A T K S A K P K V S L S F Q G T R I
1001   CTGGAGTTGATTAGCAAGGAAGGAAACAGTGATAGACTATGCAACAAAGTGCTAACCAAAAGTCAGGCTCAGTTTGGAAACACGTA
368    D V K P A P A V S A F F S S R G P S L S Y L Q V A K P D I M A P G E
1101   TGATGTAACGCCTGCTCCGGCTTGTGCTGTGCATTTCTGAGAGGCCCCTCTAAGCTATCTGCAAGTGAGCAAGCCAGATATTATGGCACCAGGAGAG
401    L I L A A W P S N N S D T V I G V N T F L G S D Y R L V S G T S M A
1201   TTAATTCTAGCAGCTGGCCATCAAACATTCAGATACAGTTATTGGTGTCATACATTTGGTAGTGATTACCGCTTGTTAGGTACTTCCATGG
435    A P H I A G I A A M L K G A H P D W S P S A I R S A M M T T A N H
1301   CTGCTCCTCACATTGCTGGATCGCAATGCTAAGGAGCACTCTGATTGGAGCTCTAGCTATTGATCTGCCCATGATGACCATGCAACCA
468    L D N T K N P I K T E D G N S N T T S L A M G A G L V D P N R A V
1401   TTTGGATAATACTAAAACCCCATCAAACCGAGGATGTGAACGAATACTACATCATTAGCTATGGGAGCCGGACTTGTGATCCAAACCGTGCAGTT
501    D P G L I Y D A T P Q D Y V N L L C S M N F T L E Q F N T I A R S S
1501   GATCCAGGCTGATATATGATGCCACTCCACAAGACTATGTGAATCTCTGCTCATGATTTACACTAGAGCAATTCAATACAATTGCTAGATCAT
535    A K H N C S N P S D D I N Y P S F I A L F S P I G K Y S R L E K K
1601   CAGCTAAACACAACTGTCAATCCATGTGATGATATTACCCATCTTATTGCTCTTAGGCCAATTGGGAAACTCTAGGTTGGAGAAGAA
568    F R R T V T N V G A G A A K Y V A K V I A P K S S T I S I S P Q
1701   ATTCAAGGCCAGCTCACAATGTGGAGCCGGTGCAGCTAAGTATGTAGCAAAAGTGATAGCAAAAGCTGACAATTCCATCTCCACAAAC
601    L V F E K K N Q K Q D Y T L T I R Y K G I A D D Q A Q S G S I T W V
1801   TTAGTGTTGAGAAGAAAATCAGAAGCAGGACTACTCTTACCATACGTTACAAAGGCATTGCAGATGCACCAAGCACAATCTGGTTCAATCACTGGG
635    E E N G H H T V R S P I V V A P A L D A W T *
1901   TTGAAGAGAACGGTCATCACCCGTAAGAAGTCCTATAGTAGTTGCTCCAGCGTTTGATGCCGACTGA

```

Figura 6.2: Secuencia nucleotídica y aminoacídica predicha de *StSBTc-3* recombinante. En gris se indica la posición de los primers en la secuencia (PF1, PR2 y PR1 según avanza la numeración de nucleótidos). La secuencia específica de los mismos se indica en el capítulo de Materiales y Métodos. En naranja se indica el sitio de la secuencia de aminoácidos predicha donde alinean los trípticos previamente reportados por Fernandez y col. 2015.

La secuencia aminoacídica deducida para *StSBTc-3* se alineó con las proteínas de la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI mediante BLASTp. Con los resultados obtenidos de la alineación se construyó una base de datos contenido sólo las proteínas que presentaron

un porcentaje de similitud mayor al 90 %. Se alinearon las secuencias de la base de datos con el software MUSCLE, posteriormente el alineamiento fue curado buscando eliminar huecos y secciones con pobres alineamientos y finalmente se realizó el análisis filogenético con PhyML. En la Figura 6.3 se muestra el algoritmo empleado para la construcción de la filogenia, en la sección de Materiales y Métodos se describe en detalle el procedimiento utilizado.

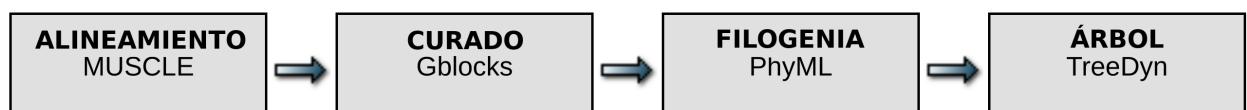


Figura 6.3: Esquema del procesamiento de secuencias proteicas y análisis filogenético

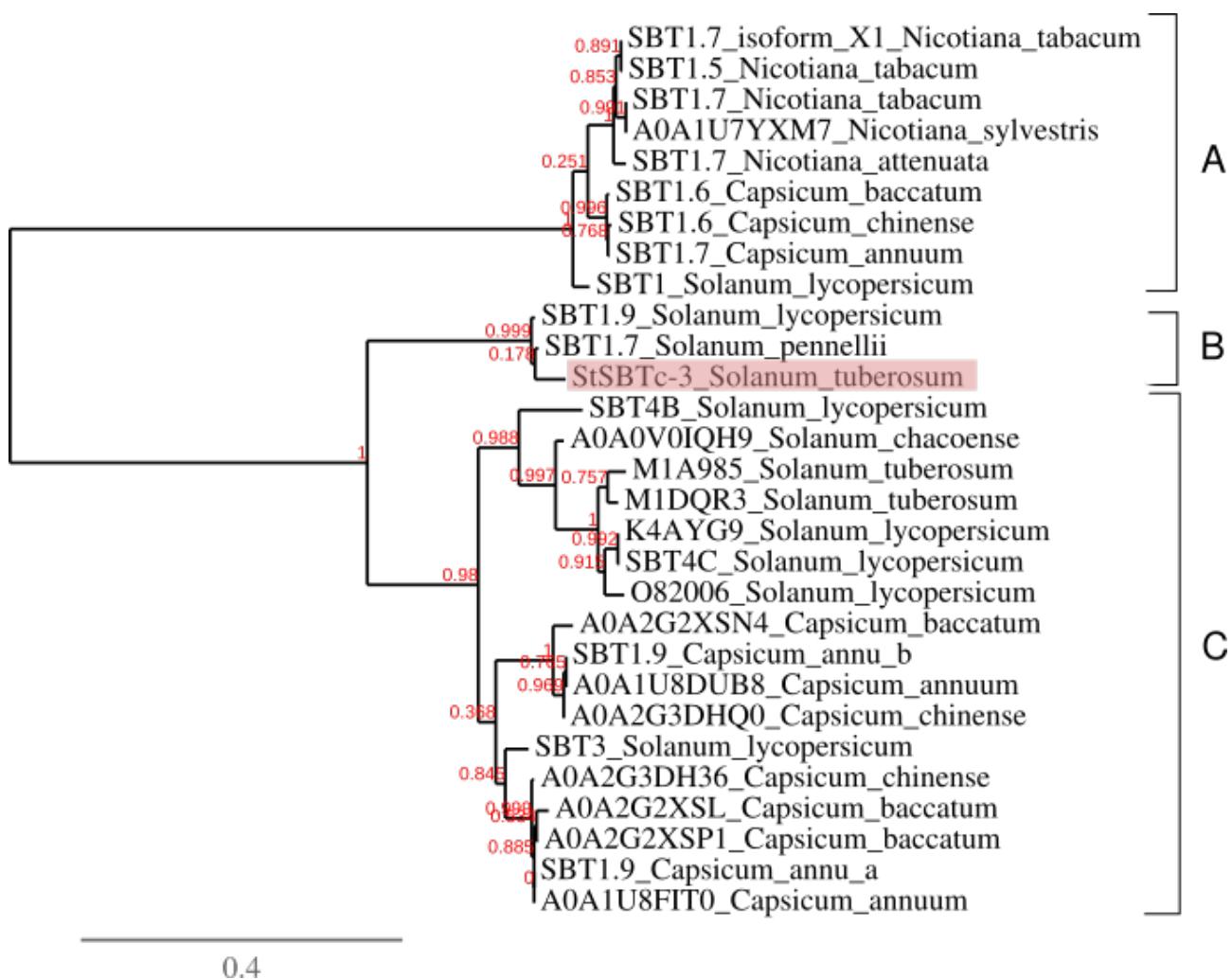


Figura 6.4: Análisis filogenético. Se muestra el árbol filogenético correspondiente a *StSBTc-3* (en rojo) y a las subtilasas que presentaron un porcentaje de homología mayor al 90 %. Los alineamientos de secuencias y las ramificaciones del árbol fueron construidas según los establecido en Materiales y Métodos. Se utilizó el método de máxima verosimilitud implementado en PhyML (v3.1/3.0 aLRT). Los valores de *bootstrap* se indican sobre los respectivos nodos. Con A, B y C se indican los clados principales obtenidos.

El árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 6.4. Se observó que *StSBTc-3* se encuentra emparentada con otras subtilasas de plantas como *Solanum lycopersicum* (tomate), *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Capsicum spp.* (ají). A partir del análisis del árbol filogenético obtenido se vio que las proteasas estudiadas se agrupan en 3 grandes clados, los cuales tie-

6.2 Resultados y discusión

nen características similares en la arquitectura de sus dominios. El clado A agrupa a todas las subtilisinas de *Nicotiana spp.*, SBT1.6, y SBT1.7 de *Capsicum spp.* y SBT1 de *Solanum lycopersicum*. El clado B contiene a *StSBTc-3* junto con SBT1.7 de *Solanum lycopersicum* y SBT1.9 de *Solanum pennellii*. Por último, el clado C incluye el resto de las secuencias, conteniendo solamente proteínas pertenecientes a *Solanum spp.* y *Capsicum spp.*. El análisis mostró que las subtilisinas de *Nicotiana spp.*, SBT1.6 y SBT1.7 de *Capsicum spp.* y SBT1 de *Solanum lycopersicum* se encuentran más cercanas entre sí y en conjunto a mayor distancia filogenética del resto de las secuencias analizadas. Por otro lado *StSBTc-3* se encuentra más cercanamente emparentada con las subtilisinas de tomate como se observó en el alineamiento representado en la Figura 6.5.

6 Expresión de StSBTc-3 en *E. coli*

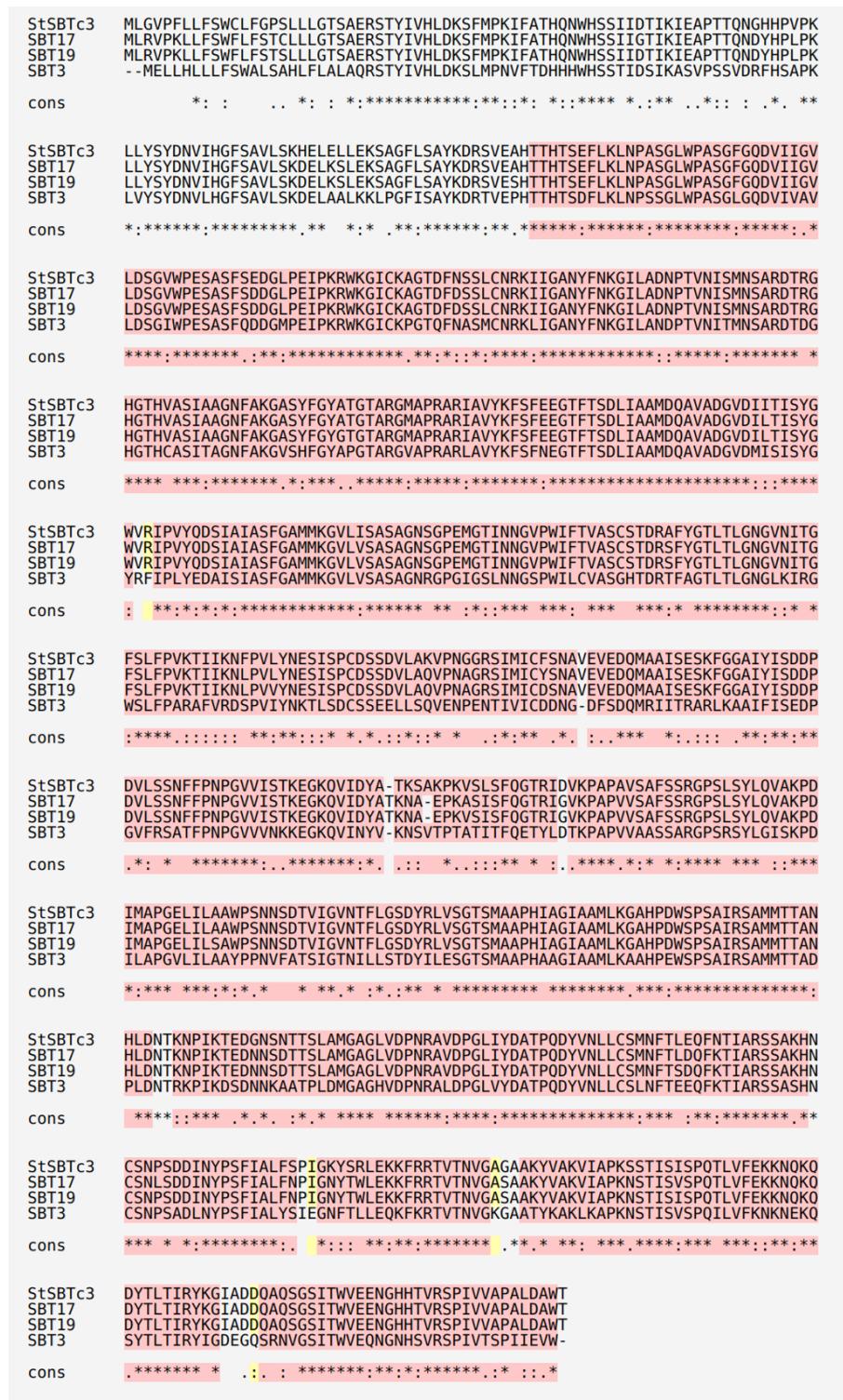


Figura 6.5: Alineamiento múltiple de secuencias. Comparación de las secuencias aminoacídicas de StSBTc-3 de *Solanum tuberosum*, SBT1.7 de *Solanum pennelli*, SBT1.9 y SBT3 de *Solanum lycopersicum*. El alineamiento se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos. En rojo se indican las regiones de las secuencias que presentan mayor solapamiento.

Utilizando Pfam [El-Gebali y col., 2018] se identificaron los dominios conservados en la secuencia de *StSBTc-3* (Figura 6.6).



Figura 6.6: Asignación de dominios para *StSBTc-3*. Los dominios fueron asignados mediante HmmerWeb versión 2.31.0 [Potter y col., 2018]. Peptidasa S8: dominio proteasa (aminoácidos 28 al 492) conteniendo el sitio activo (aminoácidos marcados con rombos violeta); fn3: dominio de fibronectina tipo III (aminoácidos 545 al 648).

Se observó la presencia del dominio subtilasa S8 característico de las proteasas del tipo subtilisina. A su vez, se identificó la región C-terminal con el dominio Fibronectina III. Este dominio fue descripto previamente también para la subtilasa de tomate SBT3 por Ottmann y col. (2009). De las proteasas mencionadas en el árbol filogenético (Figura 6.4), SBT3 es la única que se encuentra cristalografiada a la fecha [Ottmann y col., 2009]. Los autores mostraron que este dominio es fundamental para estabilizar a la proteína en solución [Ottmann y col., 2009].

6.2.2. Expresión y purificación de *StSBTc-3*

La expresión de la proteína recombinante se indujo con IPTG 0,1 M durante 4 hs (Figura 6.7A). Se observó en la Figura 6.7A, la presencia de una banda intensa de aproximadamente 65 kDa en la calle 3 (señalada con una flecha), correspondiente al lisado de colonias supplementadas con IPTG. En la calle 2, correspondiente al lisado de bacterias sin agregado de IPTG, dicha banda no se observó, sugiriendo que la misma corresponde a la proteína recombinante. La Figura 6.7B corresponde a la purificación de la proteasa presente en la fracción soluble del lisado. Teniendo en cuenta que el vector pProEX-HTb agrega Histidinas en el N-terminal de

6 Expresión de *StSBTc-3* en *E. coli*

la secuencia clonada, la proteína pudo ser purificada por cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA (Capítulo Materiales y Métodos). Se obtuvo una banda de aproximadamente 65 kDa en el eluido (Figura 6.7B) que resultó consistente con el peso esperado para *StSBTc-3* madura (70 kDa). Por lo tanto, una fracción de la proteína *StSBTc-3* recombinante obtenida pudo ser recuperada de la fracción soluble del lisado.

Se realizó un pool con las fracciones del eluido contenido la banda pura y se dializó el mismo contra buffer Tris-HCl 50 mM. Con esta fracción se realizaron los ensayos de actividad enzimática (Materiales y Métodos).

