



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***Inhibidores peptídicos de proteasas obtenidos a partir de papas andinas como potenciales conservantes en la industria alimenticia***

---

***Tesista***

**JOSÉ SEBASTIÁN CISNEROS**

***Director***

**WALTER DAVID OBREGÓN**

***Codirectora***

**MÓNICA GRACIELA PARISI**

***Año***

**2017**

# **Inhibidores peptídicos de proteasas obtenidos a partir de papas andinas como potenciales conservantes en la industria alimenticia**

El presente Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigaciones de Proteínas Vegetales (CIProVe) y en el Laboratorio de Química Biológica perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján, bajo la dirección del Dr. Walter David Obregón y la Dra. Mónica Graciela Parisi; en el Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB-UAB) de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la supervisión de la Dra. Julia Lorenzo; y en el Laboratorio Plantech de la Escola Superior de Biotecnologia de la Universidade católica Portuguesa, bajo la supervisión de la Dra. Marta Vasconcelos. El mismo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y por el Programa Erasmus Mundus, proyecto SUD-UE.

**Tesista:** Lic. José Sebastián Cisneros  
**Año 2017**

*Dedicado a mi mamá, por enseñarme que con esfuerzo, sacrificio y humildad, se puede llegar hasta donde uno sueña.*

*También a mi amor, por estar siempre a mi lado y enseñarme que con amor y comprensión la vida entrega cosas maravillosas.*

## *AGRADECIMIENTOS*

A MI DIRECTOR Y AMIGO DAVID, POR DARMER LA POSIBILIDAD DE COMENZAR ESTE CAMINO EN ESTE LOCO Y LINDO MUNDO DE LA CIENCIA Y LA INVESTIGACIÓN. POR GUIARME Y CONFIAR EN MI TRABAJO Y EN MÍ COMO PERSONA. POR DARMER LA OPORTUNIDAD E INCENTIVARME CONOCER NUEVOS HORIZONTES Y EXPERIENCIAS EN OTRAS CULTURAS Y PAÍSES. POR LA PACIENCIA Y LA INCENTIVACIÓN EN CADA PASO DADO.

A MÓNICA, MI DIRECTORA, POR HACERME SENTIR MUY CÓMODO Y BIENVENIDO EN SU GRUPO DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE QUÍMICA BIOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LUJÁN; Y TAMBIÉN POR SU GENEROSIDAD Y AMABILIDAD AL DARMER LA OPORTUNIDAD DE EMPEZAR ESTE CAMINO.

A LA DRA. JULIA LORENZO, POR SU COLABORACIÓN DESINTERESADA Y SUS SUGERENCIAS TAN ACERTADAS; Y DARMER LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR EN EL IBB-UAB DE LA UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA. POR TRANSMITIRME SUS CONOCIMIENTOS, BUENA PREDISPOSICIÓN Y AYUDA SIEMPRE QUE LO NECESITÉ, TANTO DENTRO COMO FUERA DEL LABORATORIO.

A LA DRA. MARTA VASCONCELOS, POR SU BUENA PREDISPOSICIÓN Y SU IMPORTANTE COLABORACIÓN EXPERIMENTAL Y AYUDA DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO PLANTECH DE LA ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA.

AL ING. CARLOS ROSSO DE LA BIOFÁBRICA "MARISTA" POR SU COLABORACIÓN EN EL DESARROLLO DE LAS VITROPLANTAS DE PAPAS ANDINAS, SIN ÉL ESTE TRABAJO HUBIERA SIDO CASI IMPOSIBLE.

A MIS COMPAÑEROS CLAUDIA, ANA Y NORTON, POR AYUDARME EN MI TRABAJO DURANTE MI ESTANCIA EN PORTUGAL; POR ESOS BUENOS MOMENTOS VIVIDOS EN LA UNIVERSIDAD JUNTO A MIKE, QUE HICIERON QUE MI ESTADÍA SEA MUCHO MÁS GRATA.

A MIS COMPAÑERAS DE LABORATORIO MARI, CLARI, JULY Y DANY, POR COMPARTIR DIA A DIA HACIENDO QUE MIS PRIMEROS Y ÚLTIMOS PASOS HAYAN SIDO VIVIDOS CON ALEGRIA, CON MUCHAS RISAS Y COMPLICIDADES.

A MIS AMIGOS POR LAS ALEGRÍAS Y PALABRAS DE ALIENTO EN TODOS ESTOS AÑOS DE AMISTAD.

Y A MI FAMILIA POR DARMER AMOR Y PALABRAS DE APOYO A LO LARGO DE TODO ESTE TIEMPO.

# ABREVIATURAS

IPs: Inhibidores de Proteasas.

IPPs: Inhibidores Peptídicos de Proteasas.

PAMS: Péptidos Antimicrobianos.

PMC: Multicistatina de Papa. Tipo de inhibidor de proteasa cisteínica de papa.

PDI: Inhibidor de catepsina D de Papa.

PSPI: Inhibidor de Proteasa Serínica de Papa.

PIN: Inhibidor de proteasa serínica de papa.

MMPs: Metaloproteasas de la Matriz.

kDa: Kilodaltons.

pI: Punto Isoeléctrico.

TTs: Tratamientos Térmicos.

EC: Extracto Crudo.

TT60: Tratamiento Térmico a 60°C.

TT70: Tratamiento Térmico a 70°C.

TT80: Tratamiento Térmico a 80°C.

TT90: tratamiento Térmico a 90°C.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

RP-HPLC: Reversed Phase HPLC. HPLC en Fase Reversa.

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.

BAPNA:

AJ: Ácido Jasmónico.

AS: Ácido Salicílico.

ET: Etileno.

LOX: Lipoxigenasa.

13-HPOT: 13(S)-hidroxilinoleico.

AOS: Aleno Óxido Sintasa.

AOC: Aleno Óxido Ciclasa.

JMT: Carboximetiltransferasa

OPDA: Ácido 12-oxofitodienoico.

MeJA: Metil Jasmonato.

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

J1 $\beta$ G: Jasmonoil-1- $\beta$ -glucosa.  
J1 $\beta$ Gen: Jasmonoil-1- $\beta$ -gentiobiosa.  
HJ1 $\beta$ G: Hidroxijasmonil-1- $\beta$ -glucosa.  
JA-Ile: Jasmonil-isoileucina.  
JAR1: AJ Conjugado Sintasa.  
COI1: Coronatina 1.  
JAZ: Zim-jasmonato.  
VSP2: Proteína Vegetal de Almacenamiento 2.  
SAR: Resistencia Sistémica Adquirida.  
ABA: Ácido Abscísico.  
ISO: Organización Internacional de Normalización.  
PDA: Potato Dextrose Agar. Agar Papa-dextrosa.  
TSC: Tripteína Soja Caldo.  
TSA: Tripteína Soja Agar.  
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.  
ARN: Ácido Ribonucleico.  
ARNm: ARN mensajero.  
ADNc: Ácido Desoxiribonucleico complementario.  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.  
DMSO: Dimetilsulfóxido.  
DTT: Ditiotreitól.  
EDTA: Ácido Etilen Diamin Tetraacético.  
Medio LB: Medio Luria-Bertani.  
MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectroscopy. Espectroscopía de Masa Laser de Desorción/Ionización Asistida por Matriz-Analizador de Tiempo de Vuelo.  
m/z: Relación masa/carga+1.  
PMF: Peptide Mass Fingerprinting. Huella Peptídica.  
RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa.  
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida.  
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.  
UFC: Unidades Formadoras de Colonias.  
CIL: Clonado independiente de ligación  
ORFs: Open Reading Frames. Marcos abiertos de lectura

# **INDICE DE CONTENIDOS**

<b>PRÓLOGO</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	2
<b>PARTE A: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INHIBIDORES DE     PROTEASAS</b> .....	2
A.1 Las proteasas.....	2
A.1.1 Peptidasas serínicas y treonínicas.....	3
A.1.2 Tripsina: una proteasa serínica modelo.....	3
A.1.3 Peptidasas cisteínicas.....	4
A.1.4 Peptidasas aspárticas.....	6
A.1.5 Metalopeptidasas.....	7
A.1.6 Peptidasas glutámicas.....	8
A.2 Inhibidores de proteasas.....	8
A.2.1 Función general de los IPs.....	8
A.2.2 Localización y función de IPs en plantas.....	9
A.2.2.1 Localización en plantas.....	9
A.2.2.2 Función en plantas.....	9
A.2.3 Clasificación y familias donde abundan.....	11
A.2.4 Clases de inhibidores de proteasas.....	12
A.2.4.1 Inhibidores de cisteín proteasas.....	12
A.2.4.2 Inhibidores de aspartil proteasas.....	13
A.2.4.3 Inhibidores de serín proteasas.....	13
A.2.4.3.1 Tipo Bowman-Birk.....	13
A.2.4.3.2 Tipo Kunitz.....	14
A.2.4.3.3 Serpinas.....	15
A.2.4.4 Inhibidores de metaloproteasas.....	16
A.2.4.5 Inhibidores de proteasas en papas.....	17
A.2.5 Potenciales aplicaciones biológicas de los IPs.....	17
A.2.6 Fundamentos de la inmovilización enzimática.....	20
<b>PARTE B: CLONADO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES</b> ....	25
B.1 Expresión de proteínas mediante el clonado.....	25
B.2 Análisis bioinformático de la proteína.....	25
B.3 Selección de la tecnología de clonado.....	26
B.3.1 Clonado tradicional.....	26
B.3.2 Clonado “Gateway”.....	27

B.3.3 Fusión/Clonado independiente de ligación (CIL).....	28
B.3.4 Clonado de precisión.....	29
B.4 Expresión de proteínas recombinantes.....	29
B.5 Microorganismo: Escherichia coli BL21 (DE3).....	30
B.6 Vector de Expresión: pHTP1.....	31
B.7 Temperatura de crecimiento e inducción.....	31
B.8 Densidad celular en el punto de inducción.....	32
B.9 Concentración del inductor IPTG.....	34
PARTE C: ANÁLISIS DE SOBREENPRESIÓN GÉNICA.....	36
C.1 Estudios sobre la sobreexpresión de genes en respuesta al estrés en plantas.....	36
C.2 Metabolismo del jasmonato.....	38
C.3 Señalización del jasmonato.....	40
C.4 Rol de los jasmonatos contra el estrés biótico.....	41
C.5 Rol de los jasmonatos en el estrés abiótico.....	42
PARTE D: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.....	44
D.1 Medición de turbidez.....	44
D.1.1 Definición de turbidez.....	44
D.1.2 Principio de medición de turbidez.....	44
D.1.3 Técnicas turbidimétricas de medición.....	45
D.2 Método de recuento en placa.....	45
D.3 Actividad inhibitoria sobre hongos mediante confrontación dual.....	46
D.4 Método del antibiograma en placa.....	46
D.4.1 Fundamento.....	46
D.4.2 Indicaciones y limitaciones.....	47
D.5 IPPs serínicos y sus diversas actividades biológicas: Actividad Antimicrobiana.....	47
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIAL VEGETAL.....</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
PARTE A: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASAS.....	60
A.1 Elección del medio de extracción.....	60

A.2 Aislamiento y caracterización bioquímica de los inhibidores de proteasa de papas andinas.....	61
A.3 Tratamiento térmico.....	62
A.4 Actividad inhibitoria de Tripsina y Carboxipeptidasa B frente a extractos crudos de Imilla Negra, Sacampaya Roja y Malcacha.....	64
A.5 Concentración y desalado mediante el uso de membranas de corte de 3 y 10 kDa.....	65
A.6 Caracterización Bioquímica de los inhibidores de tripsina presentes en Imilla Negra.....	66
A.7 Tratamientos Térmicos del EC de la variedad Imilla Negra.....	67
A.8 Ensayos de estabilidad a distintos pHs y diferentes fuerzas iónicas.....	68
A.9 Perfil de pesos moleculares de los TTs de Imilla Negra.....	70
A.10 Determinación del punto isoléctrico (pI) de los TTs de Imilla Negra.....	71
A.11 Purificación por cromatografía de afinidad.....	72
A.12 Caracterización proteómica de los IPPs de papas andinas.....	74
A.12.1 Confirmación de la identificación de IPPs mediante técnicas proteómicas.....	74
A.12.2 Secuenciación <i>de novo</i> de péptidos internos de la fracción retenida por la cromatografía de afinidad, mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS.....	75
A.13 Caracterización mediante SDS-PAGE de la fracción retenida de la cromatografía de afinidad.....	78
A.14 Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	79
A.15 Cromatografía de intercambio aniónico.....	81
A.16 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	83
A.17 Alineamiento múltiple de las secuencias que identifican con los compuestos de la fracción retenida en la cromatografía de afinidad.....	85
PARTE B: CLONADO Y EXPRESION DE IPPS DE PAPA ANDINA.....	87
B.1 Extracción del ARN total.....	87
B.2 Síntesis de la doble cadena híbrida ARN-ADNc.....	87
B.3 Amplificación de las secuencias codificantes para los IPPs.....	88
B.4 Ligación de las secuencias amplificadas en el vector pNZY28.....	89

B.5 Secuenciación de los productos de amplificación contenidos en el plásmido pNZY28.....	90
B.6 Clonado del oPTI en el vector de expresión pHTP1.....	92
B.7 Producción y análisis del oPTI.....	95
B.7.1 Expresión del oPTI.....	95
B.7.2 Purificación del oPTI.....	97
B.7.3 Ensayo de inhibición del oPTI frente a tripsina.....	98
PARTE C: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE INHIBIDORES DE PROTEASAS <i>IN VIVO</i> EN PLANTAS DE PAPAS.....	99
PARTE D: ENSAYOS ANTIMICROBIANOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PAPAS.....	104
D.1 Ensayos microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana de los IPPs de los extractos semipuros de papas andinas (Imilla Negra)....	104
D.1.1 Efecto inhibitorio de extractos de Imilla Negra sobre el crecimiento de bacterias.....	104
D.1.2 Efecto inhibitorio de los extractos semipuros de Imilla Negra sobre el desarrollo micelial de cultivos de <i>Phytophthora capsici</i> .....	106
D.2 Determinación del % de inhibición del crecimiento microbiano mediante recuento en placa de distintas variedades de papas andinas.....	107
D.3 Ensayos microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana del nuevo inhibidor obtenido en forma recombinante (oPTI).....	108
D.3.1 Ensayos antimicrobianos mediante halos de inhibición.....	108
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>114</b>
PARTE A: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE IPPs.....	114
A.1 Preparación de los extractos crudos.....	114
A.2 Determinación de actividad inhibitoria de proteasas.....	114
A.2.1 Detección de inhibidores de proteasas de los principales grupos mecanísticos.....	114
A.2.2 Determinación de actividad de serín proteasas.....	115
A.2.3 Determinación de actividad inhibitoria de serín proteasas.....	115
A.2.4 Determinación de actividad inhibitoria de cisteín proteasas.....	116

A.2.5	Determinación de actividad de metalocarboxipeptidasas...	116
A.2.6	Actividad inhibitoria de CPA y CPB.....	117
A.3	Tratamiento térmico del extracto crudo.....	117
A.4	Concentración y Purificación del extracto crudo.....	117
A.4.1	Separación y concentración por centrifugación con tubos Amicon con membrana de corte de 3 y 10 kDa.....	117
A.5	Caracterización de los extractos crudos.....	118
A.5.1	Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria de los ECs.....	118
A.5.2	Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria de los ECs.....	119
A.6	Cromatografía de afinidad.....	119
A.6.1	Proceso de inmovilización.....	119
A.7	Cromatografía de intercambio aniónico.....	120
A.8	Cromatografía líquida de alta eficacia o “ <i>high performance liquid chromatography</i> ” (HPLC).....	121
A.9	Análisis de pureza e identificación de los IPPs con herramientas proteómicas.....	121
A.9.1	Caracterización electroforética de los IPPs aislados o purificados.....	121
A.9.2	Protocolo de alta resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE).....	121
A.9.3	Isoelectroenfoque.....	127
A.9.4	Electrotransferencia.....	130
A.9.5	Caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	130
A.9.6	Métodos proteómicos.....	131
A.9.6.1	Huella peptídica ( <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> )....	132
A.9.6.2	Digestión trípica.....	132
A.9.6.3	PMF por MALDI-TOF/MS.....	132
A.9.6.4	Espectrometría de masas (EM) en tándem (MALDI-TOF-TOF/MS-MS).....	133
A.9.6.5	Análisis de la huella peptídica (PMF).....	134
A.9.6.6	Secuenciación de novo de péptidos internos del inhibidor mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS.....	135
PARTE B:	CLONADO Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE IPPS.....	136
B.1	Clonado de los inhibidores.....	136

B.1.1 Extracción del ARN total.....	136
B.1.2 Síntesis de la doble cadena híbrida ARN-ADNc.....	136
B.1.3 Amplificación por PCR.....	137
B.1.4 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN.....	138
B.1.5 Adenilación de productos de PCR.....	139
B.1.6 Ligación de productos de PCR al vector de clonado pNZY28.....	139
B.1.7 Principales características del vector pNZY28.....	140
B.1.8 Transformación de <i>E. coli</i> con los plásmidos recombinantes.....	140
B.1.9 Mecanismo de $\alpha$ -complementación.....	141
B.1.10 Extracción de ADN plasmídico.....	142
B.1.11 Screening rápido de colonias transformadas.....	143
B.1.12 Confirmación del clonado del gen del IPP dentro del plásmido pNZY28.....	144
B.2 Expresión heteróloga.....	144
B.2.1 Clonado direccional del oPTI en el vector de expresión pHTP1. Adición de secuencias 5' "overhangs".....	144
B.2.2 Producción del oPTI recombinante.....	148
B.2.3 Análisis por SDS-PAGE del oPTI.....	150
B.2.4 Cuantificación de proteínas.....	151
B.2.5 Estudio de la capacidad inhibidora de tripsina del oPTI.....	151
PARTE C: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE IPPS EN CULTIVOS IN VITRO DE PAPAS ANDINAS.....	153
C.1 Análisis de expresión de genes.....	153
C.1.1 Fase 0: preparación de la planta madre.....	154
C.1.2 Fase 1: desinfección del material vegetal.....	154
C.1.3 Fase 2: introducción del material <i>in vitro</i> .....	155
C.1.4 Fase 3: multiplicación de los brotes.....	155
C.1.5 Fase 4: elección de un medio de enraizamiento de los explantos.....	155
C.1.6 Fase 5: aclimatación de los explantos enraizados.....	155
C.1.7 Fase 6: Tratamientos de los explantos.....	156
PARTE D: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE IPPS DE PAPAS ANDINAS..	158
D.1 Ensayos microbiológicos.....	158

D.1.1 Ensayos turbidimétricos.....	158
D.1.2 Ensayos de recuento en placa.....	159
D.1.3 Actividad inhibitoria sobre un fitopatógeno mediante confrontación dual.....	162
D.1.4 Ensayos antimicrobianos mediante halos de inhibición.....	163
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>172</b>

PRÓLOGO

*SE SABE QUE LOS PRODUCTOS NATURALES CONSTITUYEN UNA DE LAS MAYORES FUENTES DE MATERIA PRIMA PARA EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS Y AGENTES ANTIMICROBIANOS, DEBIDO A SU DIVERSIDAD QUÍMICA Y A QUE SE LES SUPONE UNA TOXICIDAD INICIAL LIMITADA AL ENCONTRARSE EN SERES VIVOS. REQUIEREN MENOR COSTO DE OBTENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS RELATIVAMENTE SENCILLOS, SI SE COMPARAN CON LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN POR LA VÍA DE LA SÍNTESIS QUÍMICA. [AS FUENTES VEGETALES DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASAS (IPPs) HAN SIDO ESCASAMENTE EXPLORADAS Y TIENEN LA VENTAJA DE SU EXTRAORDINARIA RIQUEZA Y DIVERSIDAD Y, EN MUCHOS CASOS LA INEXISTENCIA DE PATENTES Y PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN, DIFICULTAN SU EXPLOTACIÓN. [LOS ESTUDIOS REFERIDOS A MATERIAL BOTÁNICO DE LA FLORA LATINOAMERICANA SON MÁS ESCASOS AÚN. POR ELLO, RESULTA DE SUMO INTERÉS EL ESTUDIO DE NUEVOS IPPs DE ORIGEN NATURAL PARA SU POTENCIAL IMPLEMENTACIÓN COMO ADITIVO NATURAL ALIMENTARIO; ASÍ COMO EL ESTUDIO DE SU VEHICULIZACIÓN AL SISTEMA GÁSTRICO CUANDO FORMAN PARTE DE ALIMENTOS, SUS ABSORCIONES, ESTABILIDADES Y ACCIONES ORGÁNICAS EN TEJIDOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS.*

# INTRODUCCION

## PARTE A

### CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE PROTEASAS

#### **A.1 Las proteasas**

Las proteasas son enzimas del grupo de las hidrolasas y se encuentran naturalmente en los organismos vivos y juegan un papel fundamental en casi todos los procesos biológicos. La apoptosis, coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que participan las proteasas escindiendo proteínas o pro-enzimas (Ward *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2006).

Estas enzimas son clasificadas en familias según sus similitudes estructurales; sin embargo, resulta también útil clasificarlas de acuerdo a los residuos aminoacídicos del sitio catalítico. De acuerdo a esta clasificación las proteasas se han dividido según su mecanismo de acción en: serín peptidasas, treonín peptidasas, cisteín peptidasas, aspartil peptidasas, glutamil peptidasas y metalopeptidasas (MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>).

Se ha demostrado que las proteasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Por tal motivo existe un creciente interés por obtener o diseñar inhibidores que puedan actuar como agentes terapéuticos teniendo como "blanco" a las proteasas. Entre las principales enfermedades en las que las enzimas proteolíticas están involucradas pueden mencionarse el cáncer, el SIDA (Krishnan y Murugan, 2016; Palavalli *et al.*, 2012; Baltimore *et al.*, 1998), el asma (Saw y Arora, 2016; Saw y Arora, 2015; Katz *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1998, Agusti *et al.*, 1998), la malaria (Sabotič J y Kos J, 2012; Trenholme *et al.*, 2010; Dahlgren *et al.*, 2003; Rosenthal *et al.*, 1998;) y el mal de Alzheimer (Barão *et al.*, 2016; Shamsi *et al.*, 2016; Dash *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2002; Maccioni *et al.*, 2001).

El proceso proteolítico está involucrado en la movilización de proteínas tisulares, en la regulación del metabolismo de proteínas intracelulares y en el procesamiento de neuropéptidos y funciones neurales. Los inhibidores de proteasas, en cambio, controlan a las proteasas y son esenciales para la regulación fisiológica. Tales inhibidores de

proteasas son pseudosustratos con afinidad hacia el sitio catalítico de las enzimas (Vergnolle, 2016; Sałaga et al., 2013; Huber *et al.*, 1993).

### *A.1.1 Peptidasas serínicas y treonínicas*

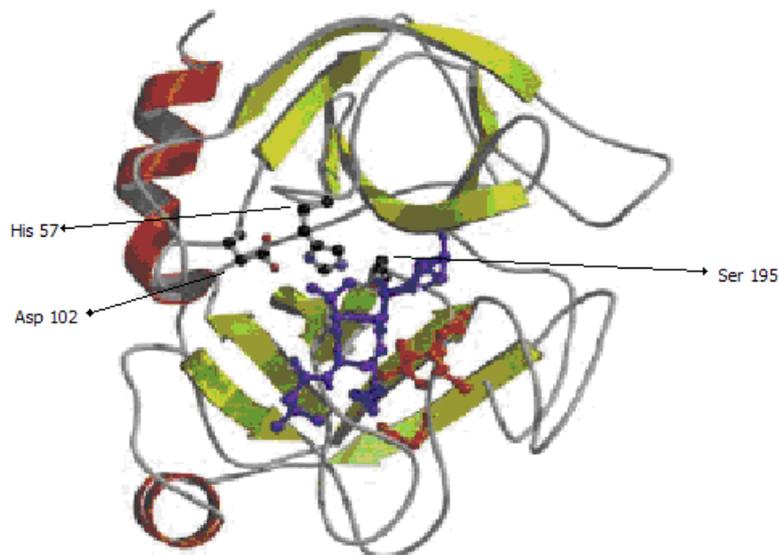
Esta clase de peptidasas comprende dos familias distintas: la familia de la quimotripsina que incluye enzimas de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastasa), plantas y microorganismos y la familia de la subtilisina, que si bien en un principio se creyó constituida solamente por enzimas bacterianas (ejemplo: subtilisina), actualmente se han encontrado representantes en otros microorganismos, en plantas y en animales superiores. Si bien la estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, ambas tienen la misma geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con el mismo mecanismo. Las proteinasas serínicas exhiben diferentes especificidades de sustrato, relacionadas con la sustitución de aminoácidos en varios subsitios enzimáticos que interactúan con los residuos de los sustratos. Algunas enzimas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato, mientras que otras tienen una especificidad restringida al residuo P1 del sustrato.

La actividad de las mismas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores, aunque los iones calcio intervienen en la activación de algunas proenzimas y estabilizarían a algunas enzimas.

### *A.1.2 Tripsina: una proteasa serínica modelo*

La tripsina pertenece a la familia S1 de las proteasas serínicas, subfamilia S1A, cuyo prototipo es la quimotripsina (Helfon *et al.*, 2004). Se caracteriza por clivar enlaces peptídicos cuyo extremo C-terminal está constituido por residuos aminoacídicos de arginina o lisina, con una preferencia de dos a diez veces superior por arginina. Es generada a partir del clivaje de un precursor inactivo, el tripsinógeno, el cual es sintetizado en la porción exócrina del páncreas, por parte de la enteroquinasa en la luz del duodeno. El tripsinógeno está formado por una única cadena polipeptídica de 245 aminoácidos. Durante su activación, la enteroquinasa escinde los enlaces peptídicos entre los residuos 14-15 y 147-148. Las tres cadenas peptídicas resultantes permanecen unidas por enlaces disulfuro, formando dos dominios del tipo barril- $\beta$

antiparalelo. Es entre estos dos dominios topológicos que se encuentra el sitio activo de la tripsina (**Figura 1**).



**Figura 1:** Representación estructural esquemática de tripsina. En negro: aminoácidos de la tríada catalítica, Serina 195, Histidina 57 y Ácido aspártico 102. En violeta y rojo claro: péptido a ser clivado; en amarillo y rojo oscuro: elementos de estructura secundaria: hebras beta y alfa hélices, respectivamente. Se distinguen el dominio I (parte superior) y el II (parte inferior). Imagen tomada de [http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio\\_008233-01.html](http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio_008233-01.html).

Este sitio activo está constituido por un bolsillo hidrofóbico donde la enzima interacciona con el sustrato y por una tríada catalítica formada por los aminoácidos Histidina, Serina y Ácido aspártico, los cuales son los encargados de la catálisis. Estos residuos se encuentran bastante alejados en la secuencia primaria, en las posiciones 57, 195 y 102 respectivamente, aunque muy cercanos en la estructura tridimensional: los residuos histidina y ácido aspártico pertenecen al dominio I (superior en la **Figura 1**) mientras que la serina se encuentra en el dominio II (inferior en la **Figura 1**).

