



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUIMICA

**“Rol de la p38MAPK en la activación de plaquetas y células
endoteliales mediada por los anticuerpos Antifosfolípidos”**

Mariano Esteban Vega Ostertag

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente del Departamento de Microbiología, Bioquímica e Inmunología de Morehouse School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA; Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente de la División de Reumatología del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA y en la Cátedra del Practicanato de Bioquímica, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre el 1 de mayo de 2007 y el 17 de Diciembre de 2010, bajo la dirección de la Dra. Silvia Susana Pierangeli, Profesora de Medicina de la Division de Reumatologia del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA y la Dirección Asistente de la Dra. Nélida Nora Polini, Profesora Adjunta del Practicanato Bioquímica.

Firma del Alumno



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaria General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis a sido aprobada el **05/07/2011**, mereciendo la calificación de **(Diez sobresaliente)**

**A la memoria de mi mamá Celia Elena Ostertag y
de mi hermano José Pablo Vega**

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mucha gente:

- A la Dra. Silvia Susana Pierangeli, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella en los EE.UU, por darme los medios y la libertad para investigar, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis y por haber aceptado ser su Directora, por compartir cada momento de mi vida en ese maravillosos País que tan marcado dejó mi corazón.
- A la Dra. Nelida Nora Pollini, por haber sido la profesora que me inició en este camino del estudio de la hemostasia, compartiendo su pasión, dedicación, conocimiento y toda su energía en aquellos prácticos de coagulación en épocas estudiantiles. Por permitirme realizar este trabajo de tesis, por haberme aceptado como tesista, por brindarme todo su apoyo, paciencia y cariño.
- A la Dra. Lucia Kordich, por haberme contagiado su pasión por el estudio de la hemostasia, por hacerme como pasante en los tiempos de mi Residencia Bioquímica, por enviarme a la Fundación Favaloro a completar mi formación profesional y por ser un ejemplo de honestidad, profesionalismo y sobre todo un ejemplo de vida.
- A la Dra Marta Martinuzzo, por ser una guía profesional, por contagiarme con su entusiasmo por el estudio de las plaquetas, por brindarme su amistad, cariño y por haber estado siempre atenta al camino de mi vida.
- Al Dr. Ricardo Forastiero, por ser una guía profesional, por haberme brindado su amistad, cariño y por haberme hecho sentir un hermano menor.
- Al Dr. Nigel Harris, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por apoyar mi trabajo y compartir el entusiasmo de los avances en el estudio de esta

enfermedad que él mismo reportó junto con otros investigadores varias décadas atrás.

- A mi mamá, por enseñarme que en la vida hay que luchar por lo que uno cree, por su amor, por haber luchado tanto para compartir un rato más de tiempo con nosotros y por que sé que desde el cielo siempre me seguirá cuidando.
- A mi Hermano Pablito, por ser siempre mi hermano mayor, porque lo extraño y lo extrañaré el resto de mi vida.
- A mi papá, por ser un padre maravilloso, por inculcarme el valor del trabajo, la honestidad, la sencillez, la generosidad, por haber estado siempre orgulloso de mí, por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi vida.
- A mi hermanita, por sé que siempre está, porque la amo.
- A mi hija Sophia, por ser la luz de mi vida, porque su amor tan puro y verdadero me sostiene y me da fuerzas.
- A Caro, por acompañarme a realizar mis sueños en los EE.UU.

Así mismo, hago extensivo mi agradecimiento al:

- Laboratorio de Antiphospholipid Standardization, dependiente del Departamento de Microbiología, Bioquímica e Inmunología de Morehouse School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA.
- Laboratorio de Antiphospholipid Standarization, dependiente de la División de Reumatología del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA
- Cátedra del Practicanato Profesional de Bioquímica, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, en cuyas instalaciones se realizó parte del trabajo de esta tesis.

Resumen

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune sistémica, que se caracteriza por la presencia conjunta de trombosis vascular o complicaciones obstétricas (pérdida fetal o abortos espontáneos a repetición) y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (aFLs) en el plasma de los pacientes.

El mecanismo por el cual esos anticuerpos producen la enfermedad no se comprende totalmente, y esto se debe a la poli especificidad de estos anticuerpos, la multiplicidad de los sitios de acción y por la variabilidad del contexto clínico en donde se presenta la enfermedad.

Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se demostró que la actividad trombogénica de los aFLs esta determinada entre otras por la interferencia que producen estos anticuerpos con el sistema hemostático: inhiben el camino de la proteína C activada, impiden la normal fibrinólisis y producen la activación celular, principalmente células endoteliales, monocitos y plaquetas. En las células endoteliales (CE) y en los monocitos, los aFLs incrementan la expresión de FT y moléculas de adhesión, mientras que en las plaquetas se observó un aumento en la producción plaquetaria de TXA₂, agregación y liberación de los gránulos plaquetarios en presencia de dosis subagregantes de diferentes agonistas.

Con el fin de dilucidar los mecanismos intracelulares involucrados en la activación celular mediada por los aFLs, se estudió el rol de la p38 MAPK, una proteína serina/treonina quinasa, que constituye la mayor cascada de transducción de señales inflamatorias desde la superficie celular hacia el núcleo.

En este trabajo de tesis se comprobó que los aFLs producen la activación de la p38 MAPk en las plaquetas y en las CE, y que esta vía de activación intracelular es en gran parte responsable del incremento de la activación plaquetaria y de las CE, debido a que los efectos protrombóticos y proinflamatorios de los aFLs son disminuyen significativamente cuando se inhibe la p38MAPk con el inhibidor específico SB20380.

Abstract

Antiphospholipid Syndrome (APS) is a systemic autoimmune disease, characterized by the joint presence of vascular thrombosis or obstetric complications (fetal loss or recurrent spontaneous abortions) and the presence of antiphospholipid antibodies (aPL) in the plasma of patient.

The mechanism by which these antibodies cause disease is not fully understood, and this is due to the poly specificity of these antibodies, multiple sites of action and variability of clinical context where the disease occurs.

Using *in vitro* and *in vivo* showed that the thrombogenic activity of aPL is determined among others by the interference caused by these antibodies with the hemostatic system: the way to inhibit activated protein C, prevent normal fibrinolysis and cell activation occur mainly endothelial cells, monocytes and platelets. In endothelial cells (EC) and monocytes, AFLS increase TF expression and adhesion molecules, whereas in platelets was observed an increase in platelet production of TXA₂, platelet aggregation and release in the presence of doses of subagregantes different agonists.

In order to elucidate the intracellular mechanisms involved in mediated cell activation by the aPL, we studied the rol of p38 MAPK, a protein serine / threonine kinase, which constitutes the major transduction cascade of inflammatory signals from the cell surface to the nucleus.

In this thesis aPLs were found to produce the activation of p38 MAPK in platelets and EC, and that the intracellular activation pathway is largely responsible for the increased platelet activation and EC, because that prothrombotic and proinflammatory effects of aPLs are significantly diminished when p38MAPK was inhibited with specific inhibitor SB20380.