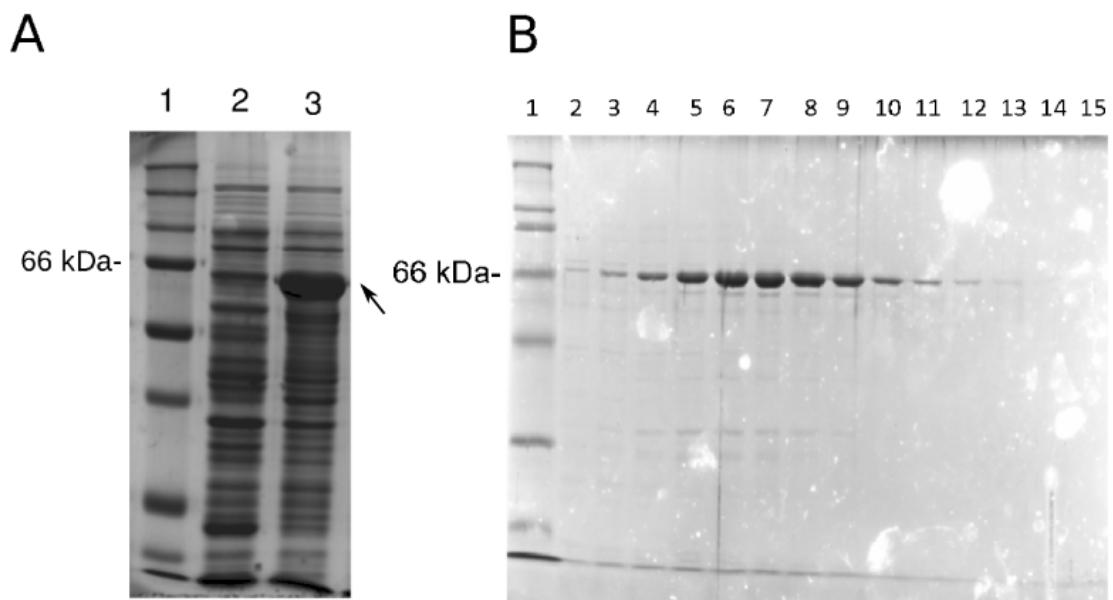


Figura 6.7: Análisis en geles de poliacrilamida de la expresión y purificación de *StSBTc-3* recombinante. **A:** SDS-PAGE 10 % correspondiente al lisado de colonias transformadas con la porción del gen codificante de *StSBTc-3* madura. Calle 1: marcadores de peso molecular; calles 2: lisado de colonias transformadas sin IPTG; calle 3: lisado de colonias transformadas con IPTG 0,1M. **B:** Eluido de la columna Ni-NTA de la fracción soluble del lisado de colonias transformadas inducidas con IPTG. Las proteínas unidas fueron eluídas con imidazol 50 mM (calles 2 a 15).

6.2.3. Actividad de *StSBTc-3* recombinante

Con el objetivo de determinar la actividad de la proteína recombinante obtenida se evaluó la actividad azocaseinolítica, fibrinogenolítica y antiagregante de plaquetas. En la Tabla 6.1 se resumen los resultados obtenidos. En primera instancia se evaluó actividad general de proteasas, con el fin de determinar con un método rápido y sencillo si la enzima recuperada presentaba actividad. Se utilizó Azocaseína como sustrato, según lo descripto en Materiales y Métodos. Se ensayaron distintas concentraciones de enzima (0,1; 1; 10 y 100 μM), sin embargo no se observó actividad azocaseinolítica para ninguna de las concentraciones evaluadas. Además se ensayaron las mismas concentraciones de *StSBTc-3* con el sustrato fibrinógeno para determinar la actividad fibrinogenolítica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.8.

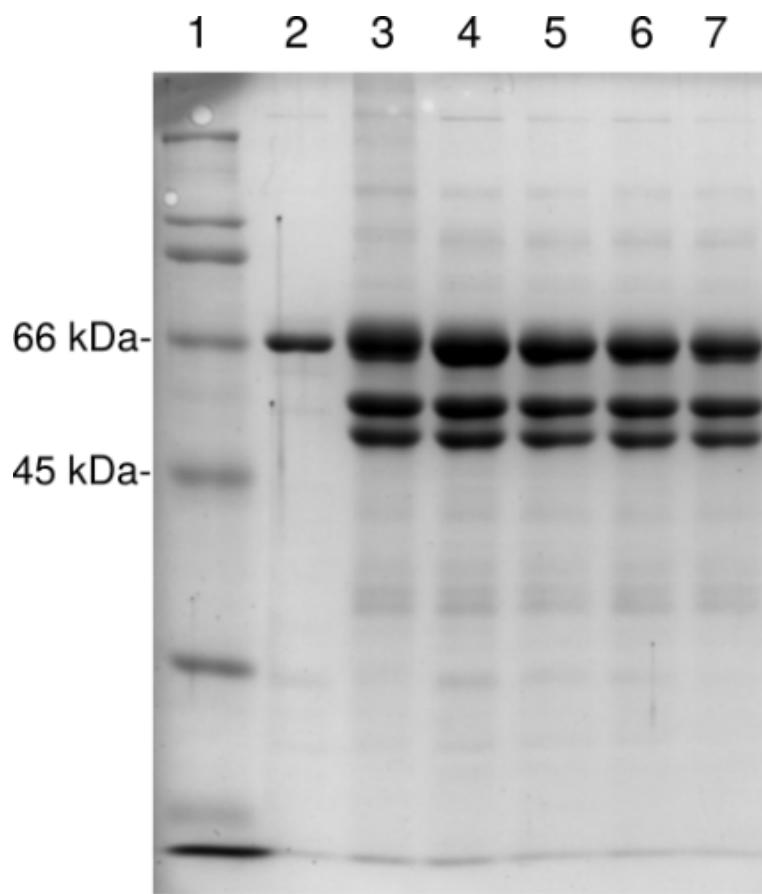


Figura 6.8: Actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3* recombinante en función de la concentración. Se muestran los patrones de bandas obtenidos en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %. Se incubaron 40 μ g de fibrinógeno con diferentes concentraciones de *StSBTc-3* recombinante durante 2 h a 37 °C. Calle 1: marcadores de peso molecular; calle 2: *StSBTc-3* recombinante 100 μ M; calle 3: fibrinógeno incubado con *StSBTc-3* recombinante 10 μ M; calle 4: fibrinógeno incubado con *StSBTc-3* recombinante 1 μ M; calle 5: fibrinógeno incubado con *StSBTc-3* recombinante 10 μ M; calle 6: fibrinógeno incubado con *StSBTc-3* recombinante 0,1 μ M; calle 7: fibrinógeno incubado en ausencia de *StSBTc-3* recombinante.

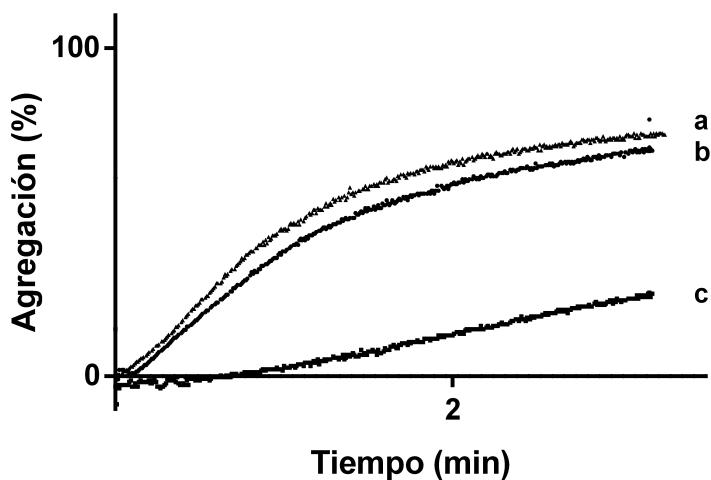
En la Figura 6.8 pueden observarse las tres bandas correspondiente a las tres cadenas de fibrinógeno (α : 65 kDa, β : 57 kDa y γ : 48 kDa). Para ninguna de las incubaciones de fibrinógeno con *StSBTc-3* se observó desaparición de alguna de las bandas correspondientes a cada cadena del sustrato. Por lo tanto *StSBTc-3* recombinante no presentó actividad fibrinogenolítica en las

6.2 Resultados y discusión

concentraciones ensayadas.

Con el fin de evaluar el efecto de *StSBTc-3* recombinante sobre la función plaquetaria, se estudio la agregación de plaquetas lavadas en presencia y ausencia de *StSBTc-3* recombinante.