### A.1.3 Peptidasas cisteínicas

Esta clase incluye las proteasas vegetales más extensamente estudiadas tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaína, varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma cruzi*. La mayoría de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína, que es la enzima cisteínica más ampliamente estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la

enzimología en general. Ha sido la primera proteinasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth *et al.*, 1968), por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas.

Actualmente se sabe que estas peptidasas se sintetizan en los polisomas del citoplasma como un precursor o propéptido N-terminal de corta longitud y otro C-terminal más largo. Esta proenzima inactiva se dirige al lumen del retículo endoplasmático y luego es transportada a las vacuolas o a la pared celular que constituyen su destino final. La mayoría de las proteínas solubles de las plantas poseen una secuencia señal a nivel del C-terminal reconocida por un receptor del aparato de Golgi (Okamoto *et al.*, 2003) y luego transportada por la red *trans* Golgi. Sin embargo, ciertas peptidasas de la familia de la papaína tienen una secuencia señal de retención al retículo endoplasmático y así, son transportadas en grandes vesículas que emergen del retículo y se fusionan directamente con las vacuolas almacenadoras de proteínas, sin pasar por el Aparato de Golgi, (Okamoto *et al.*, 2003). Finalmente, cuando se remueven las secuencias C y N- terminales del propéptido en estas vacuolas adoptan la conformación nativa que es la estructura química con capacidad de cumplir su función biológica (Grudkowska y Zagdańska, 2004).

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cisteína 25 y la Histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Serina 195 y de la Histidina 57, respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo  $-OH$ , sino un ion tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la Histidina 159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua. La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (zwitterión). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carboxilo del sustrato. La ruptura del mismo implica el ataque del agua catalizado por la enzima.

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó “tiolproteinasas” (Hartley, 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término “tiolproteinasas” por el de “proteinasas cisteínicas” (NC-IUBMB, 1984).

### A.1.4 Peptidasas aspárticas

La mayoría de las proteinasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas tales como pepsina y quimopepsina, catepsina D y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia incluye proteínas virales tales como la proteasa del virus del SIDA, llamada retropepsina.

Estudios cristalográficos permitieron mostrar que estas enzimas son moléculas constituidas por dos lóbulos homólogos, con el sitio activo localizado entre ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo aspártico de la díada activa de aspartatos. Estos dos residuos aspárticos están geoméricamente muy próximos en la molécula activa y uno sólo de ambos aspartatos es ionizado en el rango de pH óptimo (2-3). Por actuar en forma óptima a bajos valores de pH estas proteinasas también fueron denominadas “proteinasas ácidas” por Hartley (1960).

Las proteasas aspárticas vegetales conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar phitepsina aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Oryza* y *Vigna*, (Kulkarni y Rao, 2007; Kervinen, 1998) además de ciprosina obtenida a partir de *Centaurea calcitrapa* y de *Cynara cardunculus* (Cordeiro *et al.*, 1998) y cardosina A (Pires, 1998a) y cardosina B (Pires, 1998b) aisladas de *Cynara cardunculus*. Recientemente se aisló otra proteasa aspártica de la especie *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo Cavalli, 2005). Por otra parte, recientemente se ha caracterizado una proteasa aspártica de *Arabidopsis* implicada en procesos de defensa (Simões *et al.*, 2007).

Estas enzimas pueden ser monoméricas o heterodiméricas, conteniendo dos péptidos procesados a partir del mismo precursor proteico. Las proteinasas aspárticas de los vegetales son generalmente secretadas o bien destinadas al compartimento vacuolar. La secuencia primaria de algunas de estas enzimas ha sido determinada y presentan un alto grado de identidad con las de origen animal y microbiano; sin embargo, las proteinasas aspárticas vegetales tienen una región muy específica que no se encuentra en animales, microorganismos o proteinasas virales. Si bien la función de esta región no ha sido aún elucidada se ha propuesto una función en el procesamiento o degradación de proteínas, aunque se requerirían más estudios para confirmar su función *in vivo*. Resultados más recientes sugieren posibles roles en la muerte celular programada de los tejidos y en la resistencia a los patógenos (Mutlu y Gal, 1999).

### A.1.5 Metalopeptidasas

Las metaloproteinasas o metalopeptidasas se encuentran entre las hidrolasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado por una molécula de agua. Esta es una característica compartida con las proteasas aspárticas, pero en las metaloproteasas un catión metálico divalente, usualmente zinc, aunque algunas veces cobalto, níquel o manganeso, activan la molécula de agua. El ión metálico es generalmente sostenido por tres aminoácidos ligandos.

Estas proteinasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En varias metaloproteasas se requiere solamente un ión zinc, pero en algunas son dos los iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso, se requieren dos iones metálicos, aunque hay familias dependientes de zinc en las que también dos iones son cocatalíticos. En las proteinasas con iones metálicos cocatalíticos, solamente cinco residuos aminoácidos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metaloproteinasas con un ion metálico catalítico pueden ser exo- o endopeptidasas. Los ligandos conocidos son Histidina, Glutamina, Aspártico o Lisina.

Estas enzimas difieren ampliamente en sus secuencias y en sus estructuras, pero la gran mayoría contiene un átomo de zinc catalíticamente activo. En algunos casos, el zinc puede ser reemplazado por otro metal como cobalto o níquel sin pérdida de la actividad. La termolisina bacteriana ha sido bien caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico.

Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos histidinas para el zinc mientras el tercer ligando es tanto ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasas) o una histidina (astacina). Otras familias exhiben un modo diferente de unión al átomo de zinc. Las metalopeptidasas constituyen el grupo de enzimas proteolíticas menos estudiado en los vegetales. Existen solamente unas pocas referencias sobre la presencia de esta clase de enzimas en semillas de *Cucurbita pepo* (Hara y Matsubara, 1980), de soja: *Glicine max* (Bond y Bowles, 1983), de *Canavalia ensiformis* (Dalkin *et al.*, 1983) y de *Fagopyrum esculentum* (Belozersky *et al.*, 1990). Recientemente se han aislado de *Arabidopsis thaliana* (Chabregas, 2003).

### A.1.6 Peptidasas glutámicas

Las proteasas glutámicas en un principio fueron denominadas "carboxilpeptidasas insensibles a la pepstatina". Son similares a las aspárticas, de origen fúngico y pertenecen a la denominada familia G1. La importancia de los residuos glutámico 136 ("E") y glutamina 53 ("Q") en el sitio activo de estas proteasas llevó a proponer el término "familia EQolisina" para referirse a las mismas. El mecanismo sugerido es un ataque nucleofílico por una molécula de agua activada por la cadena lateral del glutámico 136 formando el intermediario tetraédrico con el átomo de C del enlace peptídico que se escinde. La asistencia electrofílica y la estabilización del oxianión son provistas por la amida de la glutamina 153. (Fujinaga *et al.*, 2004).

### **A.2 Inhibidores de proteasas**

Los inhibidores de proteasas (IPs) son compuestos químicos, que pueden ser de naturaleza peptídica o no, que se unen a una proteasa impidiendo su acción biológica. Los IPs son moléculas de bajo peso molecular que se clasifican de acuerdo al tipo de proteasa con la que interactúan: serínicas, cisteínicas aspárticas, metalo, glutámico y treonín peptidasa (Rawlings, 2010). Muchos de ellos son pequeños péptidos que oscilan de 15 a 40 aminoácidos, la mayoría de los cuales son hidrofóbicos y catiónicos, con un alto contenido de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro y confieren resistencia a tratamientos térmicos, pHs extremos, fuerza iónica y proteólisis. Están presentes en plantas, animales y microorganismos.

Las proteínas que inhiben son peptidasas de gran importancia en la medicina y la biotecnología, pero nunca ha habido un sistema completo de clasificación para ellas. Algunas de las terminologías usadas actualmente son potencialmente confusas. Con el fin de facilitar el intercambio, el almacenamiento y la recuperación de la información sobre los IPs, se ha desarrollado un sistema en el que las unidades inhibitorias de los inhibidores de proteasas se asignan a 48 familias sobre la base de similitudes detectables al nivel de la secuencia de aminoácidos (Rawlings *et al.* 2004).

#### A.2.1 Función general de los IPs

El proceso de inhibición puede darse mediante dos mecanismos alternativos, mecanismo reversible o mecanismo irreversible. Los inhibidores con mecanismos

irreversibles cambian la conformación de la enzima al unirse a la misma, cortan un enlace peptídico interno y se unen de manera covalente; ni el inhibidor ni la enzima pueden participar en futuras reacciones. En reacciones reversibles, el inhibidor se une directamente al sitio activo de la proteasa; esta reacción es reversible y el inhibidor puede disociarse de la enzima tanto en estado virgen o luego de una modificación por la proteasa (Rawlings *et al.*, 2004). La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuros, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Iwanaga *et al.*, 2005; Bode *et al.*, 1992;)

### *A.2.2 Localización y función de IPs en plantas*

#### *A.2.2.1 Localización en plantas*

Los IPs biológicos o naturales se encuentran en numerosos tejidos y fluidos de animales, plantas y microorganismos (Huber *et al.*, 1993). Con respecto a las plantas, podemos decir que los IPs están preferentemente concentrados en tejidos de almacenamiento, tales como semillas y tubérculos. Además, se han encontrado IPs en otros órganos tales como flores, raíces, hojas y frutos (Damle *et al.*, 2005; Sin *et al.*, 2004). También, se han localizado estas proteínas en el floema de tallos, raíces y hojas (Xu *et al.*, 2001) y por otro lado se han encontrado intracelularmente en los cuerpos proteicos vacuolares, la pared celular, los espacios intercelulares, en el citosol y el núcleo de células de los cotiledones (Kapur *et al.*, 1989).

#### *A.2.2.2 Función en plantas*

El papel de los inhibidores en la regulación de la actividad proteolítica es muy importante por la protección que proporcionan a tejidos y fluidos de la degradación no deseada, desempeñando un papel importante en el mecanismo de defensa de las plantas. Los inhibidores de proteasas encontrados en plantas, generalmente contienen altos porcentajes de cisteína formando puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes a la desnaturalización por calor y pH extremos. La expresión de estos inhibidores está altamente regulada por una ruta de transducción de señales que es iniciada por el

ataque del patógeno y transducida como una respuesta de daño. En plantas, los IPs se acumulan durante la maduración de las semillas, y se ha argumentado que la maduración de semillas es un indicador de su función de defensa (Kim *et al.*, 2009).

Con el ataque de herbívoros se inicia la respuesta de defensa de la planta que incluye la inducción de la expresión de genes de inhibidores de proteasas que pueden estar ligados directamente con la resistencia al ataque del insecto. La inducción de expresión de genes de inhibidores de proteasas ocurre tanto en células del sitio del daño, como en lugares distantes a ese sitio. La respuesta de defensa puede incluir la expresión de múltiples inhibidores de proteasas que pueden inhibir un amplio número de proteasas digestivas del herbívoro.

Además, muchas plantas producen compuestos que actúan como defensas específicas naturales contra pestes y patógenos. Los péptidos antimicrobianos (PAMS) proveen la primera línea de defensa contra microorganismos invasores tanto en plantas como animales. La inmunidad innata es una estrategia de defensa ancestral usada por organismos multicelulares para controlar la flora natural y combatir patógenos. Los péptidos en el rango de 15 a 40 aminoácidos de largo, de los cuales la mayoría son hidrofóbicos y catiónicos, están generalmente relacionados en la inmunidad innata. Tales péptidos proveen protección contra bacterias, hongos y virus, actuando sobre las paredes celulares de los patógenos (Kim *et al.*, 2009).

Por esto, podemos decir que los IPs son una de las más importantes clases de proteínas de defensa en las plantas. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos (De Leo *et al.*, 2002). Dentro de los inhibidores que están relacionados con la resistencia de las plantas a los patógenos se han observado elevados niveles de inhibidores de tripsina y quimotripsina. La síntesis de polipéptidos inhibitorios en respuesta a ataques por proteasas producidas por microorganismos patógenos fue observada por primera vez en tomates infectados por *Phytophthora infestans*, en el cual se encontraron niveles elevados inhibidores de tripsina y quimotripsina relacionados con la resistencia de las plantas al patógeno. Estudios posteriores mostraron que tubérculos de papas acumulaban inhibidores proteicos de serín proteasas de 20 a 24 kDa en respuesta a heridas mecánicas e infección por *P. infestans* (Kim *et al.*, 2009).

La acumulación de los IPs es elicitada por varios tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, incluyendo heridas mecánicas, ataque de insectos, ataque de patógenos y/o exposición a radiaciones UV. Respecto al daño mecánico, los fragmentos de pectinas

que son liberados de la pared celular de la planta, y los oligómeros de quitosanos derivados de la pared celular de hongos, se asume que actúan como inductores extracelulares de la ruta de señales que dirige a la expresión de genes de inhibidores de proteasas. Los polisacáridos inductores no parecen ser inmóviles en la planta, por lo que es probable que estas moléculas únicamente induzcan en forma local la expresión de genes de inhibidores de proteasas. La magnitud de respuesta de defensa es mucho mayor en plantas atacadas por insectos que en plantas dañadas mecánicamente.

Dentro de los compuestos que se expresan durante el estrés podemos destacar a algunas “moléculas señal” tales como sistemina, metil jasmonato, etileno, ácido abscísico, oligómeros de la pared celular fúngica, y la conjugación ácidos grasos-aminoácidos encontrada en la secreción oral de larvas.

También los IPs de plantas pueden jugar roles como proteínas de almacenaje o reguladores endógenos de proteasas, su rol de defensa contra herbívoros es su función mejor documentada. Los IPs de las plantas ingeridos inhiben proteasas digestivas del insecto herbívoro atacante, imponiendo un estrés fisiológico que retarda el crecimiento y desarrollo e incrementa la mortalidad (Horn *et al.*, 2005).

Estos inhibidores tienen usualmente un alto contenido de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes al calor, a pH extremo y a la proteólisis (Kansal *et al.*, 2008; Singhal, 2004; Greenblatt *et al.*, 1989).

### A.2.3 Clasificación y familias donde abundan

Los inhibidores de proteasas son encontrados en plantas pertenecientes a una variedad de grupos sistémicos. Sin embargo, elevados niveles de inhibidores de proteasas son a menudo encontrados en varias plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* (Kim *et al.*, 2009) y otro gran porcentaje en las familias *Leguminoceae* y *Graminaceae*.

Las proteínas solubles de papa (*Solanum tuberosum*) están compuestas principalmente de proteínas inhibidoras de proteasas (50% aprox.) y patatina (40% aprox.) Los inhibidores incluyen inhibidores de proteasas I y II (y otros inhibidores de serín proteasas), inhibidores de proteasas aspárticas de papa, inhibidores de proteasas de tipo Kunitz, inhibidores de carboxipeptidasa de papa, inhibidores de proteasas cisteínicas de papa y PMC o multicistatina de papa, otro inhibidor de proteasas cisteínicas (Nissen *et al.*, 2009).

Los IPs son clasificados de acuerdo a su secuencia de aminoácidos en familias estructurales. Una planta a menudo produce IPs de diferentes familias estructurales. IPs homólogos forman una familia multigénica o IPs multidominios, que colectivamente pueden inhibir un amplio rango de proteasas de vísceras de insecto (Horn *et al.*, 2005). Los IPs de diferentes orígenes han sido clasificados de acuerdo a sus características estructurales en 33 clanes y 63 familias, entre ellos los de origen vegetal aparecen distribuidos en 19 familias (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Si hay pruebas suficientes de que determinados IPs tienen ancestros en común, una familia puede ser dividida en subfamilias. Una familia puede contener un sólo inhibidor si no se han encontrado homologías en otros, y el producto de un gen puede contener varios dominios de inhibición distintos.

### *A.2.4 Clases de inhibidores de proteasas*

Los inhibidores de proteasas pueden inhibir proteasas aspárticas, serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas, entre otras (Kim *et al.*, 2009). Los inhibidores contra proteasas serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas son ubicuos, pero los inhibidores de proteasas aspárticas no han sido hasta ahora detectados en semillas, aún cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar (<http://www.ba.itb.cnr.it/PLANT-PIs/TabII.html>). De acuerdo con la secuencia de aminoácidos y de proteasas diana se reconocen 67 familias de inhibidores (Rawlings, 2010)

#### *A.2.4.1 Inhibidores de cisteín proteasas*

Estos inhibidores forman una superfamilia de proteínas subdivididas en cuatro familias: las estefinas, las cistatinas, los quinínógenos y las fitocistatinas (Turk *et al.*, 1991). Las estefinas de 11 kDa, son proteínas predominantemente intracelulares que carecen de enlaces disulfuro; las cistatinas de 11-13 kDa contienen dos enlaces disulfuro en el extremo carboxi-terminal del polipéptido; los quinínógenos de 60-120 kDa están compuestos de tres cistatinas tipo 2 unidas en tándem y las fitocistatinas entre 5–87 kDa con características similares a las encontradas en las subfamilias de las cistatinas (Turk *et al.*, 1997).

Numerosos estudios sugieren que las proteasas cisteínicas realizan el papel más importante en la digestión de las proteínas en el intestino medio de coleópteros, debido a que su inhibición afecta la digestión de las proteínas y la asimilación de aminoácidos esenciales (Botella *et al.*, 1996).

### A.2.4.2 Inhibidores de aspartil proteasas

Los inhibidores de proteasas aspárticas se unen a la hendidura del sitio activo de la enzima mediante enlaces de hidrógeno formados entre el oxígeno del carbonilo de los aminoácidos de la enzima D-T-G-S y los grupos amida de los aminoácidos del enlace escindible del inhibidor (Pearl, 1987). La protonación del péptido amida escindible se produce junto con la destrucción del estado de transición tetraédrico. El oxianión es estabilizado por enlaces de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo del inhibidor y el grupo amida de G76 y D77. La liberación de los productos neutros y la unión de una nueva molécula de agua restauran la actividad de la enzima (Davies, 1990).

Entre los inhibidores de las proteasas aspárticas el mejor caracterizado es el inhibidor de catepsina D de papa (PDI), este inhibidor tiene similitud con la familia del inhibidor de tripsina de soya (Mares *et al.*, 1989). Varios trabajos mostraron que PDI consiste de varias isoformas, las cuales han sido clonadas y secuenciadas (Ritonja *et al.*, 1990).

### A.2.4.3 Inhibidores de serín proteasas

#### A.2.4.3.1 Tipo Bowman-Birk

Los inhibidores de proteasas serínicas tipo Bowman-Birk están constituidos por cadenas polipeptídicas de 8-10 kDa, aunque se han reportado inhibidores de este tipo de hasta 17 kDa. Comúnmente poseen 14 residuos de cisteína formando 7 puentes disulfuro intracatenarios y dos sitios activos. Comúnmente existen varias isoformas del mismo inhibidor. Si la conformación del inhibidor es tal que los sitios activos se encuentran distantes uno del otro es probable que la interacción enzima-inhibidor sea 2:1 (**Figura 2**) ya sea en el caso de inhibición exclusiva (Ej: inhibidor de tripsina selectivo) o cuando el inhibidor (Ej: inhibidor de Tripsina/Quimotripsina) actúa sobre dos enzimas distintas (Qi *et al.*, 2005; Laskowski *et al.*, 2000; Prakash *et al.*, 1996; Gladysheva *et al.*, 1994).

### A.2.4.3.2 Tipo Kunitz

Estos inhibidores fueron nombrados así luego de que Moses Kunitz cristalizara el primer inhibidor representativo de la harina de soja (Kunitz, 1945).

Los inhibidores tipo Kunitz son usualmente proteínas de alrededor de 20 kDa con 4 residuos de cisteína formando 2 puentes disulfuro intracatenarios y un sólo sitio activo que generalmente es un residuo de arginina localizado en alguno de los loops de la proteína.

Los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) poseen un inhibidor de tipo Kunitz llamado inhibidor de proteasa serínica de papa (PSPI). El PSPI se puede unir simultáneamente a tripsina y quimotripsina, que son dos proteasas serínicas con diferente especificidad de sustrato. El rol biológico del PSPI en la planta no es claro. En principio, el PSPI podría actuar en la defensa de la planta o proteger proteínas de almacenamiento de la actividad enzimática de las proteasas endógenas, para prevenir la brotación prematura. Considerando que el PSPI es una de las proteínas más abundantes en los tubérculos de papa, es probable que también asuma el papel de proteína de almacenamiento (Grosse-Holz y van der Hoorn, 2016).

Inhibidores similares a los de tipo Kunitz son los de la familia de Inhibidores de Papa de Tipo I y II (PIN I y PIN II). Estos inhibidores muestran una diversidad funcional y estructural, especialmente en *Solanaceae*. Los PINs de plantas han sido caracterizados a nivel bioquímico y molecular. El primer aislamiento y caracterización de la proteína PIN I en tubérculos de papa fue reportada por Chye *et al.*, 2005 y por Fischer *et al.*, 2015.

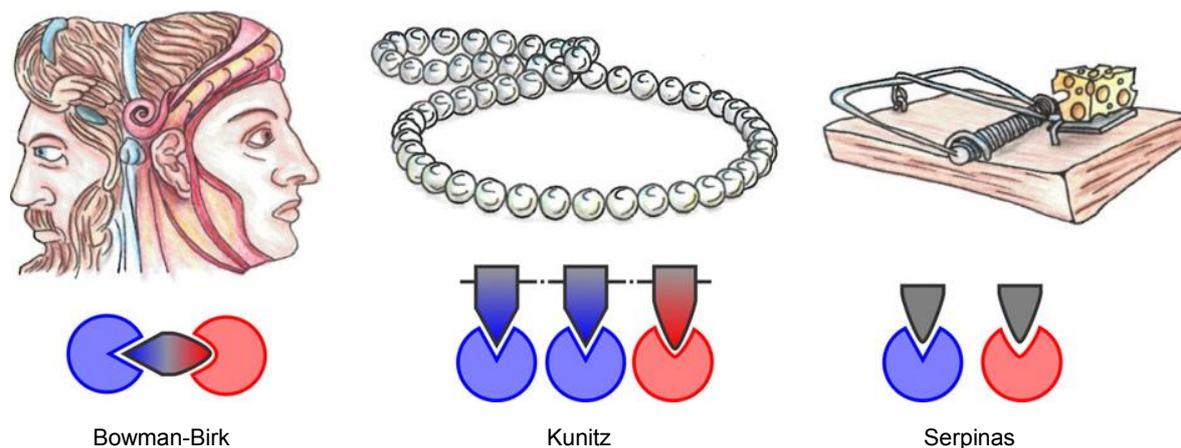
Los inhibidores de tipo Kunitz son muy abundantes en las subfamilias de *Leguminoceae*: *Mimosoidae*, *Caesalpinoidae* y *Papilionoidae*. Algunos inhibidores tipo Kunitz aislados de la familia *Mimosiodae* están constituidos por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro (Oliva *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1991; Negreiros *et al.*, 1991;). Los últimos descubrimientos han descrito una conformación de “trébol” en los inhibidores de tipo Kunitz. La longitud, la orientación y la composición de aminoácidos en los loops varía entre los inhibidores que poseen esta conformación, permitiéndoles inhibir hasta dos clases diferentes de proteasas (Grosse-Holz y van der Hoorn, 2016). Esta conformación, que es altamente estable debido a la estructura rígida que le da una gran estabilidad a los inhibidores de tipo Kunitz en

ambientes adversos, provee una plataforma para la evolución de un amplio rango de mecanismos de reconocimiento molecular multidominio (**Figura 2**).

### A.2.4.3.3 Serpinas

Las serpinas constituyen la mayor familia de inhibidores de serín proteasas y desempeñan funciones cruciales en multitud de sistemas biológicos de organismos presentes en todas las escalas biológicas. Los miembros de esta superfamilia presentan una elevada homología estructural, necesaria para el desarrollo de su extraordinaria y eficiente actividad inhibitoria. El mecanismo de acción de las serpinas (**Figura 2**) precisa un plegamiento metaestable que, tras la acción proteolítica de la serpina que inhibe, pasa a una configuración hiper estable asociada con la deformación e inhibición de la proteasa diana. Sin embargo, esta flexibilidad estructural también hace que las serpinas sean conformacionalmente vulnerables a factores ambientales y genéticos, con consecuencias patológicas, las denominadas serpinopatías que se incluyen dentro del denominado grupo de enfermedades conformacionales entre las que destacan el Alzheimer o el Parkinson (Stein *et al.*, 1995). La antitrombina, es una serpina anticoagulante que juega un papel clave en hemostasia, ya que incluso ligeras deficiencias pueden incrementar el riesgo trombótico.

Las serpinas han evolucionado para ser la familia predominante de los inhibidores de proteasas serínicas en el hombre. Su exclusivo mecanismo de inhibición implica un cambio profundo en la conformación; sin embargo, la naturaleza y la importancia de este cambio ha sido motivo de controversia. El cambio conformacional se inicia por la reacción de la serina activa de la proteasa con el centro activo de la serpina. La estrecha vinculación de las dos moléculas y el resultado de la superposición de sus estructuras no afectan a la serpina hiperestable, pero causa una pérdida sorprendente (37%) de la estructura de la proteasa. Esto es inducido por la remoción de la serina de su centro activo, junto con la rotura de las interacciones producidas durante la activación del zimógeno. La interrupción del sitio catalítico impide la liberación de la proteasa del complejo y el desorden estructural permite su destrucción proteolítica. (Huntington *et al.*, 2000).



**Figura 2:** Mecanismo de acción de los inhibidores (Grosse-Holz y van der Hoorn, 2016) de tipo Bowman-Birk (interacción enzima-inhibidor es 2:1 o el inhibidor actúa sobre dos enzimas distintas), Kunitz (inhibidores multidominio) y Serpinas (actúan como trampas de ratón, que inhiben diferentes proteasas al experimentar un cambio conformacional dramático tras la unión a la proteasa).

#### A.2.4.4 Inhibidores de metaloproteasas

Los inhibidores de metaloproteasas presentan diferentes mecanismos de inhibición. En el caso de los inhibidores de metaloproteasas tisulares tipo I, se cree que la inhibición puede deberse al bloqueo del sitio activo. En otros casos, como se ha observado en los inhibidores de metaloproteasas del género *Pseudomona*, el mecanismo de inhibición se produce por desplazamiento del agua mediante el aporte de un ligando metálico adicional.

Otros mecanismos de inhibición de inhibidores de proteasas son desconocidos pero se sabe que algunos tienen la particularidad de incluir puentes disulfuro que probablemente “enmascaran” el sitio activo de la proteasa (Rawlings, 2010).

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son endopeptidasas requeridas para la degradación de componentes de la matriz extracelular durante el desarrollo normal del embrión, la morfogénesis y el remodelado tisular. Sus actividades proteolíticas son reguladas precisamente mediante inhibidores de metaloproteasas endógenos (TIMPs) (Gomis-Ruth *et al.*, 1997).