A



B

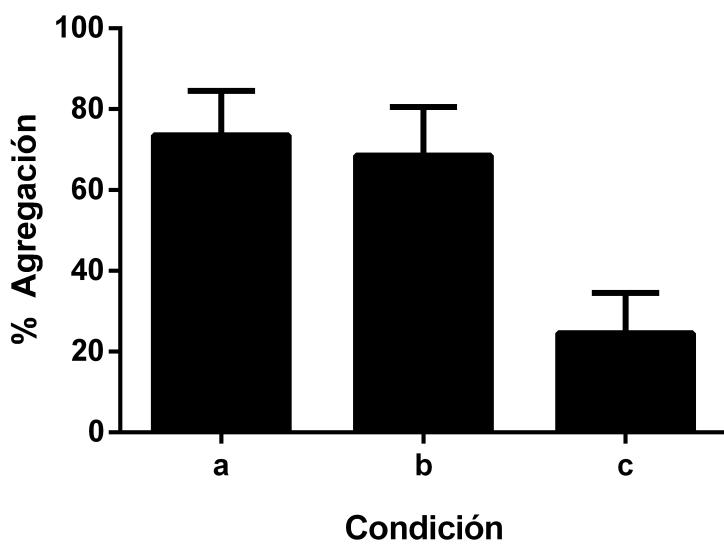


Figura 6.9: Efecto de *StSBTc-3* recombinante sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina. (A) Se diluyeron plaquetas humanas lavadas a un valor de 3×10^8 plaquetas/ml y se preincubaron durante 1 min a temperatura ambiente: en ausencia de *StSBTc-3* recombinante (a); con *StSBTc-3* recombinante desnaturalizada (previamente hervida durante 10 min) (b) y con *StSBTc-3* recombinante 1 μ M (c). Las muestras fueron suplementadas con CaCl_2 0.7 mM final. Se representa el incremento en la transmitancia (agregación plaquetaria) en función del tiempo. Se utilizó trombina 0.5 U/ml como agonista. (B) Porcentajes de máximos de agregación alcanzados en los ensayos anteriores. Las medidas corresponden al promedio de 3 medidas diferentes. En todos los casos las diferencias respecto a los controles resultaron significativas ($P < 0,05$)

6.2 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.9. Como puede observarse, la proteasa recombinante inhibió parcialmente la agregación plaquetaria inducida por trombina (curva c), mientras que para el caso de la enzima desnaturizada (hervida previamente a la incubación) la agregación plaquetaria ocurrió normalmente (curva b). Este resultado es consistente con los resultados descriptos en el Capítulo 5, los cuales mostraron que *StSBTc-3* purificada fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria inducida por los agonistas ensayados, entre ellos trombina, mientras que la agregación fue normal cuando se hirvió la enzima previamente a la incubación con las plaquetas.

Está reportado que la fibronectina puede unirse a la integrina $\alpha 2b\beta 3$ presente en la membrana de las plaquetas [Craig y col., 2001]. La presencia del sitio de FnIII en *StSBTc-3* podría explicar la actividad antiplaquetaria aún en ausencia de actividad proteolítica, debido al bloqueo de esta integrina en las membranas de las plaquetas. La unión de *StSBTc-3* a $\alpha 2b\beta 3$ impediría la unión de $\alpha 2b\beta 3$ al fibrinógeno, inhibiendo así la agregación plaquetaria.

Tabla 6.1: Actividad de la proteína recombinante comparada con *StSBTc-3* purificada

Proteína	Actividad		
	Azocaseína	Fibrinogenolítca	Antiplaquetaria
Purificada de hoja	+	+	+
Recombinante	-	-	+

Con el objetivo de probar esta hipótesis se amplificó la región del gen correspondiente a *StSBTc-3*, comprendida entre los aminoácidos 1 al 492, excluyendo el dominio de Fibronectina III (Figura 6.6). Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR del fragmento indicado anteriormente se muestran en la Figura 6.10; en la calle 3 se observó una banda de aproximada-

6 Expresión de *StSBTc-3* en *E. coli*

mente 1,4 kpb que resultó consistente con el peso esperado para la porción del gen codificante del dominio peptidasa. En la calle 2 se realizó, con fines comparativos, la amplificación del gen correspondiente a *StSBTc-3* incluyendo el dominio fibronectina (1,9 kpb). Las secuencias específicas de los primers utilizados (PF1 y PR1) se indican en el capítulo de Materiales y Métodos.

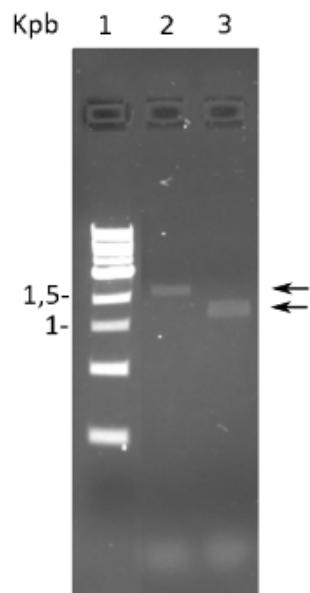


Figura 6.10: Análisis en gel de agarosa (0,75 %) del producto de PCR purificado correspondiente al gen codificante de *StSBTc-3* sin incluir el dominio fibronectina III. Calle 1: marcadores de peso molecular; calle 2: amplicón correspondiente a la porción del gen codificante de *StSBTc-3*; calle 3: amplicón codificante de *StSBTc-3* sin incluir el dominio fibronectina III. Ambas bandas están indicadas con una flecha.

El fragmento amplificado se clonó en primer lugar en el vector pProEX-HTb. La selección de colonias transformadas se realizó en agar LB suplementado con cloranfenicol y ampicilina (Capítulo Materiales y Métodos). Se purificó ADN plasmídico de las colonias seleccionadas y se confirmaron las construcciones por secuenciación (*Macrogen sequencing service*). Se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG 1 mM durante 4 hs (Figura 6.11A) según lo descripto en Materiales y Métodos. La proteína recombinante obtenida no pudo ser recuperada

6.2 Resultados y discusión

en la fracción soluble del lisado y resultó ser totalmente insoluble apareciendo en cuerpos de inclusión (Figuras 6.11B y 6.11C, respectivamente).

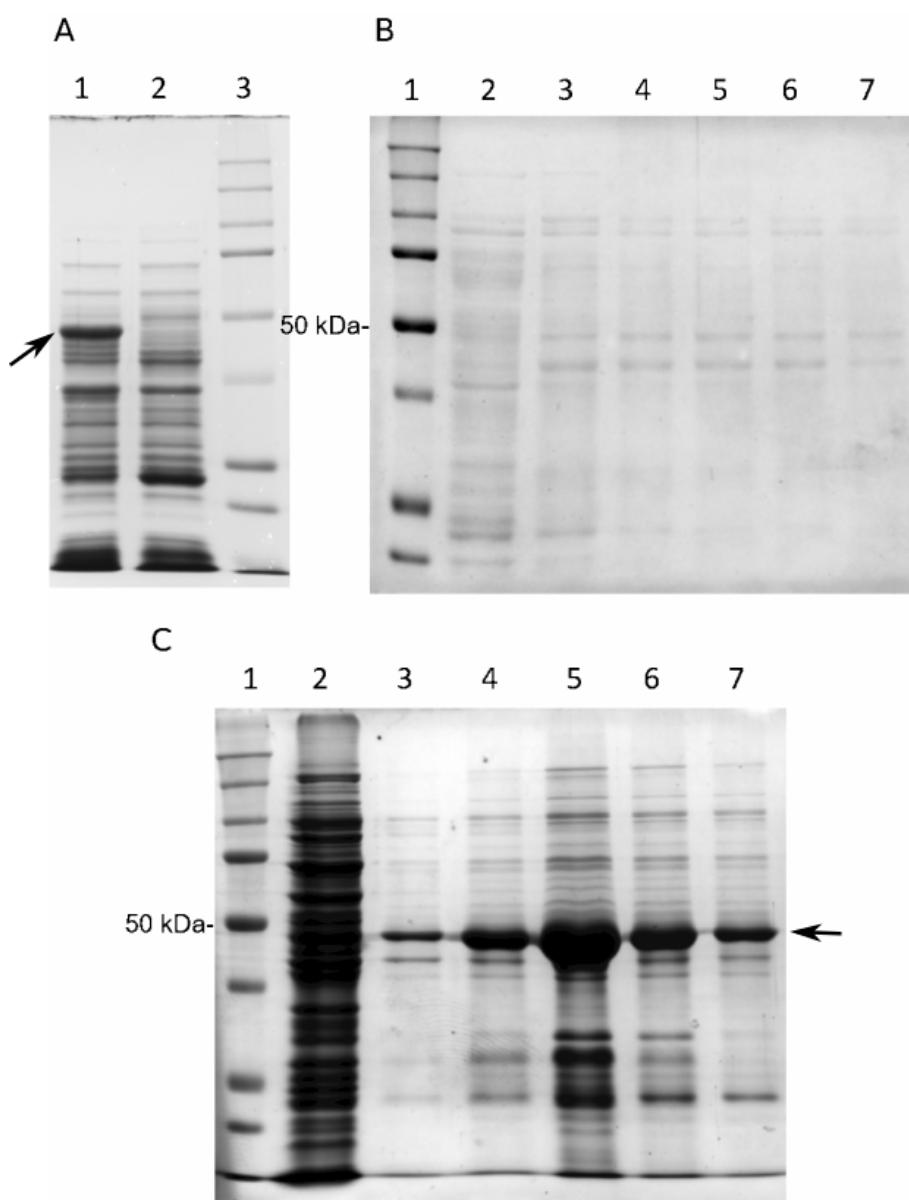


Figura 6.11: Análisis en geles de poliacrilamida de la expresión y purificación del dominio peptidasa de *StSBTc-3* recombinante. **A:** SDS-PAGE 12 % correspondiente al lisado de colonias transformadas con la región del gen codificante del dominio proteasa de *StSBTc-3* sin FnIII. Calle 1: lisado de colonias transformadas incubadas con IPTG 1 mM; calle 2: lisado de colonias trasformadas sin IPTG; Calle 3: marcadores de peso molecular. **B:** Eluido de la columna de Ni-NTA de la fracción soluble del lisado de colonias transformadas inducidas con IPTG. Para la elución se utilizó imidazol 50 mM (calles 2 a 7); Calle 1: MPM. **C:** Purificación del dominio proteasa recombinante sin FnIII de los cuerpos de inclusión. Calle 1: MPM; calle 2: cuerpos de inclusión redissueltos con urea 8M; Calle 3 a 7: Eluido de la fracción soluble del lisado de colonias transformadas inducidas con IPTG. Para la elución se utilizó imidazol 50 mM.

En la Figura 6.11A se muestra la expresión del dominio proteasa de *StSBTc-3*. Para el cultivo inducido con IPTG 1 mM (calle 1) se observó la presencia de una banda de peso molecular menor a 50 kDa consistente con el peso molecular del dominio de proteasa esperado (49 kDa). En la calle 2, correspondiente al lisado de bacterias sin inducir, la banda previamente mencionada se encontró ausente. En la Figura 6.11B se muestran las fracciones obtenidas en el eluido durante la purificación en columna de Ni-NTA de la fracción soluble del lisado. La banda observada previamente en la Figura 6.11A de aproximadamente 50 kDa no pudo ser detectada, lo que sugiere que la proteína recombinante obtenida no fue soluble.

El precipitado correspondiente al lisado de las colonias transformadas inducidas fue redissuelto con urea 8M y se procedió a la purificación del mismo utilizando una columna de Ni-NTA según lo descripto en Materiales y Métodos. Se obtuvo una banda de aproximadamente 47 kDa en el eluido (Figura 6.11 C) que resultó consistente con el peso esperado para *StSBTc-3* sin el dominio Fibronectina III (49 KDa), confirmándose entonces que la proteína recombinante obtenida fue insoluble. Los intentos de redisolución de la misma a través de diálisis en soluciones de urea cada vez más diluidas (Materiales y Métodos) no fueron exitosos.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente se planteó otra estrategia de clonado mediante la utilización del vector PGEX-KG. Este vector expresa la proteína GST en el extremo N-terminal de la secuencia clonada. Se encuentra reportado que GST puede ayudar al plegado y estabilización de proteínas en solución [Terpe, 2003]. Se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG 1 mM durante 4 hs, según lo descripto en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.12.

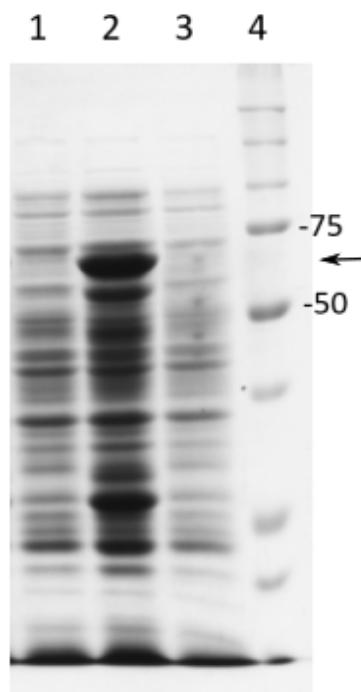


Figura 6.12: Análisis en gel de poliacrilamida (10 %) del lisado de colonias transformadas con la porción del gen codificante del dominio proteasa de *StSBTc-3* clonada en el vector PGEKG. Calle 1: lisado de colonias transformadas sin inducir; calle 2: lisado total de colonias trasformadas incubadas con IPTG 1 mM; Calle 3: fracción soluble del lisado de bacterias transformadas incubadas con IPTG 1 mM.

La aparición de una banda intensa (señalada con una flecha) indicó que la proteína recombinante se indujo correctamente con IPTG 1 mM (Calle 2). La proteína obtenida fue aproximadamente 25 kDa más pesada que la expresada con el vector pProEX-HTb (Figura 6.11 A) debido a la presencia de la proteína fusión GST. Sin embargo, a pesar de la inclusión de GST, el dominio expresado nuevamente resultó ser insoluble, no pudiéndose recuperar en la fracción soluble del lisado (calle 3).

El dominio de fibronectina consiste en un sandwich de hojas plegadas antiparalelas curvadas con forma de barril. Dominios estructurales relacionados se han encontrado en otras numerosas proteasas incluyendo la peptidasa C5 [Kagawa y col., 2009], factor XIII humano [Yee y col.,

1994], serín proteasa alcalina de *Bacillus sp.* [Nonaka y col., 2004] y proteasas del tipo kexinas de mamíferos, donde ha sido propuesto que el dominio estabiliza la cargas negativas del sitio activo [Henrich y col., 2005, Henrich y col., 2003]. En SBT3 la interfase entre el dominio de Fn III y el dominio subtilisina es altamente hidrofóbico. Los autores sostienen que el dominio de Fn III estabiliza la proteína protegiendo estas regiones hidrofóbicas del solvente [Ottmann y col., 2009]. Los resultados obtenidos aquí son consistentes con esta hipótesis debido a que todos los intentos de obtener el dominio peptidasa sin el sitio de FnIII de *StSBTc-3* en forma soluble resultaron infructuosos, aún cuando se estabilizó el extremo N-terminal con la proteína fusión GST (Figura 6.12).

Para la proteína recombinante correspondiente a *StSBTc-3* sin el dominio Fibronectina III no se observó ninguna de las actividades ensayadas ya que no pudo ser recuperada de forma soluble.

6.3. Conclusiones

StSBTc-3 fue clonada en el vector pProEX-HTb y se expresada en *E. coli*. El análisis filogenético mostró que *StSBTc-3* se encuentra más cercanamente emparentada con las subtilisinas de tomate (excluyendo SBT1) que con las de ají y tabaco. La asignación de dominios realizada para *StSBTc-3* indicó la presencia de un dominio de peptidasa S8 y del dominio Fibronectina tipo III, el cual también está presente en la subtilasa de tomate cristalografiada SBT3. El alineamiento de ambas secuencias mostró un porcentaje de homología mayor al 85 %.

Se clonó en los vectores pProEX-HTb y PGEX-KG y se expresó en *E. coli* *StSBTc-3* excluyendo el dominio Fibronectina III. El dominio proteasa recombinante resultó ser insoluble

6 Expresión de *StSBTc-3* en *E. coli*

aún cuando se lo expresó acoplado a GST. Sin embargo la enzima recombinante incluyendo FnIII pudo ser recuperada en la fracción soluble del lisado. Esto sugiere que el dominio Fibronectina tipo III, contribuye a la estabilización de la proteína en solución al proteger parches hidrofóbicos en la superficie de la misma, como se describió previamente para la subtilisina de tomate SBT3 [Ottmann y col., 2009]. Es la primera vez que este dominio es caracterizado para la proteasa *StSBTc-3*.

En cuanto a la evaluación de la actividad enzimática, no fue posible detectar actividad proteolítica en ninguno de los ensayos realizados. Sin embargo, *StSBTc-3* recombinante inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina a pesar de no presentar actividad fibrinogenolítica. Este resultado podría indicar un posible bloqueo de la integrina de membrana plaquetaria $\alpha 2\beta 3$, siendo el dominio Fibronectina tipo III un posible candidato para explicar la potencial interacción de *StSBTc-3* con $\alpha 2\beta 3$.

Bibliografía

- [Craig y col., 2001] Craig, D., Krammer, A., Schulten, K., y Vogel, V. (2001). Comparison of the early stages of forced unfolding for fibronectin type iii modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10):5590–5595.
- [El-Gebali y col., 2018] El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., y col. (2018). The pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1):D427–D432.
- [Fernández y col., 2015] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a solanum tuberosum subtilisin-like protein with caspase-3 activity (stsbtc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86:137–146.
- [Fernández y col., 2012] Fernández, M. B., Pagano, M. R., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2012). Hydrophobic proteins secreted into the apoplast may contribute to resistance against phytophthora infestans in potato. *Plant physiology and biochemistry*, 60:59–66.
- [Henrich y col., 2003] Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G. P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W., y Than, M. E. (2003). The crystal structure of the proprotein

Bibliografía

- processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10(7):520.
- [Henrich y col., 2005] Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., y Than, M. E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *Journal of molecular biology*, 345(2):211–227.
- [Kagawa y col., 2009] Kagawa, T. F., O'Connell, M. R., Mouat, P., Paoli, M., O'Toole, P. W., y Cooney, J. C. (2009). Model for substrate interactions in c5a peptidase from streptococcus pyogenes: a 1.9 Å crystal structure of the active form of scpa. *Journal of molecular biology*, 386(3):754–772.