### A.2.4.5 Inhibidores de proteasas en papas

Como habíamos dicho anteriormente, polipéptidos inhibidores de enzimas proteolíticas se encuentran en una variedad de grupos sistemáticos de plantas. En particular, se hallan niveles elevados de inhibidores de proteasas en muchas plantas de la familia *Solanaceae* (Plate *et al.*, 1993). Por ejemplo, estos inhibidores representan entre el 20-50 % de la totalidad de proteínas solubles en los tubérculos de papas (Pouvreau *et al.*, 2001). Dichos inhibidores tienen pesos moleculares de entre 2 y 24 kDa, y pueden inhibir proteasas serínicas (Walsh y Twitchell, 1991), aspárticas (Pouvreau *et al.*, 2003; Mares *et al.*, 1989), y cisteín proteinasas (Pouvreau *et al.*, 2003; Krizaj *et al.*, 1993) han sido caracterizadas en detalle. Basados en su estructura primaria, estos péptidos inhibitorios han sido agrupados como la superfamilia Kunitz de inhibidores de tripsina de soja (Valueva *et al.*, 1998). Los inhibidores de proteinasas de tubérculos de papas se clasifican además en una subfamilia independiente, los inhibidores de proteinasas de papa tipo Kunitz (Ishikawa *et al.*, 1994). Estos inhibidores se acumulan en hojas y tubérculos de papas en respuesta a heridas mecánicas (Valueva *et al.*, 2001), radiación UV (Conconi *et al.*, 1996), y lesiones por insectos (Bergey *et al.*, 1996) o microorganismos patógenos (Valueva *et al.*, 2003).

### *A.2.5 Potenciales aplicaciones biológicas de los IPs*

Desde épocas muy remotas el hombre ha buscado y empleado productos naturales para mitigar sus enfermedades, especialmente de origen vegetal debido a que algunos medicamentos sintéticos son discutidos no sólo por el alto costo del tratamiento sino por su reducida efectividad que obliga a complementar el tratamiento con otros medicamentos. Esto ha incentivado la búsqueda de compuestos naturales con actividad biológica, baja toxicidad y asequibles desde el punto de vista económico. En los últimos años la aparición de nuevas cepas mutantes de microorganismos resistentes a antibióticos normalmente utilizados ha estimulado un análisis sistemático de productos naturales con propiedades anti-bacterianas y anti-fúngicas que tienen aplicaciones nutraceuticas.

Por otra parte, son considerables los gastos económicos que se producen anualmente a escala internacional en concepto de pérdidas en cultivos de importancia

agroeconómica debido al ataque de plagas y fitopatógenos, así como por el uso de productos químicos destinados a prevenirlas y controlarlas.

Recientemente, varias proteínas y péptidos antimicrobianos de plantas que inhiben el crecimiento de patógenos agrónomicamente importantes han sido aislados de varias fuentes vegetales (Rocha *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 1999). Péptidos y proteínas antimicrobianas con una espectacular diversidad de estructuras incluyen proteínas tales como: taumatinas, proteínas abundantes de embriones, pequeñas proteínas ricas en cisteínas, proteínas ricas en arginina y glutamato, lectinas, tioninas, peroxidasas, proteínas inactivadoras de ribosomas, proteínas de transferencia de lípidos, proteínas de unión a quitina, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, proteasas e IPs, tal como se mencionó precedentemente. Estas proteínas pueden inhibir una gran variedad de fitopatógenos exhibiendo diferentes potenciales inactivadores conforme el tipo de microorganismo que se esté analizando (Rocha *et al.*, 2016; Bobbarala *et al.*, 2009). Recientemente, varios inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) fueron informados como potentes agentes anticancerígenos en una amplia variedad de sistemas *in vivo* e *in vitro*. Se ha visto también que hay inhibidores de serín proteasas que pueden incrementar el nivel de colecistoquinina debido a la inhibición de tripsina, por lo que pueden ser útiles para reducir el consumo de comida en humanos (Zhang *et al.*, 2008). Es importante resaltar el papel que ocupan las enfermedades fúngicas dentro del conjunto de afecciones que producen daños en las plantaciones, debido fundamentalmente a su diversidad y a lo difícil que resulta su control. (Goodwin, 1997). A nivel mundial las enfermedades causadas por hongos han ido en aumento y la terapéutica se ha visto limitada por varios factores: por un lado, la falta de entera efectividad de los fármacos así como de los efectos adversos que producen y por otro, la resistencia que presentan. Por tal motivo, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas antifúngicas a partir de componentes naturales que puedan ejercer el biocontrol de las plagas (Rocha *et al.*, 2016; Mendieta *et al.*, 2007; Pagano *et al.*, 2007). Otro ejemplo a destacar es el de varios hongos fitopatogénicos que son conocidos por producir proteinasas extracelulares que desempeñan un papel activo en el desarrollo de enfermedades. Las plantas sintetizan polipéptidos inhibitorios que pueden suprimir las actividades de la enzima en respuesta al ataque por las proteinasas producidas por microorganismos fitopatogénicos (Kim *et al.*, 2006).

En cuanto a la aplicación de los IPPs en la industria alimentaria se ha observado, por ejemplo, que la presencia de serín proteasas unidas a miofibrillas (MBSP) es crucial

para la degradación de las proteínas miofibrilares de pescado. La existencia de MBSP en el músculo de pescado fue notificada en diferentes especies de peces. Los IPPs se utilizaron para frenar este proceso de degradación de las proteínas, y así mantener la estructura del alimento (Zhong *et al.*, 2012).

Los IPPs tienen importantes aplicaciones en la biomedicina, la biotecnología, la industria alimenticia y el diagnóstico. Dichas moléculas representan para los organismos una eficiente vía de control de la actividad de proteasas endógenas, que necesitan ser balanceadas en estado normal para obtener una proteólisis controlada. La apoptosis, la coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que participan las proteasas escindiendo proteínas o proenzimas. Una regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, es por esto que muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas (Ward *et al.*, 2009). La actividad de los IPPs ha motivado de esta manera no sólo su uso en la biotecnología sino también en el diagnóstico o terapéutica de enfermedades tan diversas como el cáncer (Clemente *et al.*, 2012; Clemente *et al.*, 2010; Turk *et al.*, 2004; Kennedy y Wan 2002) y el Alzheimer, enfermedades inmunológicas, inflamatorias, cardiovasculares (Wood *et al.*, 2003) y respiratorias (Ottaviani *et al.*, 2005), como el asma, e infecciones parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria (Dash *et al.*, 2003), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Arribas *et al.*, 2005; Binford *et al.*, 2005), las hepatitis (Malcolm *et al.*, 2006; Lamarre *et al.*, 2003), entre otras (Ruseler-van Embden *et al.*, 2004).

Estas biomoléculas también abren un camino potencial como aditivos naturales para los procesos de conservación de alimentos. Esto podría llegar a producir grandes avances en la industria alimenticia y el bienestar de la comunidad, lo que a su vez, demuestra la importancia de estas tecnologías para la identificación y caracterización de nuevos IPPs. Como ejemplo de esto último se ha mencionado en la literatura que durante la última década se ha vuelto a pensar en el uso potencial de IPPs como nuevos agentes antimicrobianos (Macedo *et al.*, 2016; Habib *et al.*, 2016; Silva de Brito *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014; Shilpa Satheesh *et al.*, 2010).

Por último, los estudios referidos a material botánico de la flora argentina son sumamente escasos (Rocha *et al.*, 2015; Diaz *et al.* 2015; Diaz *et al.*, 2014), especialmente en el caso de los IPPs. Dada la gran biodiversidad vegetal existente en nuestro país, resulta de sumo interés la implementación de una búsqueda de nuevas moléculas naturales capaces de modificar o modular la actividad biológica de proteasas

y microbios, involucrados en la conservación de los alimentos o ciertas enfermedades patógenas (Rocha *et al.*, 2012).

Por otra parte, en los últimos años la tecnología de los alimentos y la nutrición están experimentando una profunda transformación gracias a la introducción del concepto de sustancias nutraceuticas y alimentos funcionales. Tanto los péptidos bioactivos como las proteínas funcionales han cobrado gran importancia por su función nutricional como fuente de aminoácidos y por su capacidad de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema inmune, el sistema cardiovascular o el tracto gastrointestinal (Ruseler-van Embden *et al.*, 2004). Se ha descrito que estos péptidos y proteínas pueden tener efectos anticancerígenos, antibacterianos o antivirales. Las proteínas de origen vegetal muestran frecuentemente mayor efecto hipocolesterolemizante que las proteínas animales (Martínez y Martínez, 2006).

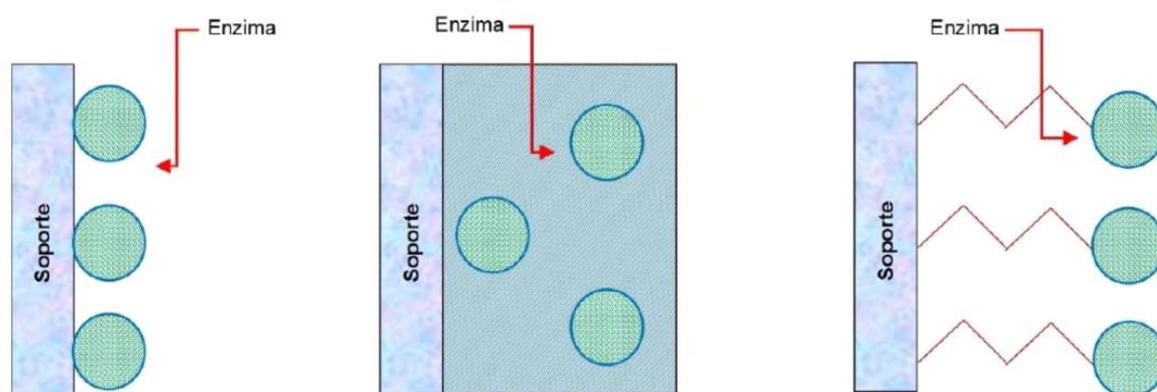
### *A.2.6 Fundamentos de la inmovilización enzimática*

El término inmovilización de enzimas se refiere a enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas.

Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos. Por razones técnicas y económicas la mayoría de los procesos químicos catalizados por enzimas requieren su reutilización o el continuo uso de biocatalizadores durante largos periodos de tiempo. Bajo esta perspectiva, la inmovilización debería ser definida como una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo de biocatalizadores. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos de inmovilización juegan un papel fundamental en la selección de protocolos de inmovilización. Es por ello que por medio de la inmovilización es posible no solo controlar la ubicación de las enzimas sino también modificar sus propiedades selectivamente.

En la actualidad, la industria requiere gran cantidad de enzimas con el fin de obtener productos con mejores características y menor costo. Por ello, la implementación de procedimientos que aumenten la estabilidad de las enzimas y permitan su reutilización ha sido por muchos años el objetivo de diversos laboratorios alrededor del mundo. La preparación y estabilización de enzimas ha sido un tema de estudio desde hace casi 50 años (Pedro, 1964) y es de interés tanto científico como económico. La inmovilización

combina la actividad elevada y específica de las biomoléculas activas, como las enzimas o anticuerpos, con la estabilidad química y mecánica del soporte. Consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos. Las enzimas pueden ser inmovilizadas en sustratos naturales y/o sintéticos por medios químicos (uniéndolas al sustrato mediante enlaces covalentes) o físicos (fuerzas electrostáticas o membranas), y pueden además ser encapsuladas mecánicamente por la adición de agentes que formen una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada (**Figura 3**), permitiendo el paso de reactivos y productos de pequeño tamaño, pero no de proteínas (Heering *et al.*, 2004; Wang y Caruso, 2004).



**Figura 3:** Componentes de un sistema de inmovilización: enzima, soporte y técnica de inmovilización; los métodos más comunes son (izq.) adsorción, (centro) entrapamiento y (der.) unión covalente.

Una de las mayores desventajas del uso de enzimas libres en la síntesis de péptidos es la imposibilidad de su reutilización. Al ser solubles en agua, la separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Debido a ello, la inmovilización de enzimas ha permitido superar estos últimos inconvenientes, haciendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable. Las enzimas inmovilizadas permiten un uso continuo, reutilización y control de las concentraciones de proteína empleada. Asimismo, es viable mejorar la estabilidad y actividad de la enzima en función del pH y la temperatura, además, al ser inmovilizadas quedan protegidas ante enzimas proteolíticas, aumentando así la eficiencia del sistema. Sin embargo, la inmovilización también puede presentar ciertas desventajas, por ejemplo, la actividad de la enzima puede verse afectada por el proceso de inmovilización, además, la velocidad de reacción puede estar limitada por la velocidad de difusión de

sustratos y productos hacia dentro y fuera del sistema. En la **Tabla 1** se presentan las principales ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas y además se compara con las ventajas y desventajas del uso de enzimas libres (Ferreira *et al.*, 2002; Giorno y Drioli, 2000).

**Tabla 1:** Comparación entre las ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas y enzimas libres.

Enzima Soluble		Enzima Inmovilizada	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor costo</li> <li>• Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular</li> <li>• No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran cantidad de enzima remanente en producto luego de participar en la reacción</li> <li>• No es posible el re-uso de la enzima</li> <li>• La reacción está limitada por Inhibición por producto</li> <li>• Dificultad de un preciso control</li> <li>• Si es necesario, detener la reacción con calor, lo que puede afectar el alimento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La enzima es reutilizable</li> <li>• La reacción puede terminarse por la separación del sustrato de la enzima</li> <li>• El control es más preciso</li> <li>• Hay una menor inhibición por producto</li> <li>• Mayor estabilidad a condiciones de Tº y pH</li> <li>• Puede usarse en forma batch o continua</li> <li>• Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja actividad específica (pérdida de actividad en inmovilización)</li> <li>• Restricciones difusionales o estéricas</li> <li>• Inactivación con una operación continua</li> <li>• Mayor costo, debido al soporte y el proceso de inmovilización</li> <li>• Necesita sanitización o regeneración del reactor.</li> </ul>

A medida que aumenta el número de aplicaciones prácticas, la cantidad de enzima requerida comienza a ser un factor limitante. Por ello, la inmovilización es considerada una posible vía de escape debido a que la enzima se puede reutilizar (Rodrigues *et al.*, 2013; Sheldon y van Pelt, 2013; Torres-Salas *et al.*, 2011; Hanefeld *et al.*, 2009). Además, se evita la agregación y autólisis enzimática ya que la inmovilización induce a la rigidez de la misma, proporciona estabilidad considerable hacia las variaciones de temperatura y disolventes orgánicos y genera un ambiente más adecuado, lográndose una alta estabilización de la enzima (Aissaoui *et al.*, 2013; Garcia-Galan *et al.*, 2011). La inmovilización por medio de carriers es tal vez la estrategia más utilizada para mejorar la estabilidad operativa de los biocatalizadores (Mateo *et al.*, 2007). Entre los métodos de inmovilización utilizados, la unión covalente multipunto es el más eficaz en términos de la estabilización térmica (Guisán *et al.*, 1997), aunque el entrapamiento en gel también proporciona dicha propiedad (Quiroga *et al.* 2011; Munjal y Sawhney, 2002). Para optimizar la inmovilización de proteasas se han desarrollado estrategias de

diseño racional que permite calcular la densidad de grupos reactivos que pueden interactuar con la proteína en la superficie sólida, minimizar los impedimentos estéricos y estimar la cantidad máxima teórica de proteína por unidad de superficie (Bolivar *et al.*, 2006). Entre los métodos de inmovilización por unión química, la unión covalente multipunto es quizás el método más interesante desde el punto de vista industrial, y es el más efectivo en términos de estabilización operacional y ofrece gran flexibilidad en cuanto al diseño del biocatalizador (Quiroga *et al.*, 2007). La inmovilización por unión covalente, se basa en el entrecruzamiento de la enzima y el material del soporte produciendo un enlace fuerte y estable. El enlace covalente es formado entre el grupo funcional de la matriz del soporte y la superficie de la enzima que contiene residuos de aminoácidos. La unión es normalmente formada entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y los grupos funcionales pertenecientes a los residuos de aminoácidos en la superficie de la enzima. Los residuos de aminoácidos que intervienen en la formación del enlace, son los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) de la lisina o la arginina (Tiller *et al.*, 1999), el grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) del ácido aspártico o ácido glutámico, los grupos sulfhidrilo de cisteína, los grupos hidroxilo ( $\text{OH}$ ) de la serina o treonina (Chibata *et al.*, 1986). Los materiales utilizados en esta técnica incluyen la poliacrilamida, agarosa y sílica. Los polímeros de polisacáridos, que son muy hidrofílicos, son materiales de soporte muy populares para la inmovilización de enzimas. La unión covalente de la enzima con el material del soporte, requiere de dos pasos: la activación del material de soporte que se lleva a cabo por la adición de un compuesto reactivo y el segundo es la modificación del esqueleto del polímero para activar la matriz. El paso de activación produce un grupo electrofílico en el material del soporte, de esta forma el soporte reacciona con los nucleófilos de las proteínas. Por ejemplo, el glutaraldehído es activado cuando reacciona con los grupos amino de las proteínas (Nisha *et al.*, 2012). La inmovilización de enzimas a soportes que contienen grupos aldehídos alifáticos, como por ejemplo glioxil-agarosa, presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico. Se puede aumentar la rigidez de la molécula enzimática y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparada a las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aún cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Bolivar *et al.*, 2006). La agarosa corresponde a un tipo de soporte utilizado para inmovilizar enzimas debido a sus buenas propiedades físico-químicas: a mayor grado de entrecruzamiento, se tiene

mayor superficie, dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, por lo tanto se puede cargar este soporte con más grupos reactivos. El soporte Glioxil o Glutaraldehido activado ha demostrado ser muy eficaz en el aumento de la estabilidad terciaria de la enzima, mediante inmovilización por unión colvalente multipunto, ya que la formación de puentes covalentes incrementa la rigidez de la enzima inmovilizada (Guisán *et al.*, 1997). La inmovilización en glioxil-agarosa se efectúa en medio alcalino, a través de la superficie de la proteína rica en lisina. La principal ventaja de este protocolo es la alta estabilidad que suele alcanzarse (Obregón *et al.*, 2015).

PARTE B

## CLONADO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

**B.1 Expresión de proteínas mediante el clonado**

Las proteínas en organismos hospedadores se expresan en cantidades limitadas y usualmente en respuesta a cierto estímulo. El principal objetivo del clonado es obtener un elevado nivel de la expresión de la proteína de interés, mayor a la del organismo de origen en lo que respecta a dicha proteína, de modo de poder producirla en cantidades, aproximadas al miligramo, necesarias para la caracterización estructural y funcional; además de someter la proteína expresada a ensayos antimicrobianos. Los sistemas de clonado pueden ser utilizados de una manera controlada para expresar la proteína de interés en respuesta a estímulos, cuando sea necesario hacerlo. Estos sistemas requieren de un inductor o de condiciones de estrés para desbloquear la transcripción progresiva del gen clonado de la proteína de interés (Ather, 2009). Con el desarrollo de la tecnología de clonado y expresión, el número de alternativas están presentes no sólo para metodologías de clonado, sino también para sistemas de clonado que se componen de vector de expresión y clon de expresión (opción de tipos celulares para expresión).

La selección cuidadosa del sistema de clonado de acuerdo a las características de la proteína y los requisitos para la purificación de la proteína, es el paso inicial y más importante en la expresión de la proteína en lo que respecta a la tecnología de clonado (Ather, 2009).

El segundo paso es la optimización de las condiciones de crecimiento o los constituyentes del medio para mayor rendimiento posible en un solo batch. La decisión teórica y experimental en estos dos pasos, gobiernan lo que es el desarrollo de sistemas de expresión económicamente viables (Ather, 2009).

**B.2 Análisis bioinformático de la proteína**

Antes de intentar expresar una proteína de interés, es requerido un análisis general bioinformático de la proteína para desarrollar una estrategia para la purificación, por ejemplo la determinación del punto isoeléctrico (pI) en caso de querer realizar una cromatografía de intercambio iónico. Una construcción por modelado es también útil

para dilucidar la parte terminal expuesta para la colocación de una cola adicional de aminoácidos (por ej. Histidina) en los extremos N-terminal o C-terminal con el propósito de poder utilizar a futuro, una cromatografía de afinidad para su purificación. La información de proteínas relacionadas de manera cercana es también útil para diseñar una estrategia de clonado y purificación. Algunas proteínas son diseñadas en la naturaleza para expresión periplásmica o extracelular, éstas proteínas pueden ser detectadas mediante el análisis a través del software SignalP (Figueiredo Neto y Figueiredo, 2016; Petersen *et al.*, 2011; Emanuelsson *et al.*, 2007; Bendtsen *et al.*, 2005).

Tales proteínas usualmente se expresan cuando son transportadas afuera de la célula o en el periplasma. Estas proteínas generalmente son exportadas afuera de la célula con la ayuda de una secuencia señal del vector de expresión y son clonadas sin una secuencia señal. Algunas proteínas son también expresadas en forma zimógena, en ese caso se necesita de una pro secuencia para ser identificada alineando con una enzima de la misma categoría, cuando se precisa expresar la proteína en la forma activa.

### **B.3 Selección de la tecnología de clonado**

Con el reciente avance en la ciencia del clonado, el método tradicional para el clonado de ADNc está siendo reemplazado por varios tipos de métodos de clonado de alto rendimiento. El número de factores es importante en su selección, la cuál incluye alta fidelidad (certeza), fácil uso, fiabilidad de sistema, validación del sistema clonado correctamente, flexibilidad para cambiar el vector o las especies dónde expresar, el costo total de la recombinación y el tiempo consumido (Marsischky y LaBaer, 2004).

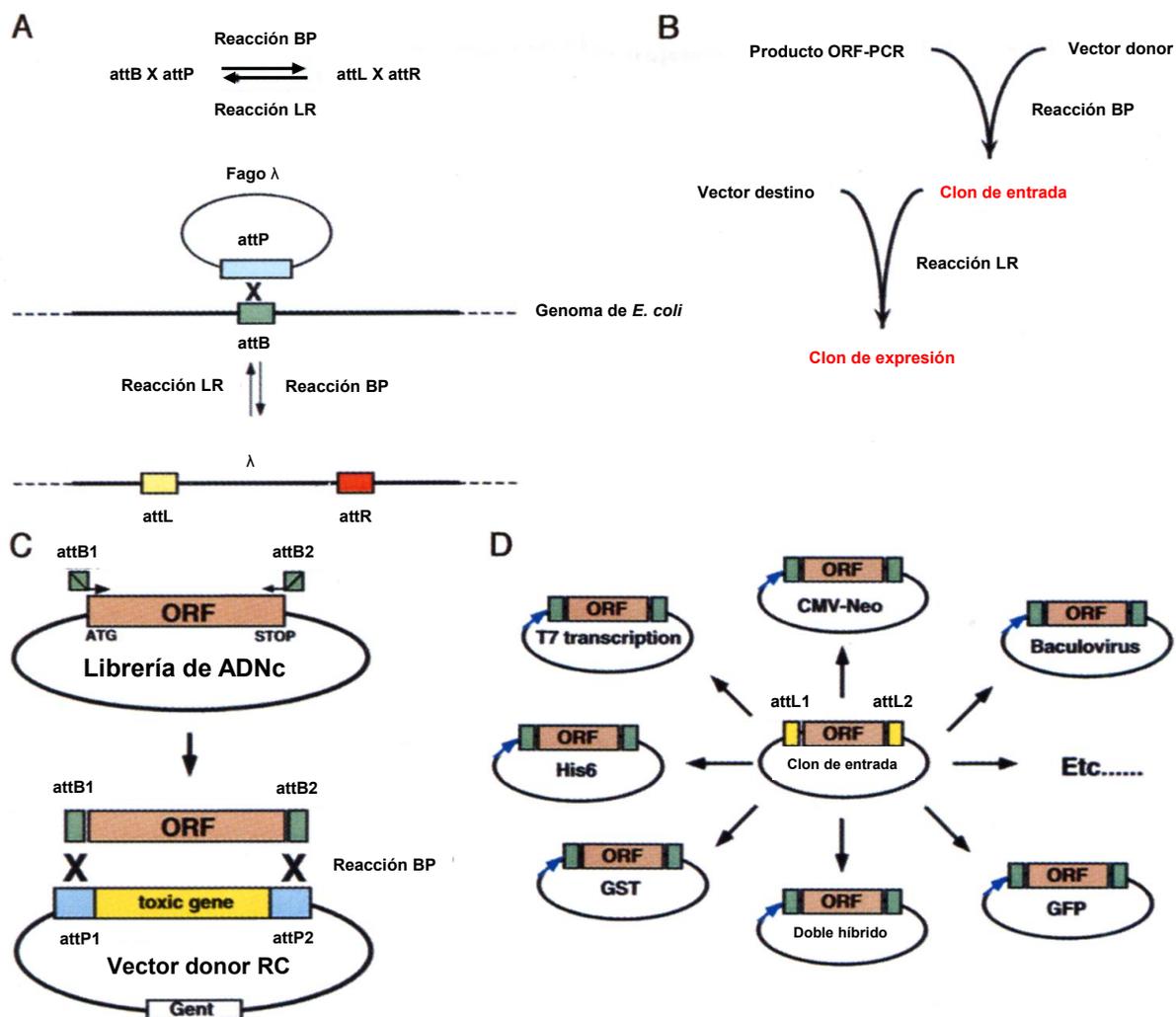
#### *B.3.1 Clonado tradicional*

Los métodos de clonado tradicional involucran las enzimas de restricción, enzimas de ligación, el planeamiento cauteloso para cada clon; por lo tanto, carece de universalidad. La ausencia de flexibilidad para cambiar entre vectores y células para expresar proteínas, hace que sea costoso en el sentido del tiempo consumido, por lo tanto resulta indeseable para estudios estructurales de alto rendimiento.

B.3.2 Clonado "Gateway"

Desde que se observó que el método de clonado de alto rendimiento basado en propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago Lambda ( $\lambda$ ) es eficiente para la expresión de diferentes clones expresados (**Figura 4**), es más deseable el uso del mismo en estudios de expresión (Walhout *et al.*, 2000).

Este sistema lleva todas las cualidades deseables incluyendo alta fidelidad, confiabilidad, flexibilidad y universalidad, por lo tanto, es más prevalente entre el biólogo molecular y el bioquímico.