- [Meichtry y col., 1999] Meichtry, J., Amrhein, N., y Schaller, A. (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*lycopersicon esculentum* mill.). *Plant molecular biology*, 39(4):749–760.
- [Nonaka y col., 2004] Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Saeki, K., Ito, S., Horikoshi, K., y Miki, K. (2004). The crystal structure of an oxidatively stable subtilisin-like alkaline serine protease, kp-43, with a c-terminal β-barrel domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45):47344–47351.
- [Norero y col., 2016] Norero, N. S., Castellote, M. A., de la Canal, L., y Feingold, S. E. (2016). Genome-wide analyses of subtilisin-like serine proteases on *solanum tuberosum*. *American journal of potato research*, 93(5):485–496.
- [Ottmann y col., 2009] Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., y Schaller, A. (2009). Structural basis for ca²⁺-independence and acti-

vation by homodimerization of tomato subtilase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40):17223–17228.

[Potter y col., 2018] Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R., y Finn, R. D. (2018). Hmmer web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1):W200–W204.

[Terpe, 2003] Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5):523–533.

[Yee y col., 1994] Yee, V. C., Pedersen, L. C., Le Trong, I., Bishop, P. D., Stenkamp, R. E., y Teller, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor xiii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15):7296–7300.

7 Modelo propuesto

En la presente tesis se estudiaron los efectos de la serín proteasa del tipo subtilisina de *Solanum tuberosum StSBTc-3*, previamente aislada y purificada en nuestro laboratorio [Fernández y col., 2015], sobre la hemostasia. Para abordar este trabajo se realizaron experimentos tendientes a demostrar la posible acción de *StSBTc-3* sobre cada una de las fases que componen el fenómeno hemostático. El mismo consiste en el mantenimiento de la sangre en estado líquido dentro de los vasos sanguíneo [Kim, 2015] y puede ser dividido para su estudio en tres procesos principales: agregación plaquetaria, cascada de coagulación y fibrinólisis. Debe tenerse en cuenta que la división de la hemostasia en dichos procesos se realiza con el fin de obtener un diseño experimental para los ensayos *in vitro*, sin embargo en condiciones fisiológicas los tres procesos ocurren en simultáneo [Hoffman y Pawlinski, 2014]. A continuación se resumen los resultados obtenidos:

- Los ensayos de degradación a partir de la fracción de plasma humano enriquecida en fibrinógeno mostraron que *StSBTc-3* posee actividad fibrinogenolítica, presentando degradación para las 3 cadenas constituyentes del fibrinógeno. La cadena β fue la más sensible a la hidrólisis, seguida de la cadena γ y α (Sección 3.2.3). Al mismo tiempo, la

7 Modelo propuesto

enzima estudiada no mostró actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos (Sección 3.2.4).

- La optimización de esta actividad mediante el análisis de la superficie de respuesta obtenida, reportada en el Capítulo 4, mostró que la enzima fue activa en un rango amplio de condiciones de pH y temperatura y, a su vez, que el pH y la temperatura óptimos para la actividad fibrinogenolítica (8 y 43 °C) se aproximaron a las condiciones fisiológicas (7,45 y 37°C respectivamente). Estudios realizados a partir de coágulos de fibrina insolubles mostraron que *StSBTc-3* fue capaz de degradar el coágulo *in vitro* a tiempos largos (15 hs). Resulta esperable que la actividad fibrinolítica sea observada a tiempos considerablemente más largos que la actividad fibrinogenolítica, debido a que en el primer caso el sustrato es insoluble, reduciéndose notablemente las interacciones con las enzima. Se han reportado resultados similares para otras proteasas de plantas ([Choi y col., 2014]).
- Respecto a las pruebas de coagulación realizadas se mostró que *StSBTc-3* fue capaz de extender el tiempo de trombina (Sección 3.2.2). Esta prueba es utilizada para evaluar la vía final común de la cascada de coagulación *in vitro*, implicando la medida del tiempo de formación del coágulo de fibrina a partir de PPP [Ignjatovic, 2013]. El resultado obtenido puede interpretarse a partir de la actividad fibrinogenolítica de *StSBTc-3*. La degradación del fibrinógeno presente en el PPP por acción de la proteasa aumentó el valor del tiempo de trombina al disminuir la concentración del precursor de la fibrina, principal constituyente del coágulo.
- En cuanto a la actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3* *in vitro* se mostró que *StSBTc-3* inhibió la retracción del coágulo (Sección 3.2.1). Este proceso constituye la parte final

de la agregación plaquetaria. Luego del proceso de activación y agregación plaquetaria, los puentes formados por la unión del fibrinógeno a integrinas en la membrana de las plaquetas se comprimen generando una disminución del volumen del coágulo formado. Debido a su inespecificidad, esta prueba sólo indicó que la función plaquetaria se vió afectada. Para elucidar el posible mecanismo de acción de *StSBTc-3* sobre la agregación plaquetaria se llevaron a cabo ensayos de agregación con distintos agonistas (Capítulo 5).

- Para evaluar con mayor profundidad la actividad antiplaquetaria se ensayaron 4 agonistas diferentes: colágeno, convulxina, trombina, y el ionóforo A2387. Los tres primeros activan receptores específicos en la membrana plaquetaria, mientras que el último es un ionóforo que permite la liberación del Ca²⁺ al citosol (los mecanismos de activación plaquetaria de cada uno de ellos se describen en detalle en el Capítulo 5). La hipótesis de que *StSBTc-3* actúe al final del proceso de activación plaquetaria, permitiría explicar el hecho de que la enzima inhibió la agregación plaquetaria inducida por los 4 agonistas ensayados. Por otro lado se observó que la antiagregación no fue inhibida por el inhibidor de serín proteasas PMSF, pero al hervir la enzima previamente a la incubación con las plaquetas, la agregación plaquetaria ocurrió normalmente. Esto sugeriría que la actividad antiplaquetaria sería independiente de la actividad de proteasa de *StSBTc-3*, pero podría depender del plegado de la misma.
- Con el fin de reproducir los resultados obtenidos para la proteasa purificada se clonó la porción del gen codificador de *StSBTc-3* en *E.coli* (Capítulo 6). Si bien logró purificarse la enzima a partir de la fracción soluble del lisado de bacterias transformantes, la misma no mostró actividad proteolítica. Aún en ausencia de actividad proteolítica, *StSBTc-3*

7 Modelo propuesto

recombinante inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina, lo que avalaría la hipótesis de que la actividad antiplaquetaria de *StSBTc-3* es independiente de la actividad proteolítica.

- Mediante el análisis bioinformático se encontró que *StSBTc-3* presenta homología de secuencias con la enzima SBT3 de tomate, cuya información cristalográfica se encuentra disponible (Sección 6.2.1). También se encontró que la región C-terminal de la enzima recombinante obtenida presenta un dominio del tipo Fibronectina III.
- Al clonar la región del gen codificante del dominio peptidasa de *StSBTc-3* excluyendo al dominio de Fibronectina III, la enzima fue recuperada en cuerpos de inclusión insolubles (Sección 6.2.3). Este resultado avala la teoría propuesta por Ottmann y col. (2009) quienes propusieron la participación de este dominio en la estabilización estructural de este tipo de subtilasas en solución [Ottmann y col., 2009].

La agregación plaquetaria se produce en última instancia por la formación de "puentes" constituidos por la unión de la integrina de membrana plaquetaria $\alpha 2\beta 3$ y el fibrinógeno. Se concluye entonces que un posible rol de *StSBTc-3* como inhibidor de $\alpha 2\beta 3$ permitiría explicar todos los resultados obtenidos. El bloqueo de la integrina $\alpha 2\beta 3$ por *StSBTc-3* generaría un impedimento para la unión del fibrinógeno a la misma, lo que evitaría la agregación plaquetaria, independientemente de la vía de activación. Se encuentra reportado que $\alpha 2\beta 3$ puede unirse a fibrinógeno, fibronectina y vitronectina [Li y col., 2003]. El hecho de que *StSBTc-3* posea el dominio del tipo Fibronectina III hace que esta hipótesis resulte interesante, pero como tal, se requiere de nuevos ensayos para ser demostrada. En la Figura 7.1 se resume el modelo hipotético propuesto a partir de los resultados obtenidos, que describe los efectos de *StSBTc-3* sobre la hemostasia.

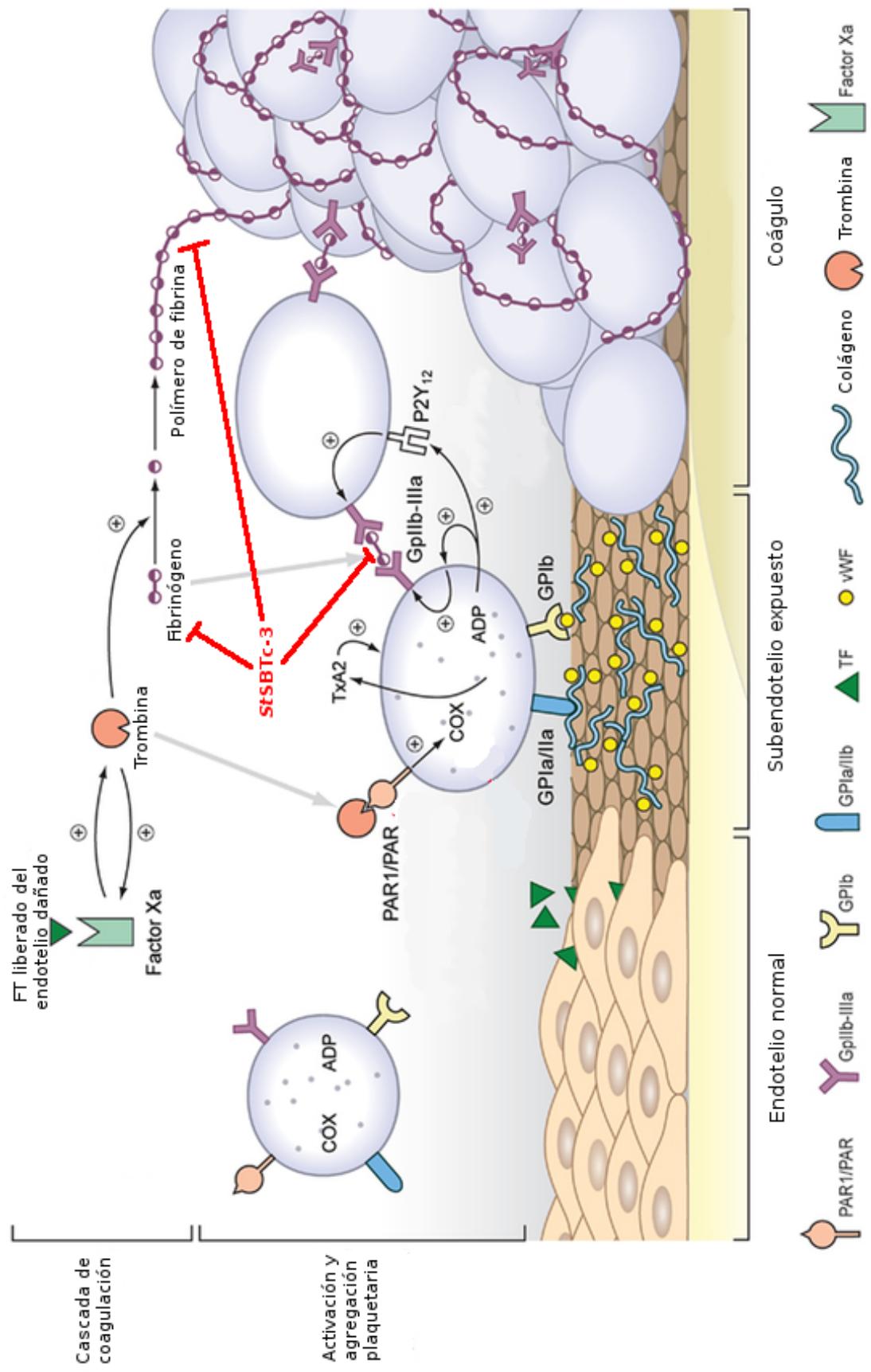


Figura 7.1: Modelo propuesto para el efecto de StSBTc-3 sobre la hemostasia. En rojo se indican la actividad antiplaquetaria y fibrino(geno)lítica de StSBTc-3. Imagen modificada de Lilly y col. [Lilly y Wilensky, 2011].

Bibliografía

- [Choi y col., 2014] Choi, J.-h., Kim, D.-w., Park, S.-e., Choi, B.-s., Sapkota, K., Kim, S., y Kim, S.-j. (2014). Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant Aster yomena (Kitam.) Honda with anticoagulant activity : Purification and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx):4–9.
- [Fernández y col., 2015] Fernández, M. B., Daleo, G. R., y Guevara, M. G. (2015). Isolation and characterization of a solanum tuberosum subtilisin-like protein with caspase-3 activity (stsbtc-3). *Plant Physiology and Biochemistry*, 86:137–146.
- [Hoffman y Pawlinski, 2014] Hoffman, M. y Pawlinski, R. (2014). Hemostasis: old system, new players, new directions. *Thrombosis research*, 133:S1–S2.
- [Ignjatovic, 2013] Ignjatovic, V. (2013). Thrombin clotting time. In *Haemostasis*, pages 131–138. Springer.
- [Kim, 2015] Kim, N. D. (2015). Hemodynamic disorders, thromboembolic disease, and shock.
- [Li y col., 2003] Li, F., Redick, S. D., Erickson, H. P., y Moy, V. T. (2003). Force measurements of the $\alpha 5\beta 1$ integrin–fibronectin interaction. *Biophysical journal*, 84(2):1252–1262.

Bibliografía

[Lilly y Wilensky, 2011] Lilly, S. M. y Wilensky, R. L. (2011). Emerging therapies for acute coronary syndromes. *Frontiers in pharmacology*, 2:61.

[Ottmann y col., 2009] Ottmann, C., Rose, R., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., y Schaller, A. (2009). Structural basis for ca²⁺-independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40):17223–17228.

8 Perspectivas

- La optimización de la actividad fibrinogenolítica realizada mostró que *StSBTc-3* fue activa en condiciones fisiológicas (pH 7,45 y 37°C). Deben diseñarse nuevos ensayos para evaluar los efectos de *StSBTc-3* sobre la hemostasia *in vivo*. El ensayo de sangrado de cola de ratón es comúnmente utilizado para evaluar agentes anticoagulantes y trombolíticos *in vivo*.
- Respecto al clonado y expresión de *StSBTc-3*, no fue posible recuperar la enzima activa con las construcciones y los sistemas de expresión utilizados. Recientemente se adquirió en el laboratorio un sistema de expresión en levaduras (*Kluiveromices lactis*); el mismo podría utilizarse para realizar el clonado y expresión de *StSBTc-3* en un sistema que incorpora potenciales modificaciones postraduccionales.
- Se deben diseñar experimentos tendientes a corroborar la hipótesis relativa a la posible inhibición de la integrina $\alpha 2\beta 3$ por parte de *StSBTc-3*. Un ensayo posible sería la inmovilización de la enzima recombinante sobre una superficie polimérica y una posterior evaluación de la adhesión plaquetaria sobre las mismas para determinar si las plaquetas se adhieren a *StSBTc-3*. Una vez hecho esto, podría estudiarse la adhesión de plaquetas

mutantes carentes del receptor $\alpha 2b\beta 3$ para evaluar si la adhesión se debe a la interacción de $\alpha 2b\beta 3$ con *StSBTc-3*.

- Se está trabajando en la actualidad en la obtención de matrices de policarbonato-uretano electrohiladas (Figura 8.1) para la posterior inmovilización superficial de compuestos con actividades trombolíticas y antiplaquetarias. Estas matrices son utilizadas para aumentar la hemocompatibilidad de distintos dispositivos biomédicos (como stents y válvulas cardíacas).

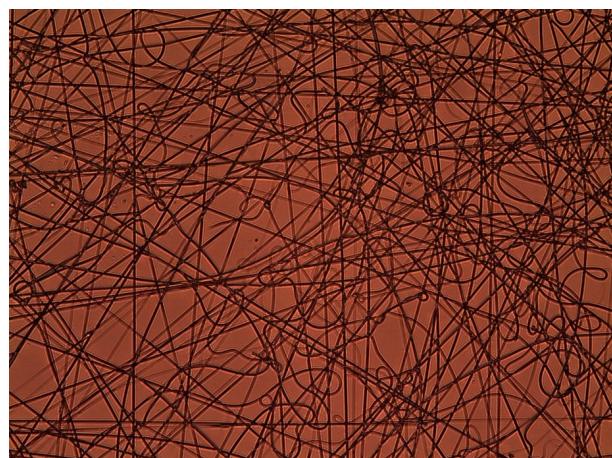


Figura 8.1: Fibras de PCU obtenidas por electro spinning. Microscopio óptico, 20X

Los objetivos son:

1. Preparar matrices de policarbonato-uretano (PCU) electrohiladas.
2. Modificar superficialmente estas matrices con FMOC-lisina y explorar su desprotección en fase heterogénea.
3. Explorar la viabilidad de estos nuevos sistemas obtenidos como superficies hemo-compatibles.

4. Estudiar la relación estructura - propiedades de los materiales obtenidos, determinando su comportamiento como agentes fibrinogenolíticos.