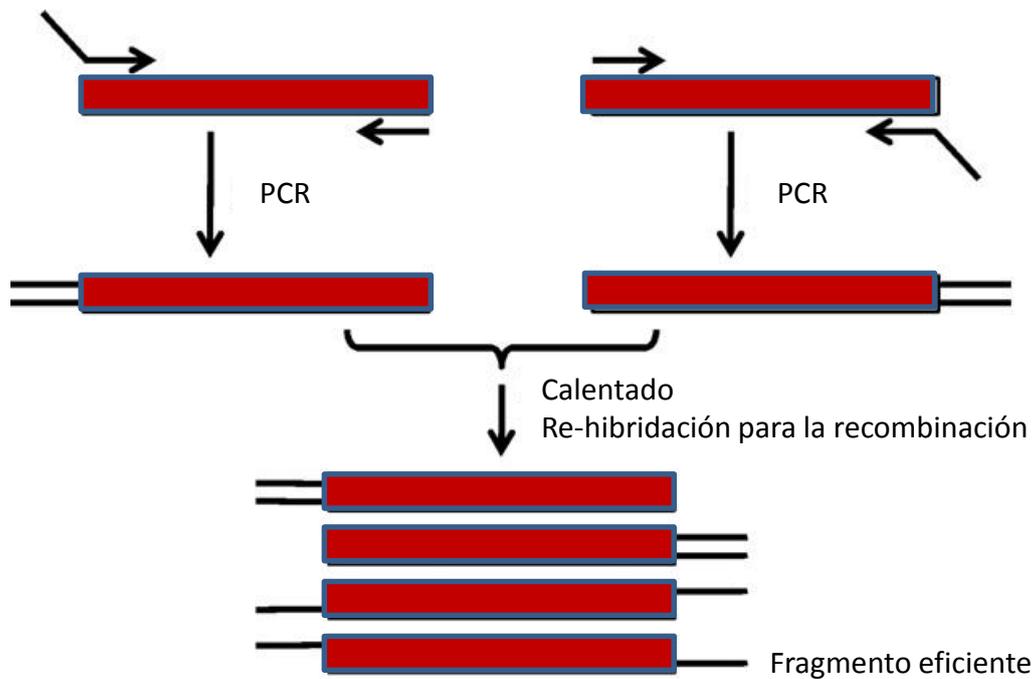


**Figura 4:** Clonado versátil de ORFs (*Open Reading Frames* o marcos abiertos de lectura) mediante clonado recombinante. A) El clonado recombinante está basado en la integración del fago  $\lambda$  dentro del genoma de *E. coli*. El sitio attP (caja azul de 242 pb) del fago recombina con el sitio attB (caja verde de 25 pb) del genoma bacteriano, generando sitios attL (caja amarilla de 100 pb) y attR (caja naranja de 168 pb). La reacción es reversible (reacción BP y LR: recombinación entre attB y attP o attL y attR, respectivamente), permitiendo la introducción del

ADN del fago dentro, y la escisión desde el genoma de *E. coli*. B) Esquema para RC. Los productos de PCR correspondientes a los ORFs de interés son clonados dentro de un vector donador RC mediante la reacción BP, generando clones de entrada. Subsecuentemente, los ORFs son subclonados, usando la reacción LR, dentro de vectores destino, generando los clones de expresión. C) Los ORFs pueden ser obtenidos mediante PCR usando primers con colas de attB y una librería de ADNc apropiada como molde de ADN. Versiones modificadas de sitios attB, attB1 y attB2 (cajas verdes), son adicionadas al extremo 5' de los primers específicos del ORF *forward* y *reverse*, respectivamente. Esto permite la amplificación específica de los ORFs de interés (caja naranja) y genera un producto en donde el ORF es flanqueado por los sitios attB1 y attB2. La presencia de estos sitios permite que ocurran 2 reacciones RC con el vector donador puede contener un gen tóxico (caja amarilla), flanqueado por los sitios attP1 y attP2 (indicados en azul). En el clon de entrada resultante, el ORF está flanqueado por los sitios attL1 y attL2. D) Una vez que un ORF es clonado dentro el vector de entrada, el mismo puede ser transferido mediante RC dentro de diferentes vectores destino que pueden contener un gen tóxico flanqueado por sitios attR1 y attR2. Ejemplos de vectores destino incluyen a los dobles híbridos, GFP, baculovirus, CMV-neo, His, GST, y vectores de transcripción T7. Además, nuevos vectores de destino pueden ser generados fácilmente (Walhout et al., 2000).

### *B.3.3 Fusión/Clonado independiente de ligación (CIL)*

CIL o LIC (Ligation independent cloning) es un sistema de alto rendimiento eficiente e inteligente independiente del uso del sitio de unión específico del bacteriófago  $\lambda$ . Utiliza terminaciones cohesivas del producto de PCR amplificado (**Figura 5**) y con terminaciones complementarias cohesivas del vector. Por lo tanto, la ligación ocurre independientemente de la enzima ligasa en una breve incubación *in vitro*. La selección de los clones fue realizada gracias a la identificación de los mismos como colonias blancas en las placas con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido IPTG y X-Gal, debido a que la inserción del gen interrumpe el gen lacZ (Tachibana *et al.*, 2009; de las Rivas *et al.*, 2007; Aslanidis y de Jong, 1990).



**Figura 5:** Preparación del inserto mediante PCR de extremos cohesivos.

#### B.3.4 Clonado de precisión

Este método de recombinación es un avance reciente, el cual implica reducir las secuencias de unión que a menudo permanecen unidas con el gen clonado, y después en la proteína expresada. Por lo tanto, este sistema agrega una modificación para evitar los inconvenientes de los dos sistemas antes mencionados (Engler *et al.*, 2008).

#### B.4 Expresión de proteínas recombinantes

Para la producción de una proteína recombinante es necesario caracterizar la proteína de interés obtenida de su origen biológico y, posteriormente, seleccionar un sistema para expresar la misma (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004). En el caso de los sistemas de expresión, los conocimientos asociados, han alcanzado niveles insospechados y continúan avanzando actualmente. Todos los sistemas poseen ventajas y desventajas; y ninguno es óptimo para la producción de cualquier tipo de proteína recombinante (Asenjo y Merchuck, 1995). Para la selección de un sistema de expresión adecuado, se debe tener en consideración el origen biológico, estructura y funcionalidad de la misma. En cuanto a la estructura y funcionalidad se debe analizar la secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias

de finalización de la transcripción; evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico; la estabilidad al pH, temperatura y el destino (extracelular o intracelular), entre otras cosas (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004).

### **B.5 Microorganismo: *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

La elección de las células hospedadoras para la producción de proteínas recombinantes depende principalmente de las propiedades y el uso final de la proteína expresada. Si la proteína consiste en múltiples subunidades o requiere sustanciales modificaciones post-traduccionales, el hospedador suele ser de origen eucariótico. La bacteria *Escherichia coli*, sin embargo, es exitosamente utilizada en la producción de proteínas relativamente complejas (Jonasson *et al.*, 2002).

*Escherichia coli* es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedador están: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y además posee diversas variantes mutantes (Choi *et al.*, 2006; Jonasson *et al.*, 2002). Los parámetros importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* incluyen eficiencia transcripcional y traduccional, estabilidad del vector de expresión y de los mRNA transcriptos, estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Jonasson *et al.*, 2002).

La cepa BL21 (DE3) es deficiente en el gen *lon* que codifica para la síntesis de una proteasa y carece también del gen *ompT* que codifica para otra proteasa de membrana externa, esta proteasa puede degradar proteínas durante la purificación. Además, presenta altos niveles de expresión y la expresión de la proteína recombinante es fácilmente inducida (lactosa o IPTG). La desventaja se asocia a la expresión basal de T7 RNA polimerasa. La T7 RNA Polimerasa es altamente selectiva y activa, cuando se induce fuertemente casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la proteína recombinante, los productos pueden corresponder hasta en un 50% a la proteína recombinante de interés.

### **B.6 Vector de Expresión: pHTP1**

Un vector de expresión para *E. coli* debe contener, además del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos (u otro marcador de selección), un promotor y un terminador transcripcional. El origen de replicación determina el número de copias del vector, el cual influye la estabilidad del plásmido, es decir, la conservación del plásmido dentro de las células durante la división celular. Un efecto positivo en el alto número de copias es la alta estabilidad de los plásmidos cuando ocurre un particionamiento aleatorio en la división celular. Por otro lado, un alto número de plásmidos generalmente disminuye la velocidad de crecimiento (Jonasson *et al.*, 2002).

La elección del vector puede incrementar la solubilidad y/o plegamiento de 3 formas: fusión a un polipéptido soluble, fusión a una enzima que catalice la formación de puentes disulfuro y fusión a una secuencia señal para transporte al espacio periplasmático. La exportación de proteínas al periplasma permite que la proteína posea un buen plegamiento y además favorece la formación de puentes disulfuro debido a la presencia de enzimas que catalizan su formación. En consecuencia, se obtienen proteínas solubles y activas (Larsen *et al.*, 2008).

La regulación de expresión se encuentra ligada a la fuerza del promotor. Un sistema promotor regulable proporciona la habilidad de activar la expresión del gen foráneo variando un factor ambiental, como la concentración de un componente particular en el medio de cultivo. El promotor *lac*, proveniente del operón lactosa de *E. coli*, es uno de los promotores más comúnmente utilizados para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias y ha sido extensamente caracterizado a nivel molecular (Donovan *et al.*, 1998).

### **B.7 Temperatura de crecimiento e inducción**

La temperatura óptima de crecimiento de *Escherichia coli* es 37 °C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 RNA polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas. El uso de temperaturas inferiores a la de crecimiento óptimo, en algunos casos puede reducir respuestas metabólicas indeseables para la síntesis de proteínas foráneas y, como

consecuencia, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés (Donovan *et al.*, 1998).

Reducir la temperatura permite disminuir la sobreproducción de proteínas y así disminuir la sobrecarga en la maquinaria transcripcional (Gordon *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37°C induce a la formación de cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas se genera un incremento en el plegamiento correcto de las proteínas producidas y la ubicación en los compartimentos deseados (Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, un decrecimiento pronunciado de la temperatura genera múltiples cambios celulares en respuesta, lo cual se conoce como “cold-shock adaptation” que provoca ineficiencias en el plegamiento de las proteínas (Gordon *et al.*, 2008).

En variados estudios, la temperatura de crecimiento y la de inducción son los factores de mayor significancia estadística en la producción de proteínas recombinantes. Esto se debe a que la temperatura es un factor importante en los procesos metabólicos, afectando la velocidad de transcripción y de traducción de proteínas (Martínez-Luaces *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2001). El efecto de la temperatura sobre las variables de salida del proceso de producción de proteínas recombinantes (productividad y rendimiento), ha generado gran interés para la optimización de la expresión del producto. Por ello se han desarrollado variados estudios en los cuales se utilizan distintas temperaturas de crecimiento e inducción para la producción de múltiples proteínas recombinantes.

### **B.8 Densidad celular en el punto de inducción**

Para lograr una mejor producción de proteínas, se debe inducir en un rango de densidad celular apropiado, que entregue condiciones metabólicas deseables lo cual permite alcanzar una máxima productividad.

La elevada producción basal de proteínas heterólogas, se debe a la existencia de un promotor fuerte, lo cual mengua el crecimiento celular. Por lo tanto, es necesario contar con la posibilidad de reprimir el promotor durante la fase de crecimiento celular hasta alcanzar una alta densidad del microorganismo antes de iniciar la inducción (Jonasson *et al.*, 2002). Al inducir a una alta densidad celular disminuye el efecto nocivo de la concentración de inductor sobre la densidad final alcanzada por el cultivo. Esto tiene estrecha relación con la producción específica, la cual es proporcional a la densidad

celular final alcanzada en la fermentación, bajo condiciones de inducción efectiva (Lee y Keasling, 2008; Babaeipour *et al.*, 2007).

Es recomendado alcanzar altas densidades celulares para inducir, pero no llegar a la etapa estacionaria, puesto que en esta etapa existen condiciones desfavorables, tales como: agotamiento de nutrientes, reducción drástica de la actividad metabólica, utilización de proteínas celulares no esenciales como fuente de carbono y actividad de proteasas aumentada. En cambio, la inducción a una alta velocidad específica de crecimiento entrega condiciones metabólicas más favorables como el alto contenido de ribosomas, mayor disponibilidad de nutrientes y menor concentración de subproductos tóxicos. Además, al no encontrarse en una etapa de limitación de nutrientes se puede reducir la respuesta de estrés antes y después de la inducción (Babaeipour *et al.*, 2007).

Se han desarrollado estudios que revelan una estrecha relación entre la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor en el medio de cultivo, por lo cual el análisis de este factor no debe ser aislado de otros factores que intervienen en la producción de proteínas recombinantes (Lee y Keasling, 2008). Es posible observar un gran número de estudios en los cuales se induce la producción de proteínas recombinantes en distintas etapas de crecimiento exponencial: temprana, intermedia y avanzada. Los resultados para cada estudio son completamente diferentes, por lo cual, no es posible establecer cuál es la densidad celular indicada para inducir la producción de todas las proteínas recombinantes. Esto se debe a que cada sistema de expresión, en conjunto con la proteína recombinante que expresa, posee condiciones óptimas específicas, para la producción de la proteína de interés.

La razón por la que la densidad celular en el punto de inducción y la concentración de inductor poseen una interacción, está relacionada a la concentración de IPTG por célula en el punto de inducción, es decir, si la densidad celular en el punto de inducción es alta, pocas células serán inducidas generando un cultivo heterogéneo de células productoras y no productoras. En cambio, si la densidad celular en el punto de inducción es baja, las células serán efectivamente inducidas, pero a su vez se generará un gran estrés metabólico, menguando la densidad celular final alcanzada por el cultivo (Shitu y Woodley, 2009).

### **B.9 Concentración del inductor IPTG**

El compuesto isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), suele utilizarse como inductor del operón *lac*, ya que es capaz de unirse al represor *lacI* e inactivarlo, pero no es sustrato para  $\beta$ -galactosidasa.

Para producir grandes cantidades de una proteína en *E. coli*, se procura ubicar el gen de la proteína deseada bajo el control de un promotor fuerte como el promotor T7. Sin embargo, se ha encontrado que las células fuertemente inducidas presentan un comportamiento indeseable: crecimiento lento, eventual detención del crecimiento y producción de proteínas insolubles. Esto se debe a que, en primer lugar, para una cantidad fija de proteínas totales, sobre-producir proteínas no esenciales da lugar a una reducción en la fracción de proteínas esenciales debido a una competencia por recursos. Segundo, a altos niveles de inducción de proteínas heterólogas, la bacteria degrada rRNA previamente ensamblado generando un colapso en el sistema de traducción, este fenómeno es atribuido a las proteínas de choque térmico, proteínas que poseen actividad proteolítica y se encuentran en las células ante condiciones de estrés (Kurland y Dong, 1996). En conclusión, la sobreexpresión de proteínas recombinantes provoca una rápida respuesta de estrés incrementando la actividad proteasa y la lisis celular. Además, la habilidad de transcribir de la T7 RNA polimerasa es ocho veces mayor que la de RNA polimerasa de *E. coli* (Lee y Keasling, 2008).

Los inconvenientes del uso de IPTG son: costo, toxicidad en humanos, limitando su uso para producción de proteínas terapéuticas; formación de proteínas en agregados insolubles o cuerpos de inclusión, a altas concentraciones de inductor; crecimiento retardado como consecuencia del desvío del metabolismo celular hacia procesos de producción del DNA plasmídico y expresión de la proteína recombinante. La carga metabólica termina inhibiendo el crecimiento, generando lisis celular o muerte. Por ello es necesario balancear la producción de la proteína recombinante con el crecimiento celular para maximizar los niveles de producción. Además, se debe considerar la relación biomasa-producción de proteína recombinante, bajo condiciones de inducción eficiente; es decir, se debe procurar obtener una alta densidad celular final del cultivo para obtener una mayor productividad en las fermentaciones (Lee y Keasling, 2008).

Por otro lado, una ventaja del uso de IPTG es que no puede ser metabolizado por la bacteria, lo cual permite que su concentración en el medio permanezca constante.

Además, el IPTG es transportado eficientemente al interior de las bacterias en ausencia de la proteína de membrana permeasa LacY mediante un transporte por difusión.

La proteína permeasa LacY, es una proteína de membrana que transporta  $\beta$ -galactósidos al interior de la bacteria *E. coli*, como lactosa e IPTG. El gen que codifica esta proteína es parte del operón *lac* junto a otros 2 genes estructurales, gen *lacZ* que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa que cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa más galactosa y el gen *lac "a"* que codifica la enzima tiogalactósido transferasa, gen no relacionado con el metabolismo de la lactosa. La lactosa induce la expresión de las proteínas encargadas de su transporte y metabolización, puesto que una vez transportada al interior de la célula se une a la proteína represora LacI generando un cambio conformacional que disminuye la afinidad del represor por la región operadora. De esta forma, la región operadora queda libre y la RNA polimerasa puede transcribir los genes estructurales produciéndose  $\beta$ -galactosidasa, permeasa LacY y tiogalactósido transferasa.

Algunas cepas tienen mutaciones, ausencia del gen *lacY*. Esto permite la entrada uniforme de IPTG en la población de células, lo que produce una dependencia entre el nivel de inducción y concentración de inductor más directa, menos sensible, y un nivel homogéneo de inducción, es decir, ajustando la concentración de IPTG, la expresión puede ser regulada de bajos niveles a niveles completamente inducidos (Jensen *et al.*; 1993). La permeasa LacY de *E. coli* tiene un papel importante en el transporte de IPTG a través de la membrana celular. Sin embargo, debido al transporte por difusión, la contribución de permeasa LacY ha sido reportada como no significativa en variados sistemas de expresión donde la inducción puede ser totalmente eficaz sin permeasa LacY (Hansen *et al.*, 1998). Las cepas que poseen el gen *lacY* presentan un comportamiento no lineal respecto a la expresión de las proteínas recombinantes y la concentración de IPTG en el medio de cultivo. Este fenómeno se debe a que el inductor induce la expresión de su transportador, permeasa Lac Y (Jensen *et al.*; 1993).

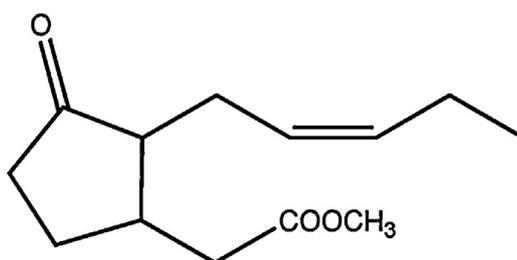
PARTE C

## ANÁLISIS DE SOBREENPRESIÓN GÉNICA

**C.1 Estudios sobre la sobreexpresión de genes en respuesta al estrés en plantas**

Las plantas viven en un ambiente que es, con frecuencia, caracterizado por la presencia de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico.

Las fitohormonas juegan un rol muy importante en el crecimiento de la planta, el desarrollo y la respuesta al estrés. Las hormonas de las plantas regulan diversos procesos de desarrollo y redes de señalización en plantas bajo diferentes tipos de estrés abiótico. Con el avance en la investigación biológica de plantas, se fue estableciendo que las fitohormonas ejercen un potencial de acción en la disminución de los efectos deletéreos debido a estrés abiótico (Khan *et al.*, 2013; Masood *et al.*, 2012). Las respuestas de defensa de las plantas son mediadas por tres grandes vías de las fitohormonas: ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno (ET). El ajuste fino de la respuesta de la planta al patógeno depende de la interacción sinérgica o antagónica entre estas tres rutas (Takahashi *et al.*, 2004).



Estructura del Metil Jasmonato

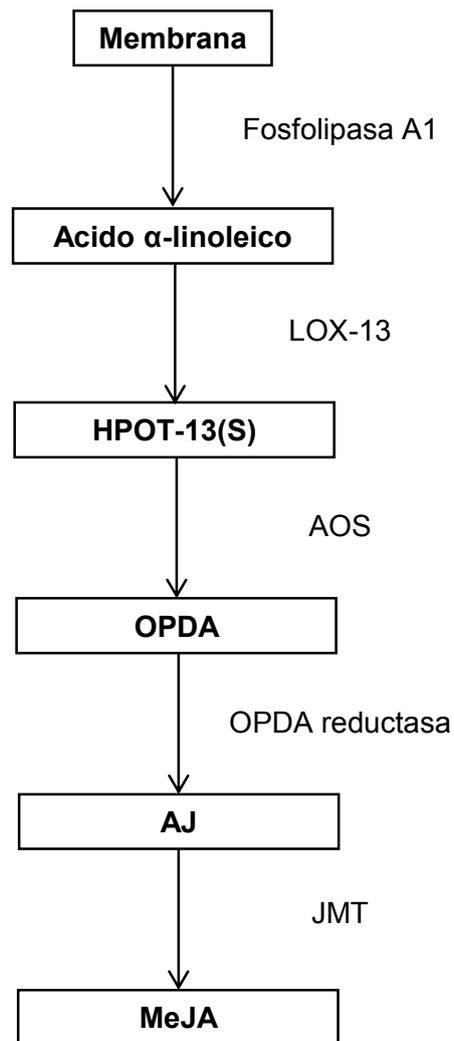
Los jasmonatos son conocidos por regular un largo rango de procesos en las plantas, como el crecimiento y desarrollo, incluyendo la defensa frente a estrés biótico y abiótico (Browse, 2009; Reinbothe *et al.*, 2009; Browse y Howe, 2008).

Los inductores extracelulares locales y sistémicos de la ruta de señalización son liberados mediante daño. La evidencia actual sugiere que la producción de los inhibidores ocurre mediante la ruta de los octadenanoides, que cataliza la rotura del ácido linoleico y la formación del ácido jasmónico que induce la expresión de inhibidores de proteasas (Dar *et al.*, 2015).

Todos estos descubrimientos indican que las plantas se defienden así mismas directamente induciendo la expresión de compuestos con actividad insecticida, como los IPs. Una defensa efectiva de las plantas contra las plagas depende casi críticamente de la eficacia de los efectores que median la resistencia (por ejemplo, inhibidores producidos por la planta que tienen como blanco las proteasas esenciales para el crecimiento y el desarrollo del herbívoro). Por lo tanto, es preciso identificar y estudiar los compuestos insecticidas de plantas como los IPs que tienen la potencialidad de retardar significativamente el crecimiento de herbívoros.

La utilización de los IPs de origen natural de plantas para atacar las enzimas digestivas de los insectos, ha sido considerada seriamente en el manejo de las plagas. Diversos estudios en la interacción entre las enzimas digestivas de los insectos y los IPs de plantas, han sido llevados a cabo con el objetivo de identificar potenciales inhibidores de proteasas de insectos (Purushottam *et al.*, 2012).

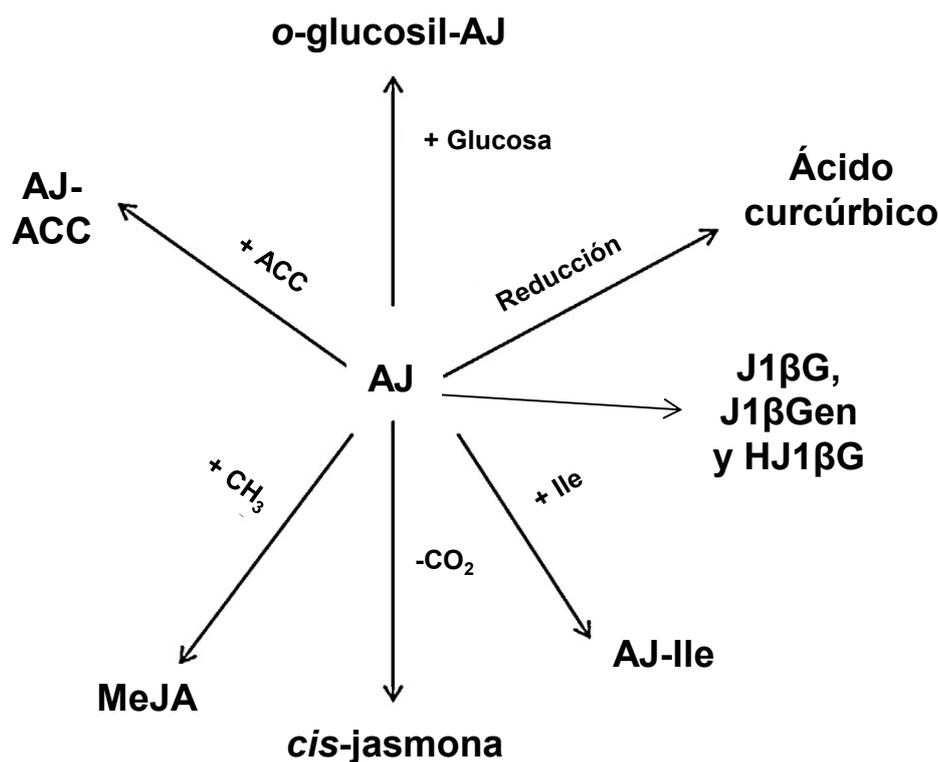
Los jasmonatos son ciclopentanonas derivadas de ácidos grasos que se producen de manera ubíqua en el reino vegetal. Los jasmonatos pertenecen a la familia de los derivados de ácidos grasos oxigenados llamados colectivamente oxilipinas, que son producidos por medio del metabolismo oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados. Los jasmonatos son sintetizados en plantas mediante la ruta del octadecanoide (**Figura 6**), y son similares en estructura y biogénesis a las prostaglandinas anti-inflamatorias de animal (Wasternack y Hause, 2002). Cierta estimulación activa fosfolipasas para liberar ácido  $\alpha$ -linoleico (18:3) desde la membrana lipídica. El ácido linoleico es oxigenado por la lipoxigenasa (LOX) para formar el ácido 13(S)-hidroxilinoico (13-HPOT), el cual luego es convertido en ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) por la aleno óxido sintasa (AOS) y la aleno óxido ciclasa (AOC). El ácido jasmónico es sintetizado desde OPDA a través de la reducción de tres pasos de  $\beta$ -oxidación después de ser catabolizado más adelante por la AJ carboximetiltransferasa (JMT) para formar su contraparte volátil MeJA (Seo *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2000). Ya que el AJ es derivado del 18:3 (ácido octadecatrienoico), las series de reacciones enzimáticas que llevan a la biosíntesis de AJ es a menudo llamada ruta del octadecanoide.



**Figura 6:** Ruta principal de la biosíntesis de jasmonato (Cheong y Do Choi, 2003).

## **C.2 Metabolismo del jasmonato**

El metabolismo del ácido jasmónico ocurre a través de siete rutas diferentes como es sabido, gracias a la información de los productos correspondientes de cada ruta (Figura 7).



**Figura 7:** Productos correspondientes a las diferentes rutas del metabolismo del JA.

1. La adenilación en el extremo carboxílico del AJ mediante la enzima conjugada AJ sintasa (JAR1) lleva a la formación de aminoácidos conjugados (Staswick y Tiryaki, 2004).
2. La reducción en el grupo ceto de los anillos de ciclopentanona lleva a la formación de ácido curcúrbico (Sembdner y Parthier, 1993).
3. El ácido jasmónico puede ser descarboxilado para formar *cis*-jasmona (Koch *et al.*, 1997).
4. La cadena lateral de ácido carboxílico del AJ puede ser conjugado al precursor del etileno llamado 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Staswick y Tiryaki, 2004).
5. El AJ puede ser metilado mediante la enzima metiltransferasa específica de AJ (Seo *et al.*, 2001).
6. La cadena lateral pentenil puede ser hidroxilada a C-11 y C-12 las cuales son seguidas de *o*-glucosilación (Swiątek *et al.*, 2004; Sembdner y Parthier, 1993) o sulfatación (Gidda *et al.*, 2003).
7. La formación de jasmonoil-1-β-glucosa (J1βG), jasmonoil-1-β-gentiobiosa (J1βGen) y hidroxijasmonil-1-β-glucosa (HJ1βG) (Swiątek *et al.*, 2004).

### C.3 Señalización del jasmonato

Diferentes tipos de estrés como el estrés salino (Dombrowski, 2003; Pedranzani *et al.*, 2003), por lesión, sequía, osmótico (Kramell *et al.*, 1995), irradiación por UV (Demkura *et al.*, 2010), ozono (Rao *et al.*, 2000) y exposición a elicitores como quitinas, oligosacáridos, oligogalacturonoides (Doares *et al.*, 1995) son conocidos por inducir la señalización del jasmonato en plantas. Los jasmonatos causan estimulación de mecanismos de resistencia indirectos (emisiones volátiles) y directos (proteínas de defensa) en plantas debido al ataque de herbívoros (Pieterse *et al.*, 2006; Halitschke y Baldwin, 2004; Howe, 2004;).

El presente conocimiento respecto a la señalización del jasmonato viene de los estudios de un mutante COI1 de *Arabidopsis*, el cual codifica para una proteína F-box (Xie *et al.*, 1998) y es deficiente en la biosíntesis de jasmonato (Mandaokar *et al.*, 2006). De los estudios del mutante COI1, se concluyó que el complejo Skp/Cullin/F-box (SCFCOI1), un tipo de proteína ligasa de ubiquitina E3 (Deshaies, 1999) interviene en la señalización y percepción del jasmonato. Por lo tanto, proteínas específicas son ubiquitinadas en la señalización del jasmonato por el complejo (SCFCOI1) y posteriormente degradado por el proteosoma 26S (Turner *et al.*, 2002). En el comienzo de las condiciones de estrés como un ataque herbívoro, la síntesis de jasmonato ocurre a través de la ruta de la biosíntesis de oxilipina (Gfeller *et al.*, 2010; Wasternack, 2007). La forma activa de los jasmonatos, la jasmonil-iso-leucina (JA-Ile) es entonces formada a través de la conjugación de jasmonatos con la iso-leucina en presencia de la enzima AJ conjugado sintasa (JAR1) (Staswick y Tiryaki, 2004). El receptor de jasmonil-iso-leucina (JA-Ile) es insensible a la coronatina 1 (COI1) presente en el complejo SCFCOI1 (Sheard *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2009;). Cuando el AJ-Ile se une a su receptor COI1, causa la degradación de las proteínas del dominio Zim-jasmonato (JAZ) que son las proteínas represoras de la transcripción del jasmonato a través del proteosoma 26S (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Cuando las proteínas de JAZ interactúan con activadores de la transcripción causan represión de la señalización del jasmonato, sin embargo, en células estimuladas con AJ las mismas no pueden interactuar con las proteínas de JAZ, lo cual resulta en la activación de suficientes genes que responden al AJ (Memelink, 2009; Chini *et al.*, 2007;)

#### **C.4 Rol de los jasmonatos contra el estrés biótico**

Las plantas que son organismos sésiles, no tienen otra oportunidad que adaptarse al cambio de las condiciones de su medio ambiente a cualquier costo, y están constantemente bajo amenaza de ataques de patógenos como son los virus, las bacterias, los hongos e insectos. Para contraatacar el estrés biótico, las plantas usan las funciones de las hormonas de plantas y las principales hormonas involucradas en el proceso son los jasmonatos (AJs), el ácido salicílico (AS) y el etileno (ET). Generalmente, el AS provee resistencia contra patógenos biotróficos (Durrant y Dong, 2004), mientras que los AJs y el ET operan contra necrótrofos (Glazebrook, 2005). Los AJs son vitales proveyendo defensa contra estrés biótico. Mediante tratamiento con jasmonato, la resistencia contra pestes es mejorada y puede ser fácilmente comprendida desde la síntesis de jasmonato y respuesta de los mutantes (Halitschke y Baldwin, 2004).

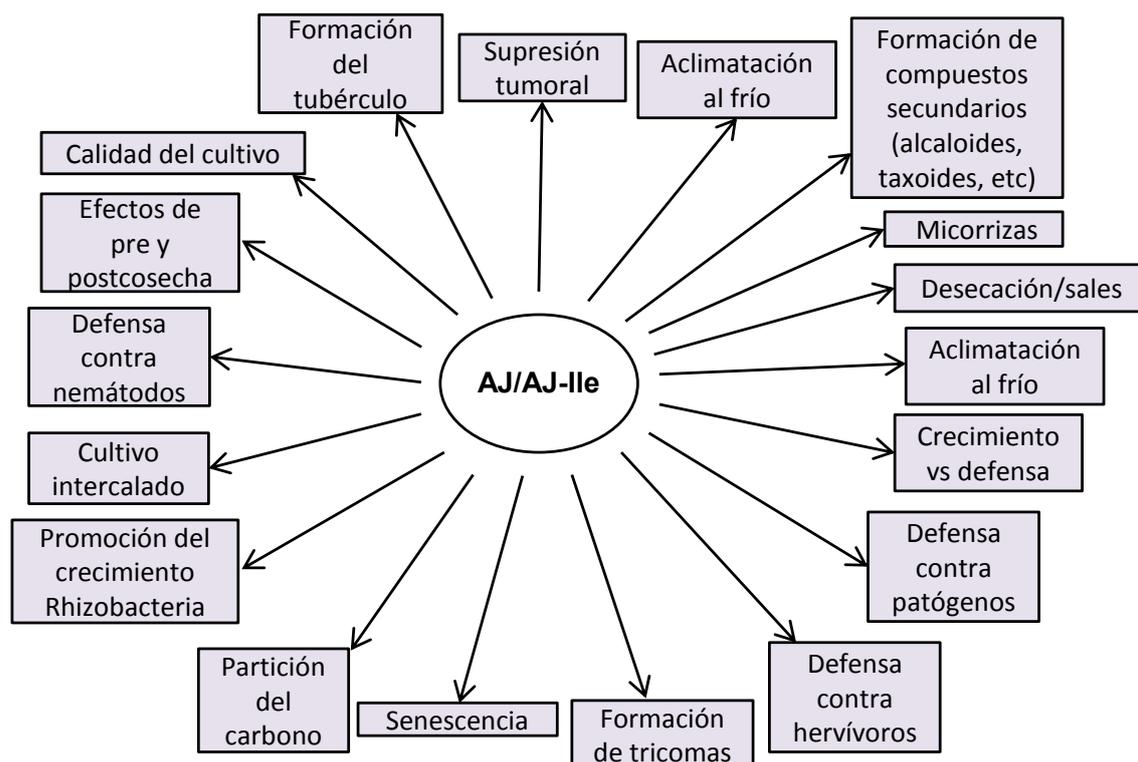
Cuando MeJA fue usado a una concentración entre 5 y 10 mM, la población de *Myzus persicae* fue significativamente reducida (Boughton *et al.*, 2006). Durante un ataque de insecto, los jasmonatos activan una ruta de señalización defensiva. Fue descubierto que cuando las plantas de *Arabidopsis* son atacadas por un insecto herbívoro específico *Pieris rapae*, se provoca una activación de la rama específica MYC2 de la señalización de AJ, la cual expresa el gen de proteína vegetal de almacenamiento 2 (VSP2). Un patrón similar de respuesta se ha observado contra *Spodoptera litoralis*, que es un insecto generalista (Bodenhausen y Reymond, 2007). Cuando las plantas son expuestas a estrés por primera vez, las plantas responden al mismo de manera más efectiva la segunda vez, un fenómeno llamado “el cebador” y ha sido estudiado principalmente en las interacciones planta-patógeno (Pastor *et al.*, 2013; Conrath *et al.*, 2006).

Durante la interacción planta-patógeno, la señalización de AJ interacciona tanto sinérgicamente como antagonísticamente con el AS (Durrant y Dong, 2004). En *Arabidopsis*, la resistencia local contra el patógeno necrotrópica *Botrytis cinerea*, da lugar a la inducción de la señalización de AS y AJ (Ferrari *et al.*, 2003) y ha sido demostrado que la acumulación de AJ en los exudados del floema es esencial para la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). Se encontró que las defensas dependientes de jasmonato son efectivas contra patógenos necrotrópicos, pero cuando se les suministró AS a las plantas y fueron inoculadas con cepas activas de *Pseudomonas syringae*, las

mismas mostraron poca oposición contra los patógenos necrotróficos como *Alternaria brassicicola*. Sin embargo, cuando las plantas fueron inoculadas con una cepa no virulenta de *P. syringae*, la resistencia contra *Alternaria brassicicola* no fue cuestionada. El ácido abscísico (ABA) es conocido por estar involucrado en la producción de AJ e inducción de defensa (Adie *et al.*, 2007).

### **C.5 Rol de los jasmonatos en el estrés abiótico**

Las plantas han desarrollado varios mecanismos bioquímicos y fisicoquímicos para poder responder, adaptar y adquirir tolerancia a un determinado estrés. Las defensas preexistentes e inducidas están involucradas en la adaptación mediada por estrés (Pastori y Foyer 2002). Fue reportado que existe un 50% de pérdida de rendimiento en los cultivos más grandes debido a diferentes tipos de estrés abiótico; como la sequía, la salinidad, el frío y el estrés por metales pesados (Wasternack, 2014). El estrés abiótico es conocido por causar tanto desequilibrio osmótico como iónico. Los jasmonatos son las moléculas de señalización que activan las rutas de señalización de la traducción en respuesta a diferentes tipos de estrés (Wasternack, 2014; **Figura 8**).



**Figura 8:** El ácido jasmónico (AJ) y su conjugado con isoleucina son señales de varias respuestas a estrés biótico y abiótico, en procesos de desarrollo, sino también en aspectos aplicados de importancia agronómica como la calidad de los cultivos, intercalación de cultivos o defensa contra patógenos necrótrofos o herbívoros. La supresión de tumores mediante AJ/AJ-Ile, debe ser de importancia mediante preparados farmacéuticos de extractos de plantas con alto contenido AJ/AJ-Ile (Wasternack, 2014).

## PARTE D

### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

#### **D.1 Medición de turbidez** (Acebo-González y Hernández-García, 2013)

##### *D.1.1 Definición de turbidez*

La turbidez se define por la Organización Internacional de Normalización (ISO), como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. Al ser un indicador de apariencia óptica, ocasionado por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través del líquido, la turbidez solo puede ser medida usando técnicas ópticas.

Se fundamenta en la relación de la intensidad de la luz incidente y de la luz dispersada por el medio, mediante la ley de Lambert-Beer, en la que la turbidez es proporcional a la concentración de partículas. La proporcionalidad entre la intensidad de la luz incidente y la luz dispersada por el medio depende del tamaño y de la forma de las células que se encuentren en el medio que se esté analizando, que también puede ser afectada por las condiciones ambientales. La correlación entre la concentración de partículas y la turbidez, también llamada calibración, depende, en el caso del análisis de cultivos bacterianos, de las especies bacterianas que se estén analizando, y en ocasiones, incluso de la cepa específica utilizada. La medición de turbidez se usa para estimar los indicadores de crecimiento de bacterias como una alternativa a los recuentos de las placas tradicionales. Su utilización se ha incrementado como nueva tendencia en la microbiología predictiva y ha comenzado a centrarse en la cuantificación de la variabilidad de las respuestas bacterianas en los entornos de los alimentos y otros productos industriales.

##### *D.1.2 Principio de medición de turbidez*

Cuando el haz de luz atraviesa el fluido de la muestra, los sólidos suspendidos dispersan la luz en todas direcciones. La reducción de la intensidad del haz de luz se debe a la difusión del haz por dichos sólidos suspendidos en el medio. Sin embargo, la absorción de la radiación incidente por sustancias coloreadas disueltas, también reduce la intensidad de la luz y debe tenerse en cuenta para contrarrestar este efecto, de

forma manual o automática. En el análisis de bajas cantidades de sólidos suspendidos, se suele usar la medida de la luz dispersa, debido a que los fotodetectores detectan pequeños cambios de la intensidad de la luz en contraste con un fondo oscuro. Sin embargo, este método tiene como desventaja que con grandes cantidades de sólidos disueltos en la muestra, se produce una dispersión múltiple que limita la cantidad de luz que recibe el detector. A elevadas concentraciones de sólidos suspendidos, se deben emplear métodos alternativos de medición, tales como los de absorción.

### *D.1.3 Técnicas turbidimétricas de medición*

Una de las técnicas que se utilizan para medir la turbidez es la de turbidimetría. La relación directa entre los datos de turbidez y la concentración de sólidos suspendidos depende de muchos factores, entre los cuales se incluye el tamaño de las partículas, la forma, la distribución y el estado de la superficie, índice de refracción de las partículas de dispersión y de la longitud de onda de la luz utilizada.

El turbidímetro mide la absorbancia de la muestra en estudio. Es uno de los instrumentos más utilizados y la técnica empleada consiste en el uso de un cultivo de microorganismos en un medio líquido, que actúa como una suspensión coloidal, la cual bloquea y refleja la luz que pasa a través de él. La luz es absorbida de manera directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo.

### **D.2 Método de recuento en placa** (Alonso Nore y Poveda Sánchez, 2008)

Cada tipo de recuento de microorganismos viables es potencialmente útil para fines específicos. Los recuentos de bacterias viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar que han sido previamente inoculadas con cantidades de microorganismos determinados e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan, en algunos casos con evidente error, recuentos totales en placa, cuando en realidad únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en condiciones ambientales elegidas; pues se pueden cambiar las condiciones ambientales, las de incubación, la composición del medio (añadiendo inhibidores selectivos al medio o agentes con actividad de superficie) favoreciendo el crecimiento de uno u otro microorganismo.

Este tipo de recuento se define como un procedimiento en el cual cada célula viable puede formar una colonia en placa con agar específico para el microorganismo, donde un cierto volumen de cultivo diluido que no suele ser superior a 0,1 mL, se extiende sobre la superficie de una placa con medio sólido utilizando un ansa estéril. La placa se incuba en un ambiente predeterminado, hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número.

### **D.3 Actividad inhibitoria sobre hongos mediante confrontación dual** (Reyes Tena *et al.*, 2015)

Para evaluar el efecto antifúngico de los IPPs, es necesario realizar ensayos preliminares *in vitro* en los cuales se confronten, conjuntamente o de manera individual, los diferentes IPPs contra el agente fitopatógico de interés.

Por lo general, se utilizan medios de cultivo que favorezcan el crecimiento del fitopatógico, para no enmascarar el efecto antimicrobiano. El más usado es el agar papa-dextrosa (PDA). Se pueden realizar ensayos preliminares en los que se evalúen diferentes IPPs en una misma placa de cultivo y, una vez determinada la capacidad antimicrobiana, se valore de manera individual cada IPP en una confrontación de tipo dual, en la cual, por lo general, éstos IPPs se coloquen frente al fitopatológico de tal manera que su crecimiento se vea frenado por la actividad antimicrobiana.

### **D.4 Método del antibiograma en placa**

#### *D.4.1 Fundamento*

El antibiograma disco-placa basado en el test de difusión en agar de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este antibiograma en placa es una modificación de este método y consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, un determinado volumen con la respectiva muestra. La muestra actuaría sobre la superficie colocada formándose un halo de inhibición. Transcurridas 18-24 horas de incubación los halos aparecen como una zona de inhibición. La concentración de la muestra en la interfase entre bacterias

en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos en placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema en placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores.

### *D.4.2 Indicaciones y limitaciones*

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone. El método de placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.*

### **D.5 IPPs serínicos y sus diversas actividades biológicas: Actividad Antimicrobiana**

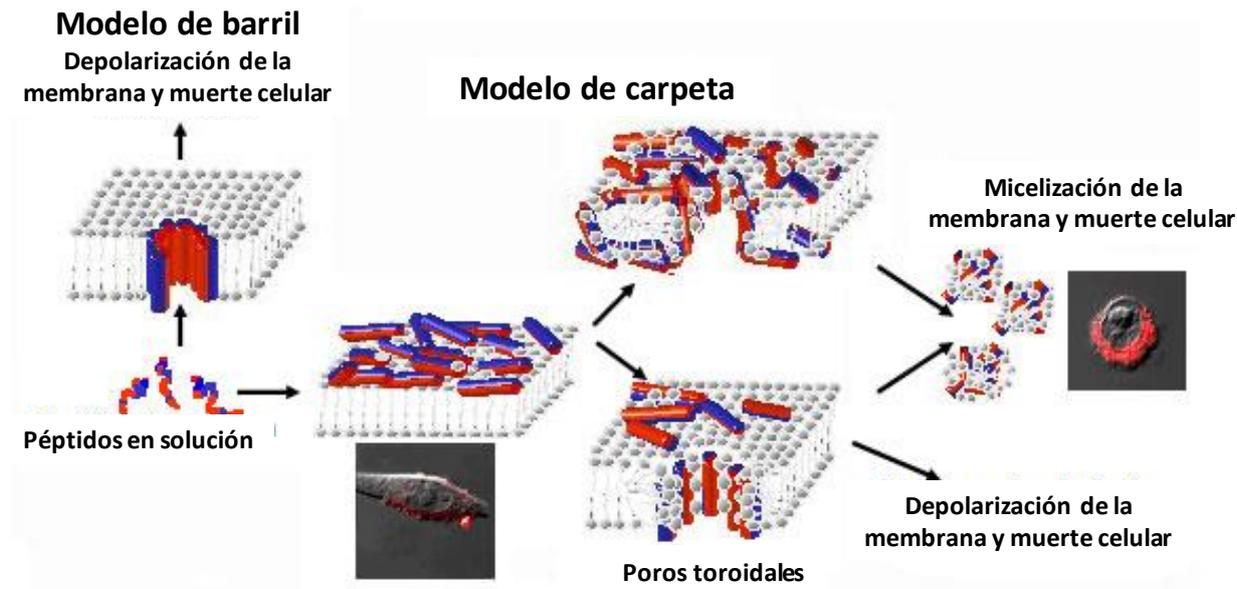
Se ha observado que los IPPs de muchas plantas inhiben potencialmente el crecimiento de una amplia variedad de cepas bacterianas y fúngicas patógenas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el uso como compuestos líderes para el desarrollo de numerosos agentes antimicrobianos de acción interna-externa y protectores en el intestino, la vía infectiva principal. Existe un amplio número de referencias bibliográficas referidas a la acción de estas biomoléculas, implicadas en diversos procesos metabólicos, que genera un apreciable interés para la aplicación de las mismas, a través del desarrollo de compuestos activos beneficiosos, en el campo de la biomedicina y, en los últimos años, en el campo de la industria agroalimentaria.

Existen numerosos informes de los últimos 10 a 15 años relacionados con la actividad antimicrobiana de los inhibidores de proteasas, estudios que se han acrecentado en los últimos 5-7 años. (Shamsi *et al.*, 2016; Paik, 2016; Macedo, 2016; Habib *et al.*, 2016; Kumar, 2016; Silva de Brito *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014; Clemente *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2012; Shilpa Satheesh *et al.*, 2010).

Se reconoce que los IPPs tienen efectos antimicrobianos sobre diversas cepas de patógenos, tal es así que los estudios referidos a estos compuestos hacen referencia a su acción antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria. De allí que los alimentos que contienen IPPs puedan considerarse que son ingredientes potencialmente funcionales, ya que además de su función nutricional también podrían tener un efecto beneficioso sobre el organismo consumidor (humanos, animales de granja y domésticos).

Una vez aislados y caracterizados los IPPs, es necesario evaluar las propiedades antimicrobianas de los mismos y estudiar qué sucede con estas moléculas cuando son digeridas en el alimento (estudios de vehiculización al sistema gástrico, absorciones, estabilidad y acciones orgánicas en el tracto digestivo; así como posible entrada al sistema de circulación general, para dirigirse a los tejidos).

Aunque el mecanismo antibacteriano de los IPPs no ha sido elucidado en detalle, hay trabajos que confirman la actividad antibacteriana *in vitro* de IPPs contra muchas bacterias patógenas. Se ha propuesto que las proteínas o péptidos catiónicos con acción antibacteriana forman un canal en la membrana celular y la célula muere como resultado del flujo de salida de contenido celular (**Figura 9**), siendo este mecanismo diferente al de los antibióticos (Shilpa Satheesh y Murugan, 2010).



**Figura 9:** Modelos de mecanismos de acción de péptidos que afectan la estructura de la membrana plasmática de las células bacterianas ([http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Shai/respeptides.html](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Shai/respeptides.html)).

La mayoría de los IPPs con propiedades antimicrobianas que están caracterizadas pertenecen a la familia de las serpinas o son inhibidores canónicos de una familia cuyo prototipo es una proteína de áscaris, un nematodo intestinal de las familias I4 e I8, respectivamente (Rawlings, 2004). También se han detectado inhibidores de proteasas de la familia I2 (con dominio Kunitz) en algunos parásitos como *Ancylostoma spp.* (Milstone *et al.*, 2000), *Haemonchus spp.* y *Echinococcus granulosus*. Es probable que estos inhibidores cumplan un rol en la supervivencia de estos parásitos en el intestino de sus hospedadores.

Un ejemplo referente a la detección de actividad antimicrobiana es un inhibidor de proteasa aislado de hojas de *Coccinia grandis voigt* (Shilpa Satheesh y Murugan, 2010). Un IPP de 14 kDa fue aislado y purificado de un homogenato de hojas de *C. grandis* por precipitación con sulfato de amonio (20-85% de saturación), Sephadex G-75, columna de DEAE-sepharose y cromatografía de afinidad tripsina-agarosa. La pureza fue evaluada por cromatografía líquida de fase reversa de alto rendimiento (RP-HPLC). El IPP exhibió un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento en líneas celulares de colon. Fue termoestable y mostró actividad antimicrobiana sin actividad hemolítica. Además, inhibió fuertemente cepas de bacterias patógenas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y hongos patógenos como *Cándida albicans*, *Mucor indicus*,

*Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus* y *Cryptococcus neoformans*. Morfológicamente, los hongos tratados con IPP mostraron una significativa contracción de las puntas de hifas. Al reducir el IPP, éste pierde completamente su actividad lo que indica que los puentes disulfuro son esenciales para su actividad inhibidora de proteasa y actividad antifúngica (Kim *et al.*, 2009).

En cuanto a la actividad antifúngica, la inhibición de crecimiento de hongos no puede ser solo explicado por la inhibición de una proteasa. De hecho, fue informado un rol antifúngico tardío por inhibidores de proteasa serínica, debido a la habilidad de estas proteínas de interferir en el proceso de biosíntesis de quitina durante el desarrollo de la pared celular fúngica por inhibición de la activación proteolítica del zimógeno quitina sintasa (Mignogna *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1993). Varios estudios confirman que la secreción de proteasas por el hongo es un factor determinante para la patogénesis, y su inhibición reduce significativamente la infección fúngica (Soares-Costa *et al.*, 2002).

Otros inhibidores de tipo serínico que manifiestan actividad antifúngica, son los provenientes de habas verdes, habas lima y los de soja amarilla. Sin embargo, los inhibidores de tipo serínico de la gran soja negra japonesa carecen de actividad antifúngica, aunque presentan un potencial inhibitorio sobre la transcriptasa reversa HIV-1 mayor que el reportado por el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (Oliveira *et al.*, 2008; Soares-Costa *et al.*, 2002).

Otro ejemplo reciente trata de una proteína antifúngica designada Psc-AFP, con una masa molecular aparente de 18 kDa, que fue aislada de una hierba china, *Scurfpea malaytea* (*Psoralea corylifolia* L.). El procedimiento de aislamiento implicó extracción, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de filtración en gel en Superdex 75 y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. La secuencia N-terminal parcial de la proteína, EWEPVQNGGSSYYMVPRIWA, muestra homología con inhibidores de tripsina de origen vegetal. La actividad inhibitoria de proteasa de Psc-AFP fue luego confirmada por inhibición sobre tripsina. Posteriormente se encontró que Psc-AFP 10 mM inhibió el crecimiento micelial de *Alternari brassicae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia cerealis*, sugiriendo que Psc-AFP desempeña un rol en la defensa contra este tipo de patógenos (Yang *et al.*, 2006).

La regulación de una enfermedad fúngica se puede llevar a cabo mediante el mantenimiento de la higiene personal y también por el método farmacológico que se puede hacer mediante la administración de antifúngicos adecuados basados en la causa de la infección mediante determinados hongos (Ledoigt *et al.*, 2006). Los IPPs

pueden afectar el hongo por inhibición de proteasas extracelulares y/o intracelulares que juegan roles importantes en los procesos metabólicos e infecciosos. Se ha logrado purificar una proteína antifúngica llamada AFP-J de tubérculos de *S. tuberosum* cv. L Jopung (Park *et al.*, 2005) utilizando diferentes columnas cromatográficas. El AFP-J purificado inhibe fuertemente a las cepas fúngicas como *Candida albicans*, *Trichosporon beigellii*, y *Saccharomyces cerevisiae*. El inhibidor de tripsina-quimotripsina de *S. tuberosum* inhibe fuertemente a los hongos patógenos *C. albicans* y *Rhizoctonia solani* e interesantemente, no lisa los eritrocitos humanos, lo que sugiere la seguridad del IPP como agente antimicrobiano.

Se ha reportado efecto antimicrobiano de proteasas aspárticas de *S. tuberosum* (Mendieta *et al.*, 2006) contra *Fusarium solani* y *Phytophthora infestans*, directamente a través de la interacción con las superficies celulares de los microbios seguido por la permeabilización de la membrana. Además, los inhibidores mostraron tener actividad antifúngica contra *F. solani* focalizándose en las proteasas secretadas por los hongos. Un péptido antimicrobiano pequeño (5578,9 Da) llamado Potide-G, fue aislado de tubérculos de *S. tuberosum* cv. Golden Valley, encontrándose que suprimió la actividad proteolítica de tripsina, quimotripsina y papaína efectivamente.

La observación de un aumento en la resistencia a antibióticos, en particular a la de *Leishmania donovani* obliga a desarrollar nuevas terapias contra la leishmaniasis con una toxicidad mínima. Bajo este aspecto, los fitopatógenos bioactivos deben llevar al descubrimiento de nuevas medicinas con una eficiencia apropiada. Los roles importantes de las proteasas de *Leishmania* en la virulencia de los parásitos de *Leishmania* hacen que sean blancos esperados para el mejoramiento de los remedios actuales contra la leishmaniasis. Como parte de la búsqueda de nuevas drogas, se ha evaluado la actividad anti-leishmanial *in vivo* de un inhibidor de serín proteasas (PTE<sub>x</sub>), aislado por medio de extracción con biosulfito de sodio de tubérculos de papa. El efecto anti-leishmanial fue también establecido por la actividad inmunomoduladora inducida por PTE<sub>x</sub>. Además, se pudo observar en hamsters tratados con PTE<sub>x</sub>, un rango de supervivencia significativa (80%). Se pudo entonces, observar una acentuada potencialidad del PTE<sub>x</sub> para ser empleado como nuevo terapéutico de fuente natural contra *L. donovani*. Esto podría proveer una nueva percepción respecto a inhibidores de proteasas serínicos naturales provenientes de tubérculos de papas como un acercamiento alternativo para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Paik *et al.*, 2016).

## INTRODUCCIÓN. PARTE D

Por tanto, estas fuentes naturales prometen grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas contra un gran número de microorganismos, así como también frente a diversos procesos fisiopatológicos. Se pretende hacer especial hincapié en aquellos compuestos que presenten actividad antibacteriana y antifúngica.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el presente plan de trabajo se propuso investigar y aprovechar la diversidad ofrecida por la biomasa vegetal nativa para la obtención de compuestos bioactivos de alto valor biotecnológico, ya sea mediante su obtención directa, o como moléculas recombinantes. Dentro de estos compuestos bioactivos se encuentran sustancias moduladoras de la actividad proteolítica tales como los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs).