5. Evaluar la respuesta del medio biológico frente a los sistemas propuestos mediante ensayos *in vitro*.

Producción generada a partir de la presente Tesis

Publicaciones científicas

- PEPE, ALFONSO; TITO, FLORENCIA ROCÍO; DALEO, GUSTAVO RAÚL; GUEVARA, MARIA GABRIELA. Optimization of fibrinogenolytic activity of Solanum tuberosum subtilisin-like protease (*StSBTc-3*) by response surface methodology. BIOTECHNOLOGY REPORTS. ELSEVIER BV. NETHERLANDS. 2019. En revisión.
- SUÁREZ-GONZÁLEZ L, SANABRIA-ALBA L, GARCÍA D, PAOLETTI M, PEPE A. Manifestación inusual de mieloma múltiple activo. Disfibrinogenemia adquirida e inhibidor del factor V. HEMATOL Méx. 2017 abr;18(2):92-98.
- PEPE, ALFONSO; FREY, MARIA EUGENIA; MUÑOZ, FERNANDO; FERNANDEZ, M. BELEN; PEDRAZA, A.B.; GALBAN, GUSTAVO J.; GARCIA, DIANA NOEMI; DALEO, R. GUSTAVO; GUEVARA, M. GABRIELA. Fibrin(ogen)olytic and antiplatelet activities of a subtilisin-like protease from Solanum tuberosum (*StSBTc-3*). BIO-

CHIMIE.Paris: ELSEVIER FRANCE-EDITIONS SCIENTIFIQUES MEDICALES ELSEVIER. 2016 vol.125 n°. p163 - 170. issn 0300-9084.

Capítulos de libros

- PEPE, ALFONSO; TITO, FLORENCIA ROCIO; GUEVARA, MARIA GABRIELA. Proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from plants. From: Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes. Eds: GUEVARA, MARIA GABRIELA; DALEO, GUSTAVO RAÚL. Springer Nature. 2018. p 129 - 141 - . isbn 978-3-319-97132-2-6
- PEPE, ALFONSO; FREY, MARIA EUGENIA; MUÑOZ, FERNANDO; FERNANDEZ, M. BELEN; DALEO, R. GUSTAVO; GUEVARA, M. GABRIELA; MA. CONCEPCIÓN DE LA CRUZ LEYVA; NICOLÁS GONZÁLEZ CORTÉS; JOSÉ ULISES GONZÁLEZ DE LA CRUZ; TEMANI DURÁN MENDOZA; MARTHA ALICIA PERERA GARCÍA; MARIO ALFREDO BENÍTEZ MANDUJANO. *S_tSBTc-3: una serín proteasa de solanum tuberosum con actividad antiplaquetaria y fibrin(ogen) olítica. Avances y perspectivas en biotecnología y ciencias agropecuarias.* Universidad de San Carlos de Guatemala Ciudad Universitaria. 2016. p67 - 83. isbn 978-9929-8141-5-8

Publicaciones a congresos

- PEPE, ALFONSO; TITO, FLORENCIA ROCIO; GUEVARA, MARIA GABRIELA. Optimización de la actividad fibrinogenolítica de una subtilisina de papa por medio del

análisis de superficie de respuesta. Argentina. Buenos Aires. 2018. Revista. Resumen.

Congreso. XIII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis.

- PEPE, ALFONSO; WHITEHEART, SIDNEY W.; DALEO, GUSTAVO RAÚL; GUEVARA, MARIA GABRIELA. ANTIPLATELET ACTIVITY OF *StSBTc-3*, A SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE OF *Solanum tuberosum*. Argentina. Buenos Aires. 2017. Revista. Resumen. Congreso. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. SAIB
- PEPE, ALFONSO; WHITEHEART, SIDNEY W.; GUEVARA, M. GABRIELA. Cloning and expression of a Fibrin(ogen)olytic Serine Protease from *Solanum tuberosum*. Estados Unidos de América. Memphis, TN. 2016. Libro. Resumen. Conferencia. 16th Midwest Platelet Conference. The University of Tennessee.
- PEPE, ALFONSO; DALEO, R. GUSTAVO; GUEVARA, M. GABRIELA. *StSBTc-3*, se-rín proteasa de *Solanum tuberosum* como nuevo agente anticoagulante y fibrinogenolítico con posibles aplicaciones biotecnológicas. Argentina. Santa Fe. 2014. Libro. Artículo Breve. Simposio. 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Universidad Nacional del Litoral.
- PEPE, ALFONSO; PEDRAZA, A.B.; FERNANDEZ, M. BELEN; GALBAN, GUSTAVO J.; GUEVARA, M. GABRIELA. Evaluation of haemostatic activity of a serine protease isolated from *S. tuberosum* leaves. Argentina. Mendoza. 2014. Revista. Artículo Breve. Congreso. 50th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Índice de figuras

1.1.	Síntesis de los mecanismos constituyentes de la hemostasia	4
1.2.	Regulación negativa de la cascada de coagulación	5
2.1.	Diagrama de los plásmidos de expresión pGEX-KG y pProEx-HTb	41
3.1.	Diagrama de la cascada de coagulación	53
3.2.	Determinación del efecto de <i>StSBTc-3</i> sobre la retracción del coágulo	56
3.3.	Determinación del TT en presencia de <i>StSBTc-3</i>	58
3.4.	Actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i> en función de la concentración	60
3.5.	Actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i> en función del tiempo	62
3.6.	Actividad fibrinolítica de <i>StSBTc-3</i>	65
3.7.	Efecto del pH en la actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i>	66
3.8.	Efecto de la temperatura en la actividad fibrinogenolítica de <i>StSBTc-3</i>	67
4.1.	Diseño factorial completo 3^3 (27 ensayos)	81
4.2.	Representación gráfica de un BBD de tres factores	82
4.3.	Validación del modelo propuesto	88

Índice de figuras

4.4. Mapas de contorno	90
4.5. Diagramas de superficies generados por RSM	91
5.1. Cascada de agregación plaquetaria	103
5.2. Efecto de <i>StSBTc-3</i> sobre la agregación plaquetaria inducida por distintos agonistas	106
5.3. Efecto de <i>StSBTc-3</i> sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina en función de la dosis	108
5.4. Efecto de <i>StSBTc-3</i> inhibida por PMSF y desnaturalizada sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina	110
6.1. Análisis en gel de agarosa (0.75 %) del producto de PCR purificado	121
6.2. Secuencia nucleotídica y aminoacídica predicha de <i>StSBTc-3</i> recombinante	122
6.3. Esquema del procesamiento de secuencias proteicas y análisis filogenético	123
6.4. Análisis filogenético	124
6.5. Alineamiento múltiple de secuencias	126
6.6. Asignación de dominios para <i>StSBTc-3</i>	127
6.7. Análisis en geles de poliacrilamida de la expresión y purificación de <i>StSBTc-3</i> recombinante.	128
6.8. Actividad fibrinolítica de <i>StSBTc-3</i> recombinante en función de la concentración	130
6.9. Efecto de <i>StSBTc-3</i> recombinante sobre la agregación plaquetaria inducida por trombina	132

6.10. Análisis en gel de agarosa (0,75 %) del producto de PCR purificado correspondiente a la porción del gen codificante de <i>StSBTc-3</i> sin incluir el dominio fibronectina III	134
6.11. Análisis en geles de poliacrilamida de la expresión y purificación del dominio peptidasa de <i>StSBTc-3</i> recombinante.	136
6.12. Análisis en gel de poliacrilamida (10 %) del lisado de colonias transformadas con la porción del gen codificante del dominio proteasa de <i>StSBTc-3</i> clonada en el vector PGEX-KG	138
7.1. Modelo propuesto para el efecto de <i>StSBTc-3</i> sobre la hemostasia	149
8.1. Fibras de PCU obtenidas por electro spinning	154

Índice de tablas

1.1. Proteasas de origen vegetal con actividad procoagulante	17
1.2. Proteasas de origen vegetal con actividad anticoagulante	17
1.3. Proteasas de origen vegetal con actividad fibrino(geno)lítica	17
2.1. Niveles de factores codificados para un diseño de Box-Behnken correspondiente a un sistema de 3 variables.	37
3.1. Actividad hemolítica de <i>StSBTc-3</i>	68
4.1. Niveles de factores codificados para un diseño de Box-Behnken correspondiente a un sistema de 3 variables independientes	83
4.2. Variables independientes y sus niveles correspondientes a un BBD de tres factores para la optimización de la actividad enzimática de <i>StSBTc-3</i>	84
4.3. BBD utilizado y respuestas obtenidas para la optimización de la actividad fibri- nogenolítica de <i>StSBTc-3</i>	86
4.4. Coeficientes de regresión obtenidos mediante RSM	87
4.5. Análisis de varianza del modelo generado por RSM	87

Índice de tablas

- 6.1. Actividad de la proteína recombinante comparada con *StSBTc-3* purificada . . . 133