El objetivo general de este plan fue la purificación, clonación, expresión y evaluación de la potencial actividad antimicrobiana de nuevos IPPs presentes en extractos de papas andinas con el fin de evaluar, a futuro, su empleo como potencial conservante natural en la industria de los alimentos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- A. Obtener extractos crudos (ECs) a partir de los diferentes tubérculos de papas andinas.
- B. Determinar la actividad inhibitoria en los ECs frente a diferentes tipos de proteasas con el fin de analizar su efecto inhibitorio frente a diferentes enzimas proteolíticas de diferentes tipos mecanísticos.
- C. Caracterizar bioquímicamente los ECs mediante ensayos de estabilidad a diferentes valores de pHs, temperaturas y fuerzas iónicas.
- D. Caracterizar los ECs y TTs por técnicas electroforéticas y proteómicas.
- E. Inmovilizar la proteasa serínica Tripsina, en forma covalente en geles de glioxil-agarosa, para su uso como matriz de afinidad.
- F. Purificar los IPPs por técnicas de cromatografía de afinidad, intercambio iónico y HPLC. Caracterizar bioquímicamente los IPPs purificados.
- G. Comparar y obtener información estructural de los IPPs en ECs, TTs e IPPs purificados, utilizando herramientas de proteómica (PMF-MALDI-TOF/MS, MALDI-TOF/MS, MALDI-TOF/TOF-MS/MS), electroforesis e isoelectroenfoco.
- H. Establecer cultivos “*in vitro*” para la conservación de papas andinas.
- I. Diseñar estrategias de clonación de nuevos IPPs a partir de la extracción de ARNm y posterior RT-PCR utilizando como material de partida vitroplantas de papas andinas.

- J. Expresar en forma recombinante IPPs en organismos procariotas.
- K. Evaluar de manera cuantitativa la expresión diferencial de genes de IPPs bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.
- L. Realizar estudios preliminares para evaluar la posible actividad antimicrobiana de los IPPs aislados en sus formas nativas, y obtenidos de manera recombinante.

Los resultados obtenidos posibilitarán la mejora de la transferencia de tecnologías tanto a nivel básico, como a nivel aplicado, así como en el uso y aplicación de tecnologías de vanguardia para el análisis de la rica biodiversidad de los extractos vegetales y de sus potenciales actividades nutraceuticas.

A partir del desarrollo de este trabajo proponemos emplear estas moléculas, obtenidas en forma directa o como moléculas recombinantes, como potenciales aditivos naturales capaces de mantener y controlar el equilibrio microbiano en alimentos de almacenaje, ya sea por complementación o agregado de los mismos en dichas formulaciones.

Con esta propuesta se pretende profundizar en las investigaciones iniciadas y ampliar el espectro de aplicaciones de los IPPs ya estudiados, así como buscar nuevos IPPs que tengan propiedades antimicrobianas y que se consumen en la dieta al formar parte de la alimentación básica.

Finalmente, este trabajo plantea fomentar la investigación, desarrollo e innovación de compuestos naturales obtenidos de la flora nativa latinoamericana con el fin de potenciar, recuperar y valorizar sus propiedades funcionales, así como aportar al conocimiento de estas biomoléculas. Bajo este contexto y en este caso particular estudiaremos alimentos de origen vegetal ricos en IPPs, provenientes de diferentes variedades de papas andinas (*Solanum tuberosum* subespecie *andigenum*).

## MATERIAL VEGETAL

*Solanum tuberosum* es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia (ya que pierde sus hojas y tallos aéreos en la estación fría), de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura (Milan, 1987).

Las hojas son compuestas, con 7 a 9 folíolos, de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos. Presentan tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos (Faiguenbaum, 1988.).

El tubérculo es el tipo de tallo de la papa que es subterráneo y se halla engrosado como una adaptación para funcionar como órgano de almacenamiento de nutrientes.

Los rizomas presentan una zona meristemática sub-apical, de donde se originan los tubérculos mediante un engrosamiento radial, producto del alargamiento de las células parenquimatosas y la pérdida de la polaridad de las mismas. Durante la formación del tubérculo, el crecimiento longitudinal del estolón se detiene y las células parenquimatosas de la corteza, de la médula y de regiones perimedulares sufren divisiones y alargamiento. En tubérculos maduros, existen pocos elementos conductores y no hay un cambium vascular continuo. Los tubérculos están cubiertos por una exodermis que aparece al romperse la epidermis que va engrosándose con el tiempo. Sobre su superficie existen "ojos", hundimientos para resguardar las yemas vegetativas que originan los tallos, que están dispuestos de forma helicoidal. Además, hay orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas. Las lenticelas son circulares y el número de las mismas varía por unidad de superficie, tamaño del tubérculo y condiciones ambientales (Xin *et al.*, 1998). Los tubérculos, en definitiva, están constituidos externamente por la peridermis, las lenticelas, los nudos, las yemas y, eventualmente, por un fragmento o una cicatriz proveniente de la unión con el rizoma del cual se originaron; internamente se distingue la corteza, el parénquima vascular de reserva, el anillo vascular y el tejido medular. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga; su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo (Faiguenbaum, 1988.)

En este trabajo, se emplearon como fuente de material vegetal los tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* provenientes de la provincia de Jujuy, sobre la quebrada de Humahuaca, Cordillera de los Andes, Argentina. El nombre vulgar

de estas especies es de “papas andinas”, y es muy común su cultivo en dichas zonas geográficas.

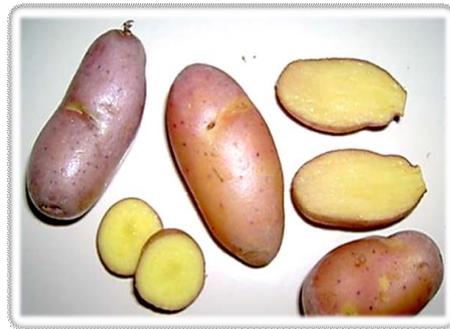
Teniendo en cuenta que el cultivo de estas variedades es llevado a cabo por cooperativas de trabajo del noroeste argentino entre ellas la *Cooperativa Agropecuaria y Artesanal Unión Quebrada y Valles Ltda. (CAUQUEVA)*, fundada en Maimará en el corazón de la Quebrada de Humahuaca, proveedora de nuestro material vegetal, y que no siempre se dispuso de semilla de todas las variedades pues no hay en la zona un banco de germoplasma que permita conservarlas, nos hemos encontrado a lo largo de los años, con la dificultad de disponer de la variedad originalmente estudiada.

Por este motivo en los ensayos de caracterización, purificación y en los ensayos microbiológicos se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* de las variedades Imilla Negra, Sacampaya Roja, Malcacha y Churqueña.

Imilla Negra



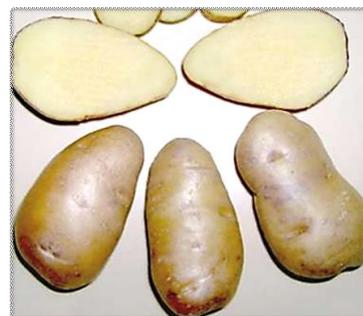
Sacampaya Roja



Churqueña



Malcacha



Posteriormente y por las razones previamente expresadas, se utilizaron plantas de las variedades Overa y Chacarera en los ensayos de biología molecular.

Overa



Chacarera



Como se observan en las diferentes fotografías, existe una gran variabilidad en el fenotipo de las distintas variedades (diferencias de color, formas y de tamaño, entre otras diferencias) a pesar de que están clasificadas como el mismo género, especie e incluso como la misma subespecie, *andigenum*. Solo se diferencian en la variedad.

Inicialmente los ensayos se realizaron con unas pocas variedades con el fin de encontrar diferentes inhibidores a los ya estudiados en la especie *Solanum tuberosum tuberosum* (papa común).

Nos planteamos la siguiente premisa: si existen diferencias perceptibles a nivel visual entre las variedades, por qué no encontrar diferencias fenotípicas a nivel molecular. En este caso, encontrar inhibidores con diferente secuencia a los ya estudiados.

Partiendo de esta base, se comenzaron a estudiar en forma nativa los inhibidores de las siguientes variedades: Imilla Negra, Churqueña, Sacampaya Roja y Malcacha. Luego de ello y cuando se obtuvieron los primeros resultados alentadores (Obregón *et al.*, 2010; Cisneros *et al.*, 2010), se decidió hacer una caracterización más profunda con los inhibidores de la variedad Imilla Negra.

Luego de dos años de investigaciones utilizando como muestra la variedad Imilla Negra, se iniciaron los ensayos a nivel molecular. El siguiente paso consistió en clonar y expresar dichos inhibidores. Pero surgió como gran obstáculo la imposibilidad de hacer crecer brotes, a partir de tubérculos congelados, para la extracción del ARN. Además, la extracción de ARN de los tubérculos congelados no fue posible debido a la degradación de ARNs. Se intentó nuevamente conseguir papas andinas de las variedades estudiadas mediante la relación entablada con CAUQUEVA pero no se obtuvieron las variedades solicitadas pues, tratándose de una cooperativa, los campesinos que se dedican al cultivo de papas andinas en esta región no discriminan a

la hora de cultivar, en seleccionar y realizar siembras de las mismas variedades. De hecho, las variedades pueden tener distintos nombres según la zona de cosecha. En el campo, las variedades están sometidas a cambios continuos, a hibridaciones con otras papas y además a mezclas con otras variedades. No hay monocultivos ni lugares que se dediquen a la conservación de las especies y tampoco hay clasificación taxonómica para las variedades de papas andinas. Frente a estas dificultades, que ponían en riesgo la continuidad del trabajo por no poder disponer del material vegetal inicial, y teniendo en cuenta que los resultados ya obtenidos eran alentadores, decidimos continuar las actividades de la parte de Biología Molecular con las variedades Overa y Chacarera (**Figura 10**) que eran morfológicamente similares a las variedades ya estudiadas, sobre todo la variedad Overa, que presenta características visibles parecidas a Imilla Negra.

Esta segunda parte de la tesis se realizó con cultivos en macetas de cada variedad, de manera de conservar cada uno de los plantines de papas andinas, y se incorporó además el cultivo *in vitro* de cada una de ellas. Como es sabido, el cultivo *in vitro* es un método de conservación y propagación de especies que permite mantener una línea única de cada una de éstas últimas variedades estudiadas.



**Figura 10:** Cultivos *in vitro* de las variedades, Chacarera y Overa, obtenidos a partir de plantines desarrollados en cámara de cultivo. Las variedades Overa y Chacarera fueron utilizadas para la clonación y expresión recombinante de IPPs. Además, cada explanto de la variedad Overa fue utilizado en su totalidad para los ensayos de análisis de expresión diferencial de genes de IPPs.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PARTE A

#### AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

De acuerdo a lo establecido y narrado en la descripción del material vegetal, en esta parte se trabajó con las variedades de papa andina: Imilla Negra, Malcacha y Sacampaya Roja, disponibles en los comienzos de este trabajo de tesis doctoral.

El principal objetivo consistió en elegir el mejor material, en cuanto a la cantidad de inhibidores, proteasa mayormente inhibida y con mayor actividad inhibitoria específica sobre la misma, para luego seguir con la caracterización y purificación del IPP del material vegetal seleccionado.

Como se leerá más adelante, el material de elección para la caracterización y purificación de un nuevo inhibidor de proteasas de papas andinas, fue la variedad de Imilla Negra y el tipo de inhibidor seleccionado es un inhibidor de serín proteasas. La proteasa modelo de inhibición fue la tripsina.

##### **A.1 Elección del medio de extracción**

Los extractos crudos (ECs) de las variedades Imilla Negra, Malcacha y Sacampaya Roja se obtuvieron por extracción con agua destilada en frío y con el agregado de DTT para evitar la oxidación. Se recogió el sobrenadante que fue filtrado con filtro de Orange Sci PES de 0,2  $\mu\text{m}$ . Estas preparaciones clarificadas y libres de pigmentos se denominaron extracto crudo (EC).

El proceso de obtención del EC utilizado permitió contar con una suspensión de proteínas homogénea y translúcida necesaria para los posteriores ensayos de caracterización bioquímica.

Las concentraciones de proteínas fueron estimadas por el método de Bradford (**Tabla 2**). Los ECs con mayor concentración de proteínas, respecto de las concentraciones de inhibidores encontradas en cada EC, fueron en orden creciente, los de Malcacha, Sacampaya Roja e Imilla Negra.

**Tabla 2:** Cantidad de proteína en cada extracto crudo.

Extracto crudo	µg/mL x g de mat. veg.
Malcacha	4
Sacampaya Roja	9
Imilla Negra	20

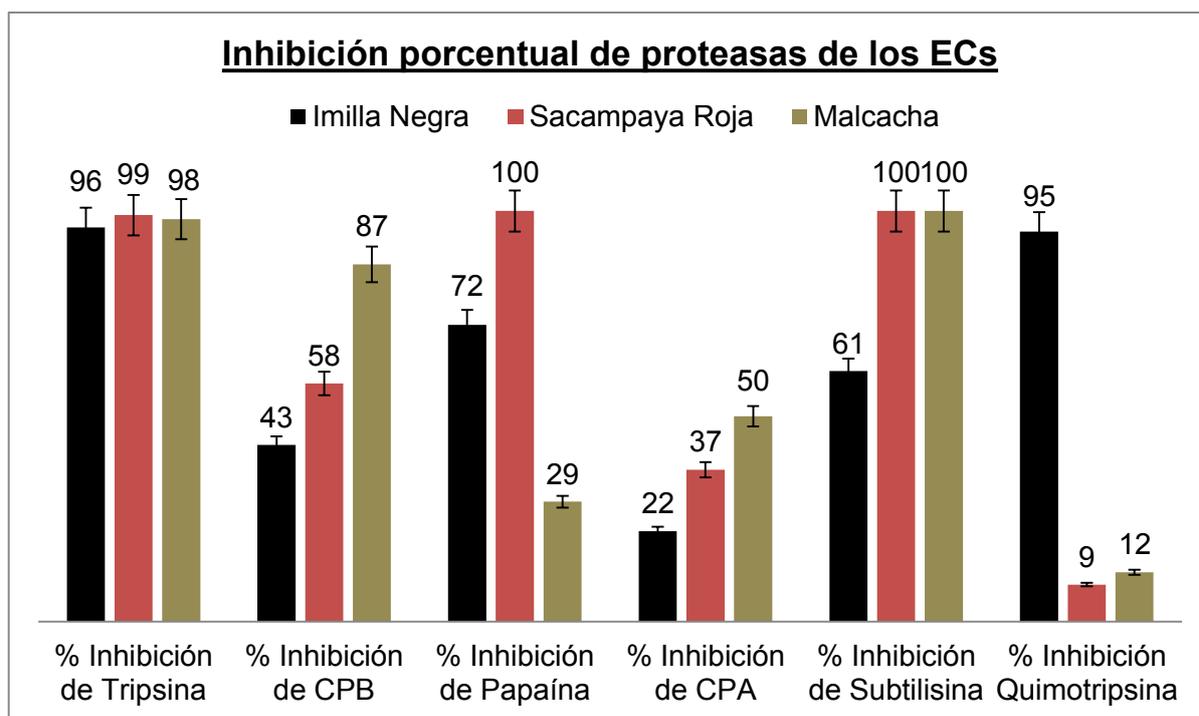
### **A.2 Aislamiento y caracterización bioquímica de los inhibidores de proteasa de papas andinas**

El paso siguiente consistió en evaluar la presencia de inhibidores de proteasas en los ECs de las variedades Malcacha, Sacampaya Roja e Imilla Negra. Para ello se realizó una búsqueda de compuestos de interés (IPPs) en cada muestra para poder observar la cinética de inhibición enzimática.

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas, en éste caso de cada proteasa utilizada. El estudio de la cinética y de la dinámica química de una enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad (es nuestro caso).

Se detectaron actividades inhibitorias de las siguientes proteasas: tripsina, quimotripsina y subtilisina (serín proteasas), carboxipetidasa A y B (metaloproteasas) y papaína (cisteín proteasa).

En la **Figura 11** se muestran los porcentajes de inhibición que presentó cada muestra cuando fue incubada y ensayada con cada una de las proteasas citadas.



**Figura 11:** Inhibición de: Tripsina, Carboxipeptidasa B, Papaína, Carboxipeptidasa A, Subtilisina y Quimotripsina en presencia de ECs de Imilla Negra (negro), Sacampaya Roja (rojo) y Malcacha (marrón). Se observa en cada columna los porcentajes de inhibición respectivos de cada una de las muestras frente a las diferentes proteasas ensayadas.

Se observa en la mayoría de los casos una buena inhibición proteolítica de cada una de las proteasas evaluadas en presencia de los 3 extractos de papas andinas, pero se encontró inhibición de quimotripsina entre un 9 y un 12 % cuando se evaluó frente a los ECs de Malcacha y Sacampaya Roja, resultado extraño y no esperado de acuerdo a los estudios previos realizados sobre miembros de esta familia (Pouvreau *et al.*, 2003; Walsh y Twitchell, 1991).

### **A.3 Tratamiento térmico**

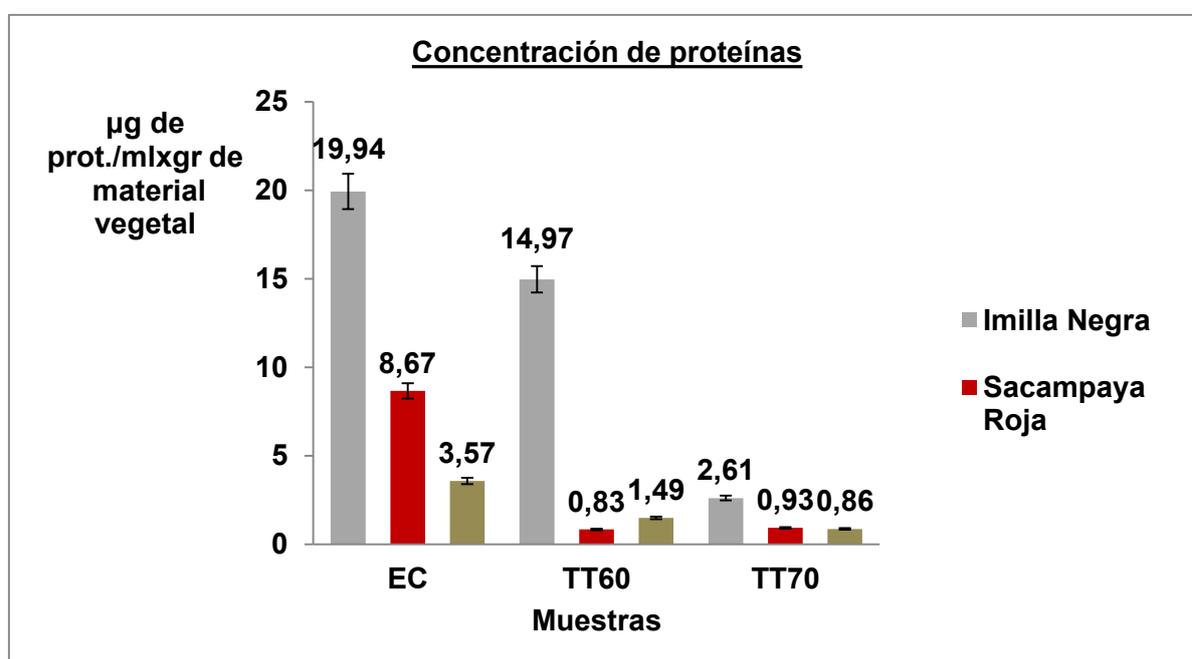
Es bien sabido que los inhibidores de proteasas con una masa molecular inferior a 30 kDa son estructuralmente resistentes a altas temperaturas y se mantienen en solución (Miyaji *et al.*, 2007). La mayoría de los IPPs presentan una estructura compacta y esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas.

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica de los inhibidores presentes en los ECs de Imilla Negra, Sacampaya Roja y Malcacha, se procedió a un tratamiento térmico que además sirvió como etapa de purificación preliminar ya que nos permitió obtener un EC

clarificado con elevada conservación de la actividad inhibitoria y libre de proteínas y otros componentes contaminantes.

Para ello, se trataron térmicamente los extractos a distintas temperaturas y se evaluó la actividad inhibitoria residual de cada proceso. El ensayo consistió en incubar los ECs a 60°C (TT60) y 70°C (TT70) durante 60 minutos. Luego se centrifugaron durante 60 minutos a 11000 g, descartando el pellet y reservando o conservando el sobrenadante.

En la **Figura 12** se muestra el contenido de proteínas del EC original, del TT60 y del TT70 de las muestras de papas andinas de las variedades Imilla Negra, Malcacha y Sacampaya Roja.



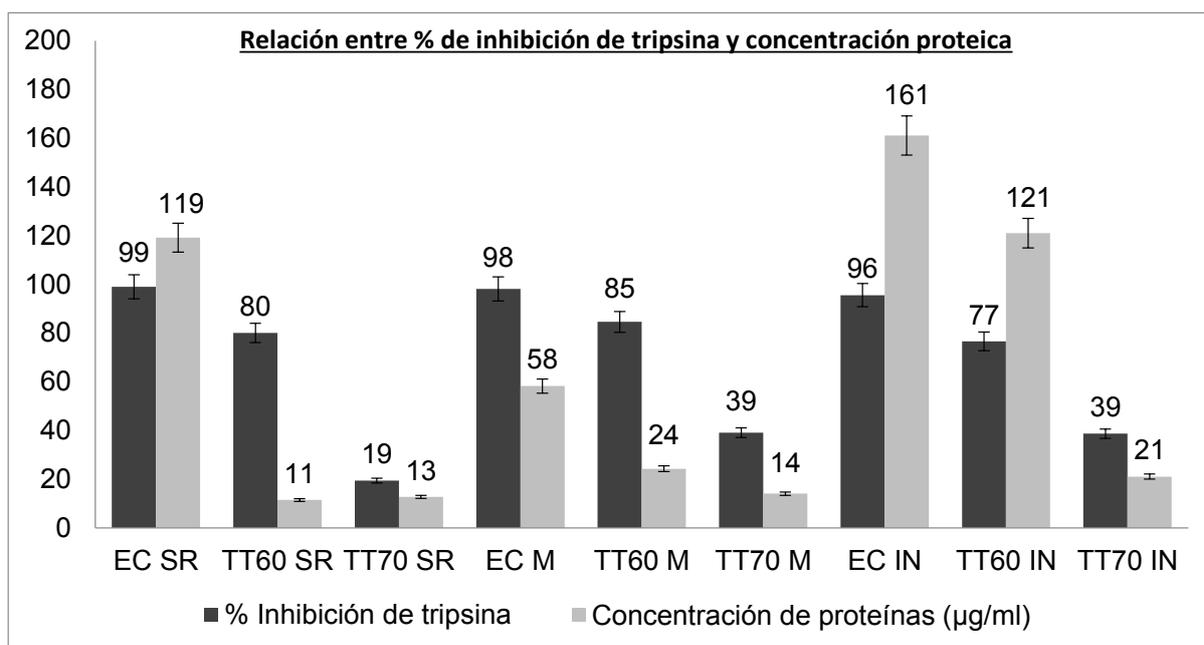
**Figura 12:** Determinación de la concentración de proteínas del extracto crudo (EC) y de los tratamientos térmicos a 60 y 70°C (TT60 y TT70), usando el micrométodo de Bradford.

Con estos tratamientos térmicos, el EC se clarificó satisfactoriamente, especialmente el TT70. Posteriormente se evaluó la actividad inhibitoria residual en las muestras sometidas a los distintos tratamientos para verificar la actividad específica y el rendimiento de cada uno de ellos.

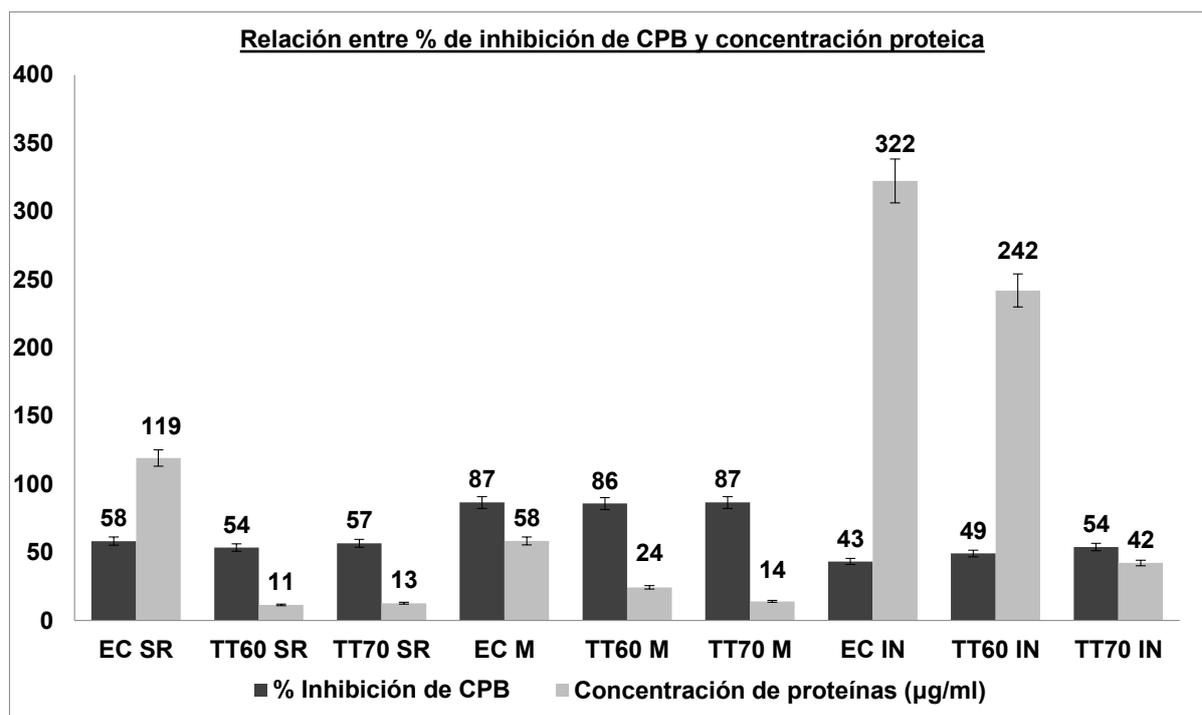
**A.4 Actividad inhibitoria de Tripsina y Carboxipeptidasa B frente a extractos crudos de Imilla Negra, Sacampaya Roja y Malcacha**

Se eligieron como proteasas blanco a tripsina y carboxipeptidasa B para evaluar la actividad inhibitoria residual luego de cada tratamiento térmico, debido a su disponibilidad en el laboratorio y a los buenos resultados obtenidos en los extractos crudos iniciales.

En las **Figuras 13** y **14** se muestran las relaciones porcentuales entre la cantidad de proteína presente luego de cada tratamiento y su respectiva actividad inhibitoria de proteasa residual. Se observa que en estos procesos térmicos se pudo recuperar un gran porcentaje de moléculas inhibitorias eliminando una fracción importante de las proteínas contaminantes presentes en la preparación inicial, demostrando de esta manera que el inhibidor es resistente a la inactivación térmica a los 60°C y 70°C.



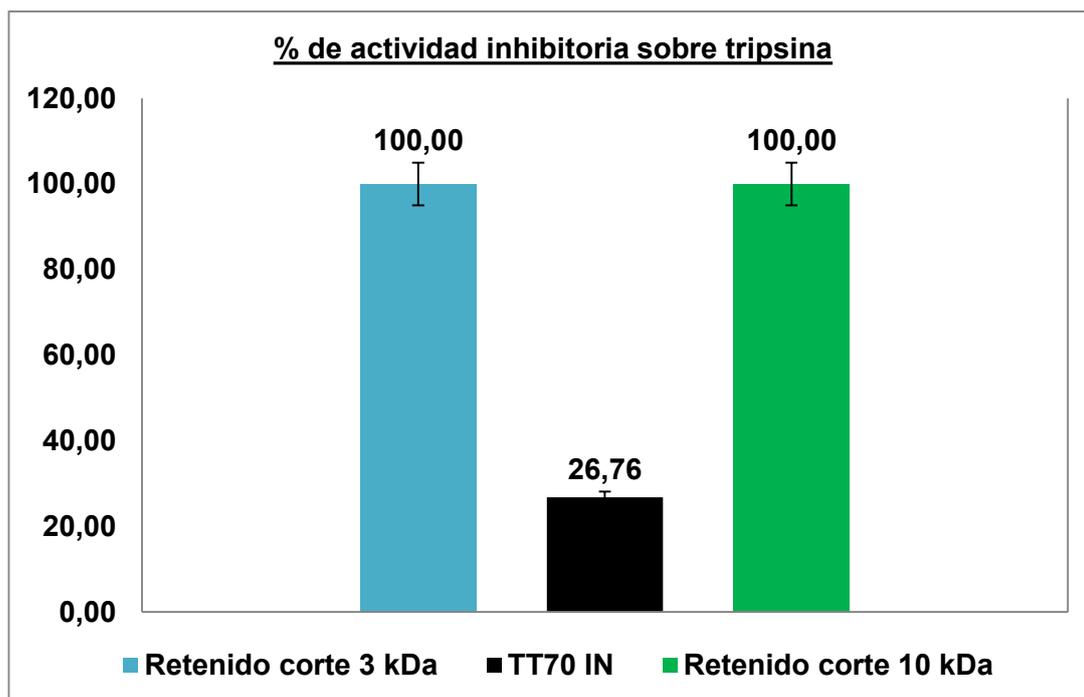
**Figura 13:** Relación porcentual entre la cantidad de proteína presente luego de cada tratamiento para: Sacampaya Roja (SR), Malcacha (M) e Imilla Negra (IN); y sus respectivas actividades inhibitorias de tripsina residuales.



**Figura 14:** Relación porcentual entre la cantidad de proteína presente luego de cada tratamiento para: Sacampaya Roja (SR), Malcacha (M) e Imilla Negra (IN), y sus respectivas actividades inhibitorias de carboxipeptidasa B residuales.

#### **A.5 Concentración y desalado mediante el uso de membranas de corte de 3 y 10 kDa**

Con el objeto de encontrar un método para concentrar y desalar, se centrifugaron las muestras provenientes de TT60 de Malcacha, TT60 de Sacampaya Roja y TT70 de Imilla Negra en tubos Amicon con membranas de corte de 3 y 10 kDa. En las fracciones obtenidas (retenidas y no retenidas) en cada ensayo, se evaluó la actividad inhibitoria sobre tripsina. No se encontró actividad inhibitoria de tripsina en las fracciones no retenidas por las membranas 3 kDa y 10 kDa, por ese motivo no se incluyeron en el gráfico. Luego se evaluó la actividad inhibitoria de las fracciones retenidas por las membranas de 3 kDa (péptidos mayores a 3 kDa) y 10 kDa (péptidos mayores a 10 kDa). En la **Figura 15** puede observarse que la concentración de inhibidores de proteasas fue mejor en las fracciones retenidas por las membranas que en la muestra de Imilla Negra con tratamiento térmico a 70 °C.



**Figura 15:** Actividad inhibitoria (%) de tripsina de las distintas muestras separadas por centrifugación en tubos Amicon. La barra turquesa muestra la actividad inhibitoria de tripsina de la fracción retenida con membrana de corte de 3 kDa proveniente de la muestra TT70 de Imilla Negra. La barra negra muestra la actividad inhibitoria de tripsina de la muestra TT70 de Imilla Negra sin centrifugar. La barra verde muestra la actividad inhibitoria sobre tripsina de la fracción retenida con membrana de corte de 10 kDa proveniente de la muestra TT70 de Imilla Negra.

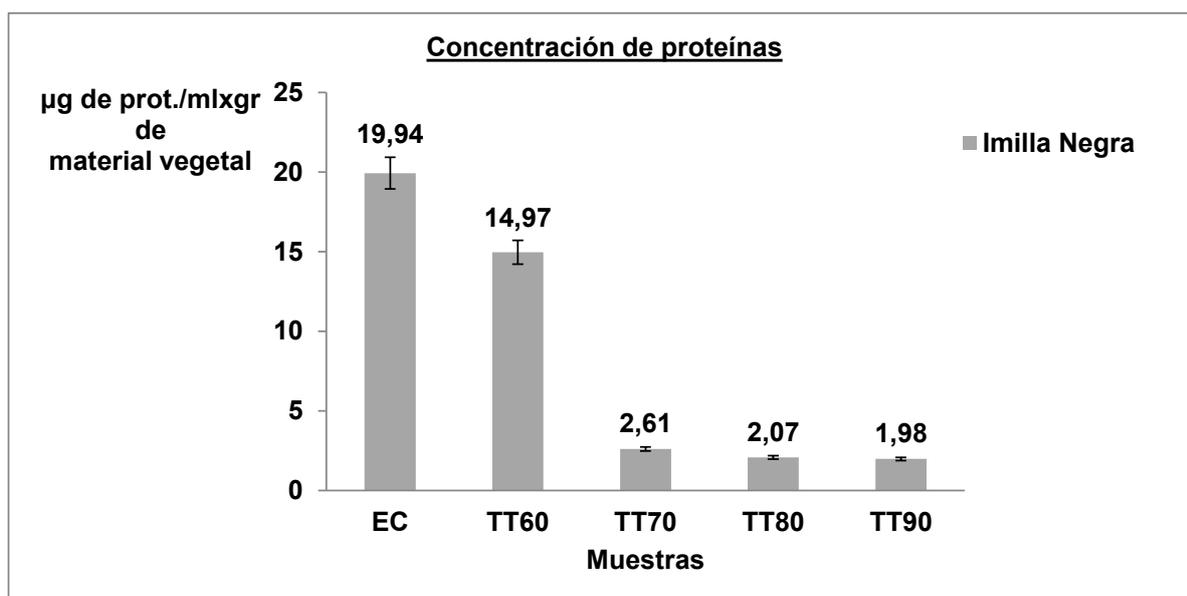
#### **A.6 Caracterización Bioquímica de los inhibidores de tripsina presentes en Imilla Negra**

En base al “screening” realizado, en el cual se evaluaron 3 muestras distintas de papas andinas y se determinó para cada uno de los casos: el contenido de proteínas, la actividad inhibitoria y la actividad específica del EC y los distintos tratamientos térmicos; se decidió continuar con el estudio de una muestra, y evaluar y caracterizar un solo tipo de inhibidor. Se eligió en este caso continuar con los inhibidores de tripsina presentes en la variedad Imilla Negra debido a su gran contenido proteico, su buena actividad inhibitoria, su excelente estabilidad térmica y la disponibilidad, tanto de tripsina como de muestra, en nuestro laboratorio.

**A.7 Tratamientos Térmicos del EC de la variedad Imilla Negra**

Con el fin de evaluar la conservación de la actividad inhibitoria de tripsina del EC de Imilla Negra a temperaturas más elevadas se decidió realizar tratamientos térmicos a 80 y 90°C.

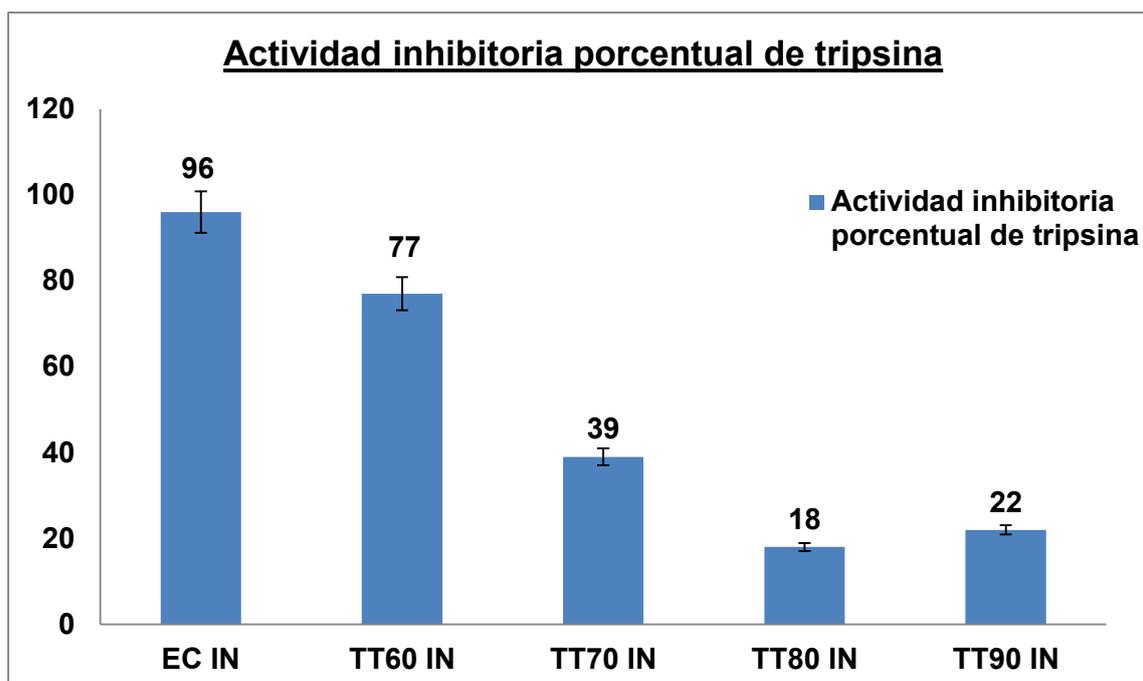
En la **Figura 16** se muestra en una gráfica de barras, la concentración de proteínas del EC y de los tratamientos térmicos (TT60, TT70, TT80 y TT90).



**Figura 16:** Determinación de la concentración de proteínas del EC y de los TT60, TT70, TT80 y TT90, usando el micrométodo de Bradford para Imilla Negra.

Se puede observar una notable disminución del contenido de proteínas a medida que la temperatura aumenta en los tratamientos térmicos.

Por otro lado, se hizo la evaluación de la actividad inhibitoria residual de tripsina de cada tratamiento térmico. En la **Figura 17** se observan los resultados obtenidos.



**Figura 17:** Determinación de la actividad inhibitoria de tripsina para Imilla Negra del EC y de los tratamientos térmicos (TT60, TT70, TT80 y TT90). Los resultados se expresan como actividad inhibitoria % de tripsina de cada tratamiento en relación a la actividad de tripsina control sin muestra.

De los resultados observados en las **Figuras 16 y 17** se puede observar que:

- ✓ La actividad inhibitoria recuperada con el TT60 fue de un 80% con respecto al EC original. Por lo que este tratamiento arroja una pérdida de 25% de proteínas y sólo un 20% de actividad inhibitoria con respecto al EC original.
- ✓ El TT70 recupera un 40% de la actividad inhibitoria original, y la pérdida de proteínas es de un 84% con respecto a la cantidad original.
- ✓ El TT80 y el TT90, brindan una recuperación de aproximadamente un 20% de la actividad inhibitoria original y una pérdida del 80% de proteínas solubles.
- ✓ Se observa que en dichos procesos térmicos se pudo recuperar un gran porcentaje de moléculas inhibitorias eliminando una fracción importante de las proteínas contaminantes presentes en la preparación inicial, demostrando de esta manera que el inhibidor es resistente a la inactivación térmica a los 60 y 70°C.

#### **A.8 Ensayos de estabilidad a distintos pHs y diferentes fuerzas iónicas**

En estudios publicados por Singhal (Singhal, 2004), se informó el aislamiento de un inhibidor de tripsina a partir de semillas de frijol que presentaba actividad inhibitoria en

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE A

un amplio rango de pH (pH 4,0 a 10,0). Se sabe que la estabilidad de los inhibidores de tripsina con alta estabilidad frente al pH puede estar fundamentada en la eficiencia para el control de insectos patógenos (Kansal *et al.*, 2008).

Los inhibidores de proteasas en las plantas generalmente contienen altos porcentajes de residuos de cisteína formando puentes disulfuro. Estos los hacen resistentes a la desnaturalización por tratamiento térmico, por fuerza iónica y por pHs extremos. Por esta razón, se evaluó el efecto del pH y la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria de los extractos de tubérculos de papas andinas. El EC de Imilla Negra fue sometido a incubación a diferentes pHs en Good buffers y a diferentes concentraciones de soluciones de cloruro de sodio y se evaluó en ellas la actividad inhibitoria residual sobre tripsina.

El estudio del efecto del pH reveló que la actividad inhibitoria se mantuvo elevada en un amplio rango de pH (2,0 – 11,2) durante 60 min. Además, la adición de diferentes concentraciones de soluciones de cloruro de sodio (0,05 a 2,00 M) no afectó la estabilidad del inhibidor de tripsina. Como se puede observar en la **Tabla 3**, la actividad inhibitoria de los ECs sobre tripsina no fue afectada por el pH (**Tabla 3 a**) ni por la fuerza iónica (**Tabla 3 b**). Más del 95% de la actividad inhibitoria de los extractos crudos de papas andinas se encontró en un amplio rango de pH, entre 2,10 y 11,20.

**Tabla 3:** Actividad inhibitoria (%) de los ECs de Imilla Negra sobre tripsina. A) Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria. B) Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria.

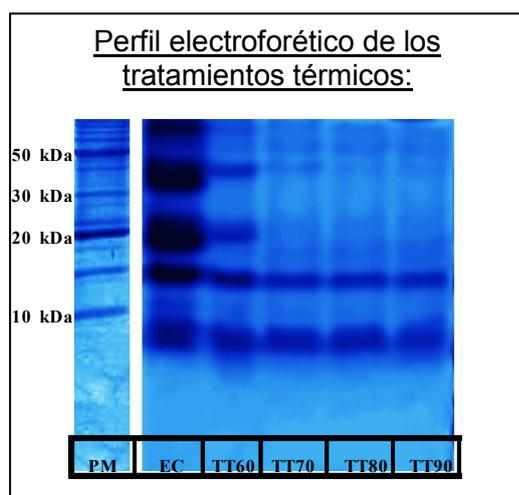
<b>a</b>		<b>b</b>	
Rango de pH	Actividad inhibitoria (%) del EC de <i>S. tuberosum</i> cv Imilla Negra	NaCl	Actividad inhibitoria (%) del EC de <i>S. tuberosum</i> cv Imilla Negra
Control sin EC	0,0	Control sin EC	0,0
Control buffer de Good	97,0 ± 0,6	NaCl control	95,9 ± 0,3
pH 2,10	99,0 ± 0,3	0,05 M	96,8 ± 0,5
pH 4,30	97,0 ± 0,7	0,15 M	96,4 ± 0,6
pH 6,95	98,5 ± 0,5	0,25 M	96,4 ± 0,9
pH 8,10	97,5 ± 0,8	0,50 M	96,4 ± 0,7
pH 9,25	98,5 ± 0,2	1,00 M	97,3 ± 0,2
pH 11,20	99,0 ± 0,8	2,00 M	95,9 ± 0,9

Singhal (2004) informó el aislamiento de un inhibidor de la tripsina de las semillas de frijol mungo con actividad inhibitoria entre pH 4,0 y 10,0. Resultados similares fueron

encontrados para el inhibidor de la tripsina de semillas de *Artocarpus integrifolia* (Annapurna *et al.*, 1991). Por otra parte, Godbole *et al.* (1994) reportaron que el inhibidor de la tripsina de semillas de *Cajanus cajan* conserva su actividad a un pH alcalino (7,0 a 10,0), con una marcada pérdida de actividad en condiciones ácidas. La estabilidad de los inhibidores de tripsina en un amplio rango de pH podría sugerir su eficacia en el control de insectos fitopatógenos de la especie *Helicoverpa amigera* (Kansal *et al.*, 2008).

### A.9 Perfil de pesos moleculares de los TTs de Imilla Negra

Para estimar la masa molecular del o de los posibles inhibidores de tripsina, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) para poder hacer una comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos con los extractos crudos sometidos a diferentes tratamientos térmicos junto con el EC sin tratar (**Figura 18**).



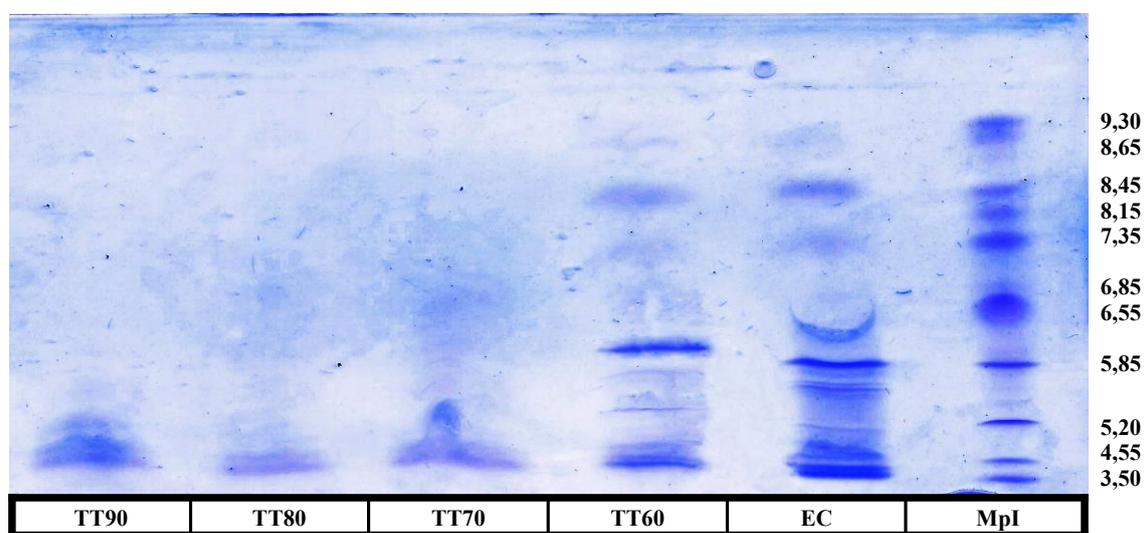
**Figura 18:** SDS-PAGE. Calle 1: Marcadores peptídicos de pesos moleculares. Calle 2: EC. Calle 3: TT60. Calle 4: TT70. Calle 5: TT80. Calle 6: TT90.

Se puede observar en la **Figura 18** que el TT60 (calle 3) mantiene las proteínas de peso molecular menor a 20 kDa en casi toda su totalidad, sin embargo, las proteínas de tamaño molecular mayor se conservan, aunque en menor proporción. Con los TT70, TT80 y TT90 se ve que prácticamente desaparecen todas las proteínas mayores a 20 kDa y solo permanecen las más pequeñas. Este marcado descenso de la cantidad de proteínas en el TT70, TT80 y TT90 es coincidente con los resultados de concentración de proteína y actividad inhibitoria de tripsina presentados en los incisos anteriores.

**A.10 Determinación del punto isoeléctrico (pI) de los TTs de Imilla Negra**

Con el fin de aportar mayor información a los ensayos de caracterización bioquímica de los EC, se evaluó el pI de las muestras correspondientes a los TTs de los extractos de Imilla Negra, que permitió conocer las características de solubilidad de los extractos pues como es sabido, representa el pH en el cuál la carga eléctrica del extracto es nula.

Se realizó la estimación del pI, empleando patrones de amplio rango (3,5 - 9,3) según lo indicado en Metodología.



**Figura 19:** Isoelectroenfoque (IEF) de los distintos extractos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla Negra. Se observa además, la purificación parcial del inhibidor de tripsina. Calle 1: TT90. Calle 2: TT80. Calle 3: TT70. Calle 4: TT60. Calle 5: EC. Calle 6: Broad pI Kit, pH 3–10 (GE Healthcare Life Sciences).

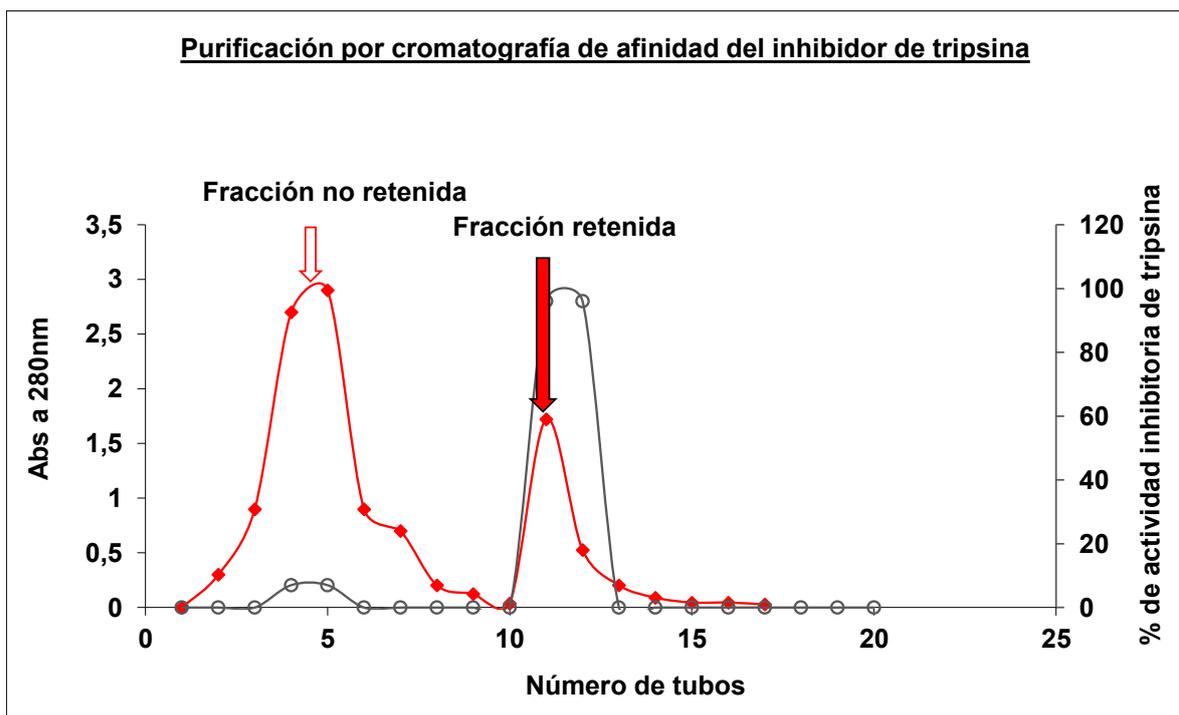
En la **Figura 19** se puede observar una disminución muy importante de las proteínas solubles luego de los tratamientos a 70, 80 y 90°C. Además, se observa que las proteínas constituyentes del extracto tienen en su mayoría pI ácidos con valores, al menos entre 3,5 y 6,5. Este resultado orientativo permitirá a futuro considerar la cromatografía de intercambio iónico para la purificación de los IPPs.

### **A.11 Purificación por cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad es una técnica eficaz para la purificación de proteínas basado en interacciones reversibles entre las proteínas seleccionadas y ligandos específicos unidos a una matriz cromatográfica. Para realizar la cromatografía de afinidad se decidió usar tripsina inmovilizada como soporte ya que la obtención de subtilisina inmovilizada no fue posible debido a su elevado costo.

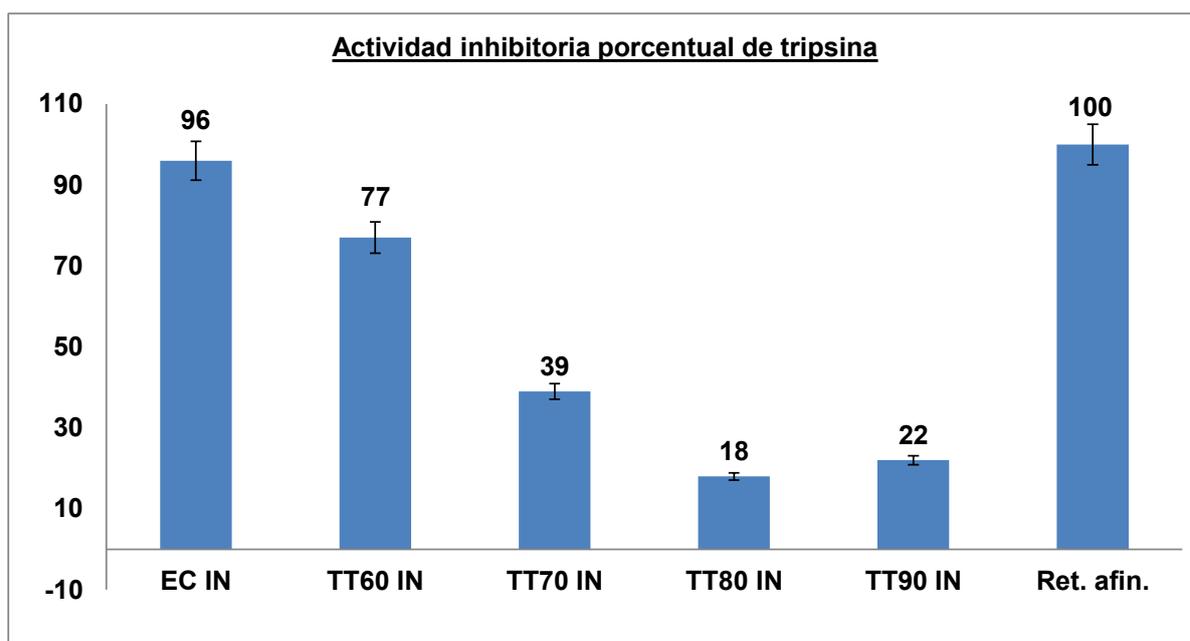
La inmovilización fue una parte crucial de este trabajo y uno de los objetivos planteados, sobre todo en la parte inicial de purificación de los inhibidores de proteasas. Los rendimientos de inmovilización arrojaron una recuperación de más del 90% de mantenimiento de la actividad biológica de la tripsina inmovilizada. La estabilidad enzimática fue apreciable durante su conservación a 4°C, igual que la recuperación total de la actividad luego de cada etapa de almacenamiento (datos no mostrados). Cabe recordar que la inmovilización en glioxil agarosa es una inmovilización covalente entre el soporte y la enzima, por lo que la estabilidad del derivado inmovilizado permite el reuso de la enzima en varios ciclos del proceso. La reutilización de la enzima fue evaluada semanalmente verificando la conservación de su actividad biológica (manteniendo en cada período las mismas condiciones de ensayo), así como también su estabilidad a pHs entre 2,0 y 10,0.

Con el fin de aislar el inhibidor de tripsina, se empleó el TT70 de Imilla Negra, pues la actividad inhibitoria de la muestra era estable térmicamente y se observaban pocas proteínas interferentes. Luego, se realizó la cromatografía de afinidad, obteniéndose una fracción que era retenida por la matriz, la cual mantuvo actividad inhibitoria de tripsina (**Figura 20**). Las fracciones retenidas obtenidas por cromatografía de afinidad con la columna de tripsina-agarosa mostraron una alta actividad inhibitoria (alrededor del 95%) y un contenido proteico de 619 µg/ml. Se recolectaron fracciones de 2 ml, a las cuales se les determinó actividad de tripsina con BAPNA y se expresó como actividad inhibitoria (%) como se mencionó en materiales y métodos.



**Figura 20:** Perfil de elución del inhibidor de la tripsina aislado de papas andinas en la columna de cromatografía de afinidad equilibrada con 100 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,20. Las fracciones no retenidas fueron eliminadas de la columna a pH 7,2 en el mismo buffer, en cambio las fracciones retenidas fueron eluidas con 0.01 M HCl, pH 2,0. La fracción retenida obtenida por esta técnica mostró una alta actividad inhibitoria (96%) y un contenido de proteína de 619  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Fracciones de 2 mL fueron recogidas y en ellas se determinó la actividad inhibitoria de la tripsina con BAPNA, expresadas como actividad inhibitoria (%).

En la **Figura 21** se observa una gráfica comparativa de las diferentes actividades inhibitorias de tripsina de las siguientes muestras: EC, TT60, TT70, TT80, TT90 y fracción retenida de la afinidad. Se puede observar que la fracción retenida de la salida de afinidad mantiene un gran porcentaje de inhibición sobre tripsina. Tener en cuenta que la cromatografía de afinidad concentra el inhibidor, por este motivo visualizamos mayor actividad inhibitoria que en el extracto de siembra original (TT70).

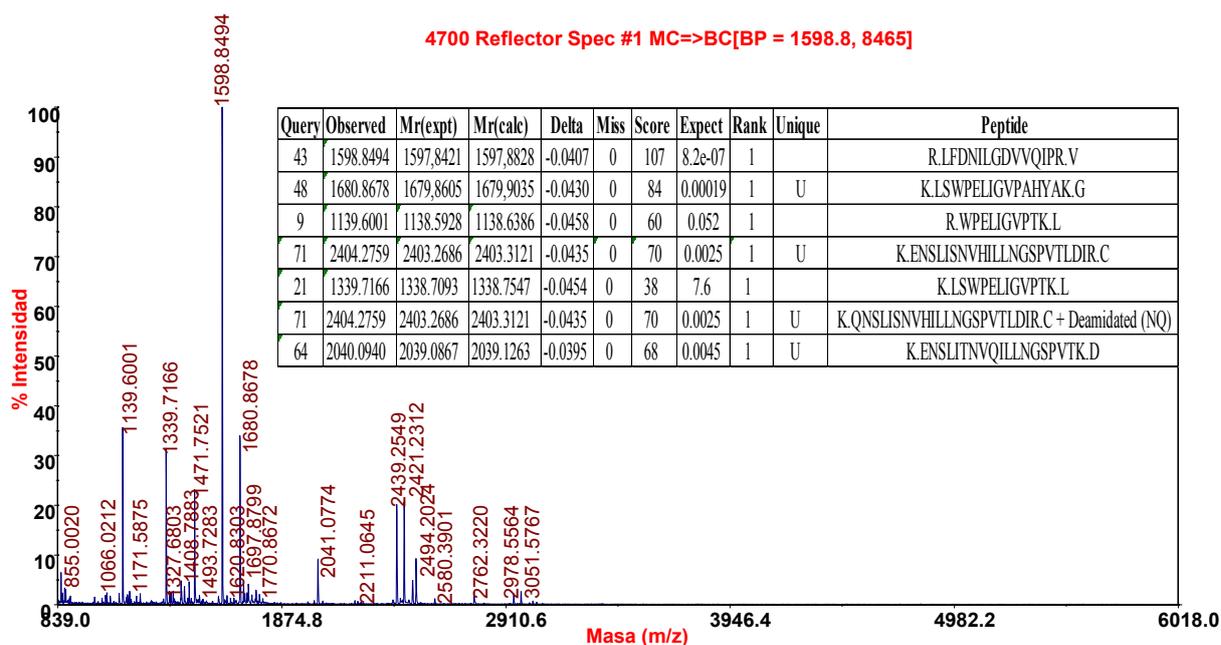


**Figura 21:** Comparación de la actividad inhibitoria porcentual de tripsina de: EC de Imilla Negra, tratamientos térmicos (TT60, TT70, TT80 y TT90) y la fracción con actividad inhibitoria de tripsina (Ret. afin.) proveniente de la cromatografía de afinidad utilizando como muestra en la siembra el TT70 de Imilla Negra. Los resultados se expresan como actividad inhibitoria % de tripsina de cada tratamiento en relación a la actividad de tripsina control sin muestra.

## **A.12 Caracterización proteómica de los IPPs de papas andinas**

### *A.12.1 Confirmación de la identificación de IPPs mediante técnicas proteómicas*

**Huella peptídica:** La fracción retenida de la cromatografía de afinidad fue sometida en primera instancia, al proceso de digestión trípica (ver Metodología A.11.6.2). A los péptidos resultantes de la digestión se les realizó una espectrometría de masas MALDI-TOF con el fin de obtener la huella peptídica de la proteína. Este proceso es denominado PMF de su sigla en inglés, *Peptide Mass Fingerprinting*. A partir del análisis de la huella peptídica se han identificado diferentes péptidos de los distintos componentes mayoritarios presentes en el extracto como producto de la digestión trípica de cada una de las bandas. La **Figura 22** muestra el espectro de los productos de la digestión trípica y la huella peptídica de la banda electroforética.



**Figura 22:** Espectro PMF-MALDI-TOF/MS de la fracción retenida por la cromatografía de afinidad y tabla que contiene la secuencia de los péptidos que identifican con cada pico de interés.

*A.12.2 Secuenciación de novo de péptidos internos de la fracción retenida por la cromatografía de afinidad, mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS*

Esta metodología consiste en fragmentar por separado cada uno de los péptidos productos de la digestión triptica (empleando mayor energía que para el MALDI-TOF/MS) y luego predecir secuencia a partir de las diferencias de masas de cada uno de los fragmentos generados.

Se fragmentaron 12 péptidos obtenidos de la digestión triptica y luego se analizaron los fragmentos generados empleando herramientas proteómicas proporcionadas por programas o sitios bioinformáticos disponibles en la red. [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html).

Los fragmentos elegidos para la fragmentación fueron los siguientes: 1139 Da, 1340 Da, 1472 Da, 1599 Da, 1681 Da, 1697 Da, 2040 Da, 2404 Da, 2438 Da, 2477 Da, 2493 Da y 2761 Da.

Los análisis de los espectros de masas obtenidos fueron analizados utilizando la herramienta de búsqueda en base de datos “*Mascot Database Search*”, confirmando que al menos un nuevo inhibidor de tripsina está presente en la fracción retenida de la cromatografía de afinidad de un TT70 de Imilla Negra. Se pudo identificar un IPP

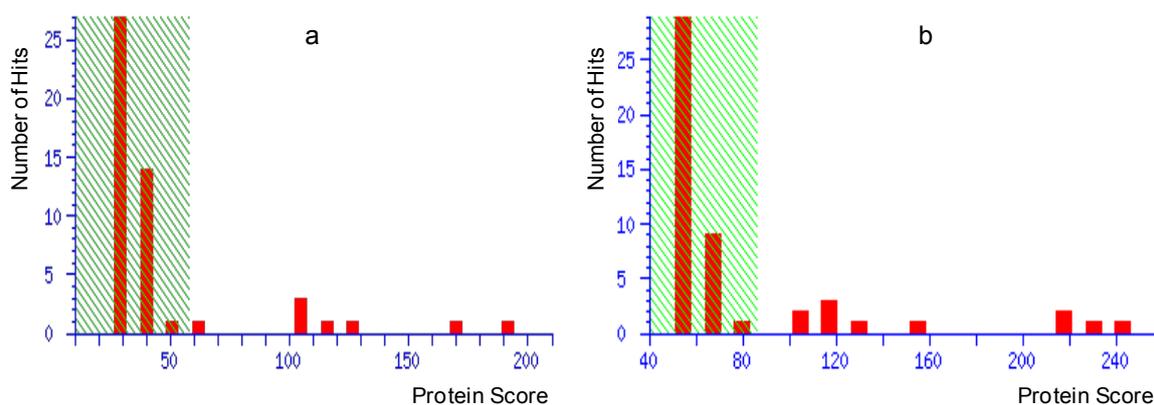
serínico de tipo Kunitz de la especie *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* de 12 kDa aproximadamente. Los análisis de la fragmentación de la secuencia y la secuenciación de *novo* mostraron que todos los péptidos secuenciados pertenecen a diferentes inhibidores de proteasas serínicos de la misma familia. Ninguno de los inhibidores hallados en bases de datos tiene un 100% de cobertura con las secuencias encontradas. Se obtuvo una secuencia parcial mediante secuenciación de *novo* usando alineamientos en base de datos NCBI BLAST que hace evidente que el IPP posee un alto grado de homología con muchos inhibidores de la misma familia, pero sin apareamiento completo con ninguno de ellos. Las identificaciones de los 12 fragmentos con diferentes inhibidores se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4:** Proteínas identificadas por secuenciación *de novo* de los péptidos internos mediante MALDI-TOF-TOF/MS/MS.

TOF-TOF experimental		TOF-TOF teórico						Secuencia peptídica del fragmento
Fracción retenida	proteínase inhibidor I, parcial			proteínase inhibidor I		Chymotrypsin inhibidor I		
	m/z	m/z	F.P.	m/z	F.P.	m/z	F.P.	
1139,6			1138,6	47-56	1138,6	47-56	R.WPELIGVPTK.L	
1343,7	1342,7	20-31	1342,7	26-37	1342,7	26-37	K.ESDGPEVIELQK.E	
1423,7					1422,8	45-56	K.QRWPELIGVPTK.L	
1424,8			1423,8	45-56	1423,8	45-56	K.ERWPELIGVPTK.L	
1471,8	1470,8	19-31	1470,8	25-37	1470,8	25-37	R.KESDGPEVIELQK.E	
1598,8	1597,9	86-99	1597,9	92-105	1597,9	92-105	R.LFDNILGDVWQIPR.V	
1680,9	1679,9	39-53					K.LSWPELIGVPAHYAK.G	
2477,2	2476,3	59-80	2476,3	65-86	2476,3	65-86	K.ENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C	
2493,2	2492,3	59-80	2492,3	65-86	2492,3	65-86	K.ENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Oxidation (M)	
3018,5	3017,6	54-80	3017,6	60-86	3017,6	60-86	K.GIIEKENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Deamidated (NQ)	
3033,5	3032,6	54-80	3032,6	60-86	3032,6	60-86	K.GIIEKENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Oxidation (M)	
Fracción retenida	proteínase inhibidor 1		Proteínase inhibidor I; Precursor		proteínase inhibidor 1, parcial			
	m/z	F.P.	m/z	F.P.	m/z	F.P.		
1139,6	1138,6	47-56	1138,6	47-56			R.WPELIGVPTK.L	
1327,7			1326,7	26-37			K.ESDGPEVIQLLK.E	
1343,7	1342,7	26-37					K.ESDGPEVIELQK.E	
1408,8			1407,8	45-56			K.LRWPELIGVPTK.L	
1423,8	1422,8	45-56					K.QRWPELIGVPTK.L	
1424,8	1423,8	45-56					K.ERWPELIGVPTK.L	
1471,8	1470,8	25-37					R.KESDGPEVIELQK.E	
1598,8	1597,9	92-105			1597,9	91-104	R.LFDNILGDVWQIPR.V	
2404,3			2403,3	65-86			K.ENSLISNVHILLNGSPVTLDIR.C	
2405,3			2404,3	65-86			K.ENSLISNVHILLNGSPVTLDIR.C + Deamidated (NQ)	
2477,2	2476,3	65-86			2476,2	64-85	K.ENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C	
2493,2	2492,3	65-86			2492,2	64-85	K.ENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Oxidation (M)	
3018,5	3017,6	60-86					K.GIIEKENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Deamidated (NQ)	
3033,5	3032,6	60-86					K.GIIEKENSLITNVQILLNGSPVTMDYR.C + Oxidation (M)	
Fracción retenida	proteínase inhibidor I precursor		proteínase inhibidor 1 PPI2C4		chymotrypsin inhibidor chain D			
	m/z	F.P.	m/z	F.P.	m/z	F.P.		
1339,7	1338,7	45-56	1338,8	45-56			K.LSWPELIGVPTK.L	
1371,7					1370,8	29-40	K.QNSLITNVQILK.N + Deamidated (NQ)	
1598,8					1597,9	70-83	R.LFDNILGDVWQIPR.V	
2040,1			2039,1	65-83			K.ENSLITNVQILLNGSPVTK.D	
2041,1			2040,1	65-83			K.ENSLITNVQILLNGSPVTK.D + Deamidated (NQ)	
2404,3	2403,3	65-86					K.ENSLISNVHILLNGSPVTLDIR.C	
2405,3	2404,3	65-86					K.ENSLISNVHILLNGSPVTLDIR.C + Deamidated (NQ)	

Los histogramas de identificación correspondientes al PMF-MALDI-TOF/MS y a la secuenciación *de novo* MALDI-TOF-TOF/MS-MS de la fracción retenida en la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada a partir del TT70 de Imilla Negra, se muestran en las **Figura 23 a y 23 b**.

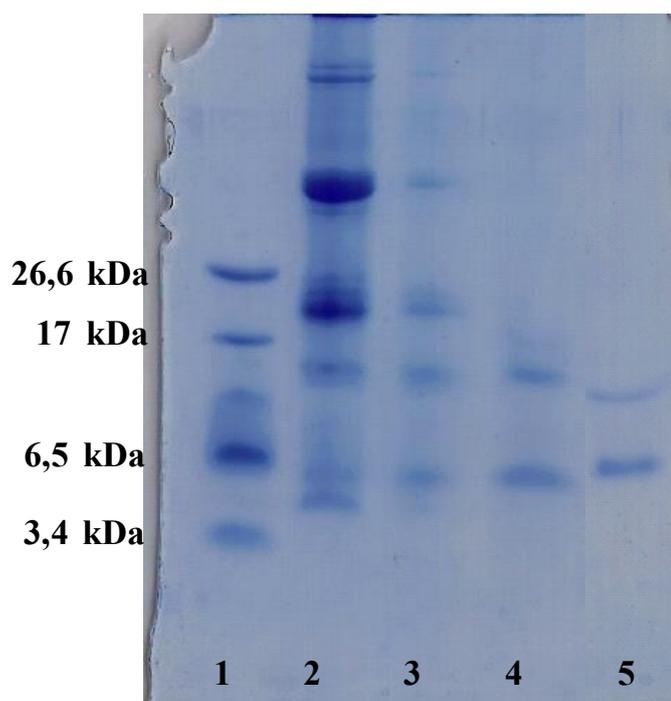
**Histograma de identificación PMF-MALDITOF/MS y MALDI-TOF-TOF/MS-MS**



**Figura 23:** a) Resultados de la identificación. El score de los iones es  $-10 \cdot \log(P)$ , donde P es la probabilidad de que el apareamiento observado haya sido un evento al azar. Los scores de los iones individuales mayores a 58 indican identidad o amplia homología ( $p < 0,05$ ). b) El score de las proteínas es  $-10 \cdot \log(P)$ , donde P es la probabilidad de que el apareamiento observado sea un evento al azar. Los scores de las proteínas mayores a 86 son significantes ( $p < 0,05$ ) (Obregón, *et al.* 2011; Yanes, *et al.* 2005).

**A.13 Caracterización mediante SDS-PAGE de la fracción retenida de la cromatografía de afinidad**

Por las técnicas usadas anteriormente se llegó a la conclusión de que no hay un único inhibidor en la salida de la cromatografía de afinidad, debido a que identifica con más de un inhibidor en base de datos. A continuación, se decidió realizar un gel de SDS-PAGE para observar el grado de homogeneidad de la fracción eluida de la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada.



**Figura 24:** SDS-PAGE. Calle 1: Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BIO-RAD). Calle 2: EC. Calle 3: TT60. Calle 4: TT70. Calle 5: Retenido de afinidad a partir de TT70 de Imilla Negra.

En la **Figura 24**, calle 5, se observan dos bandas proteicas de alrededor de 6 kDa y 15 kDa aproximadamente.

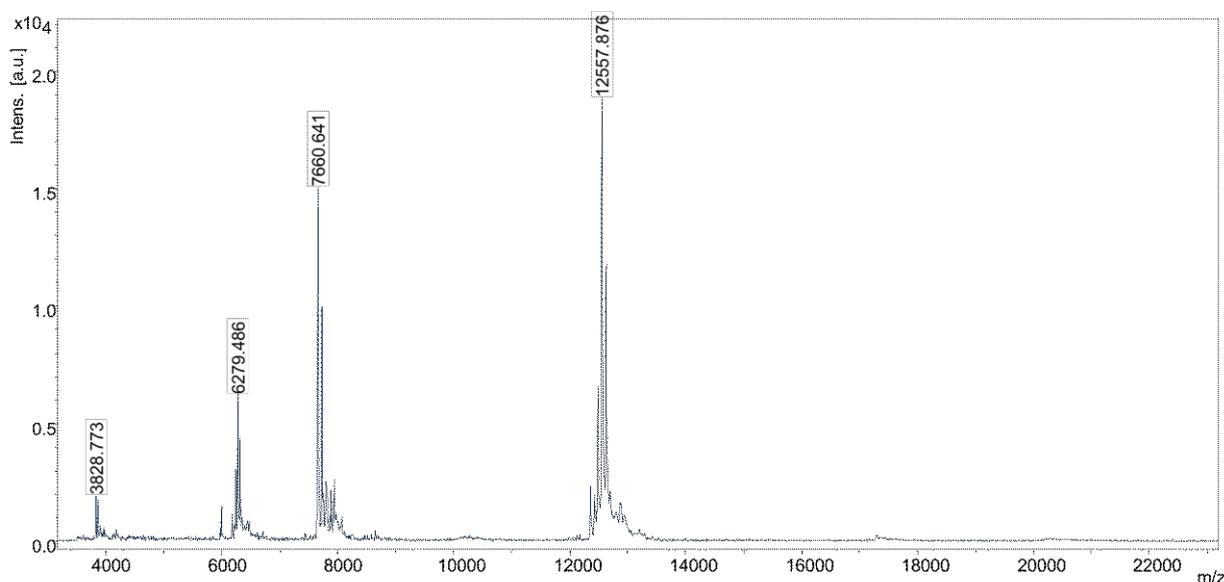
Debido a que la fracción que queda retenida en la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada posee actividad inhibitoria de tripsina, se llegó a la conclusión de que al menos uno o los 2 compuestos serían inhibidores de tripsina.

El perfil electroforético de la fracción retenida obtenida por cromatografía de afinidad mostró dos bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes de 6 kDa y 15 kDa aproximadamente (**Figura 24**), sugiriendo la posibilidad de un inhibidor de tipo Kunitz debido al peso molecular encontrado (Fischer et al., 2015; Kansal *et al.*, 2008; Cleveland *et al.*, 1987).

#### **A.14 Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF**

Para la determinación de la masa molecular, una metodología con gran resolución, exactitud y precisión, es la espectrometría de masas MALDI-TOF. Por este motivo, la fracción retenida de la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada fue desalada

y acidificada con TFA al 0,1% y luego fue sembrada en una placa de MALDI-TOF/MS para obtener así, el espectro de masas correspondiente (**Figura 25**).



**Figura 25:** Espectro de MALDI-TOF/MS. Se puede observar en la figura que en la fracción retenida por la tripsina inmovilizada en la cromatografía de afinidad se encuentran 2 compuestos. Uno de 7,6 kDa y otro de 12,5 kDa, aproximadamente. Los demás picos de 3,8 kDa y 6,25 kDa aproximadamente, pertenecen a las mismas moléculas doblemente cargadas (mitad exacta de la relación m/z de los péptidos de 7,6 y 12,5 kDa).

Una vez confirmado por SDS-PAGE y por MALDI-TOF/MS que la fracción retenida de la cromatografía de afinidad se correspondía con uno o dos IPPs serínicos, se procedió a continuar con la purificación de dicha muestra con el fin de caracterizar los isoINHIBIDORES.

Cabe aclarar que, a partir de este punto, se empezaron a realizar distintos tipos de estrategias cromatográficas para realizar la separación y purificación de los dos isoINHIBIDORES. Dicha puesta a punto contrajo diversas complicaciones en el sostenimiento de un buen “stock” de muestra. En esta parte del trabajo acontecieron problemas técnicos, de conservación y mantenimiento que hicieron perder parte del material vegetal original. Además, se suma que la puesta a punto con diferentes técnicas fue agotando, de a poco y en cada paso, aun más la muestra. Por este motivo en la sección siguiente se muestran dos de los procedimientos que mejor funcionaron que, de tener más muestra, podrían haber desembocado en la purificación de los isoINHIBIDORES.

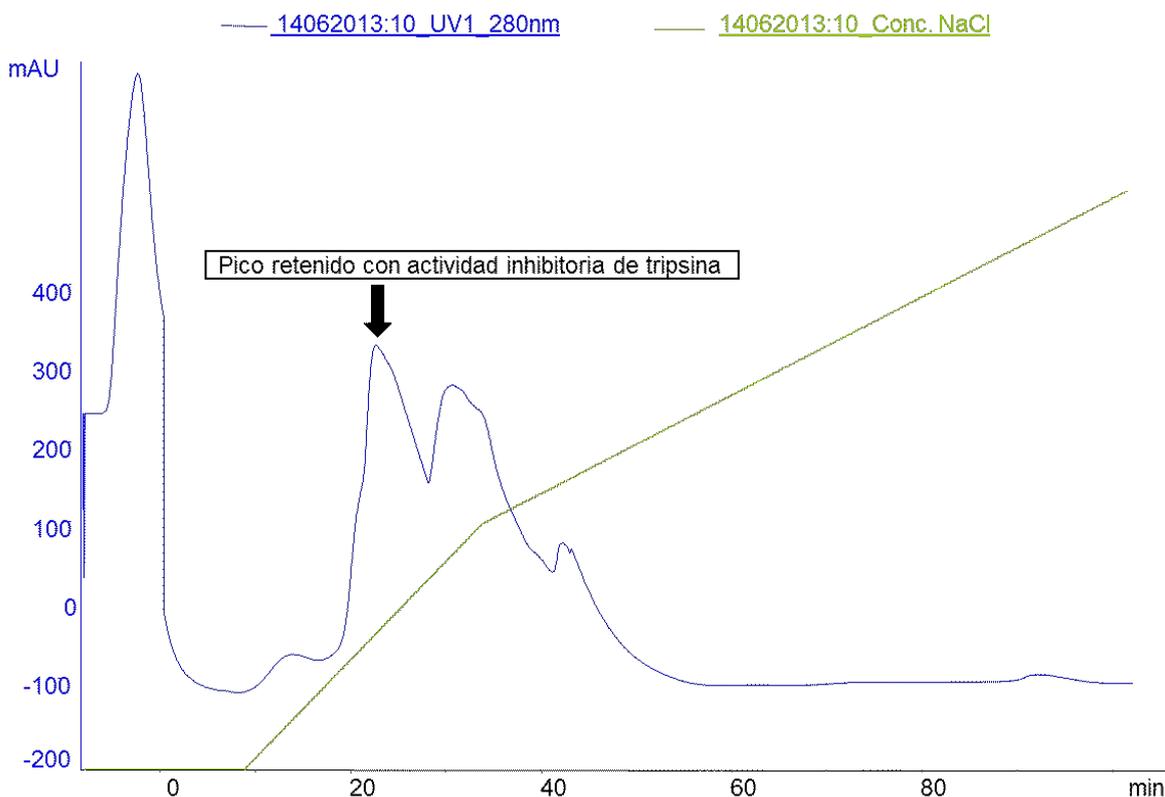
En primera instancia, se muestra una cromatografía de intercambio aniónico en la cual, como se observará, se pudo haber logrado la purificación del isoinhibidor de 12,5 kDa.

En segunda instancia, se muestra una purificación utilizando una cromatografía líquida de alta eficacia o “*high performance liquid chromatography*” (HPLC) y posterior MALDI-TOF/MS en la cual se pudo haber purificado de manera eficiente el inhibidor de 7,6 kDa.

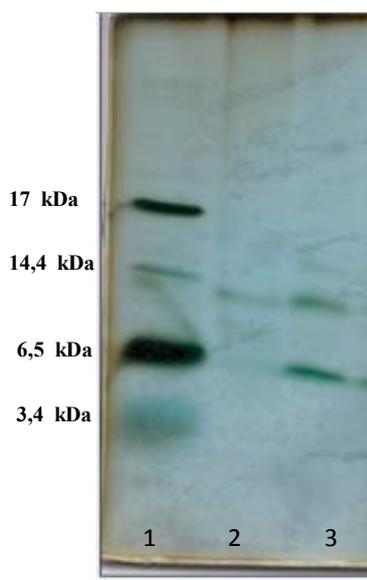
Tal como se mencionara anteriormente, en ambos casos, no se pudo continuar con estas investigaciones por agotamiento de la muestra.

### **A.15 Cromatografía de intercambio aniónico**

Como se mencionó en el texto anterior, el siguiente paso fue realizar una cromatografía de intercambio aniónico de la fracción retenida en la cromatografía de afinidad, pero al no poder observarse resultado alguno por la escasa cantidad de muestra presente, se procedió a realizar una cromatografía de intercambio aniónico con la muestra TT70 de Imilla Negra. El TT70, tal como se observa en la **Figura 24**, presenta al menos 2 de las bandas proteicas presentes en la fracción retenida de la cromatografía de afinidad. Por este motivo, se sembraron 2 ml de TT70 en la columna de intercambio aniónico y luego de la corrida se observaron varias fracciones eluidas, la mayor de ellas con un valor máximo de absorbancia a 280 nm de 0,4 UA aproximadamente (**Figura 26**). El gradiente de NaCl utilizado fue de 0 a 1 M, a una velocidad de flujo de 1 mL/min, y el pH de la corrida fue de 9. El primer pico salió a un 35% del gradiente aplicado.



**Figura 26:** Cromatograma correspondiente a la cromatografía de intercambio aniónico con la muestra TT70 de Imilla Negra. El primer pico retenido mostró buena actividad inhibitoria de tripsina (60-70%). Los demás no mostraron actividad. Las líneas azules corresponden a la absorbancia a 280 nm y las líneas verdes a la concentración de NaCl usada en la elución. La primera fracción retenida salió a una concentración de NaCl 0,35 M.

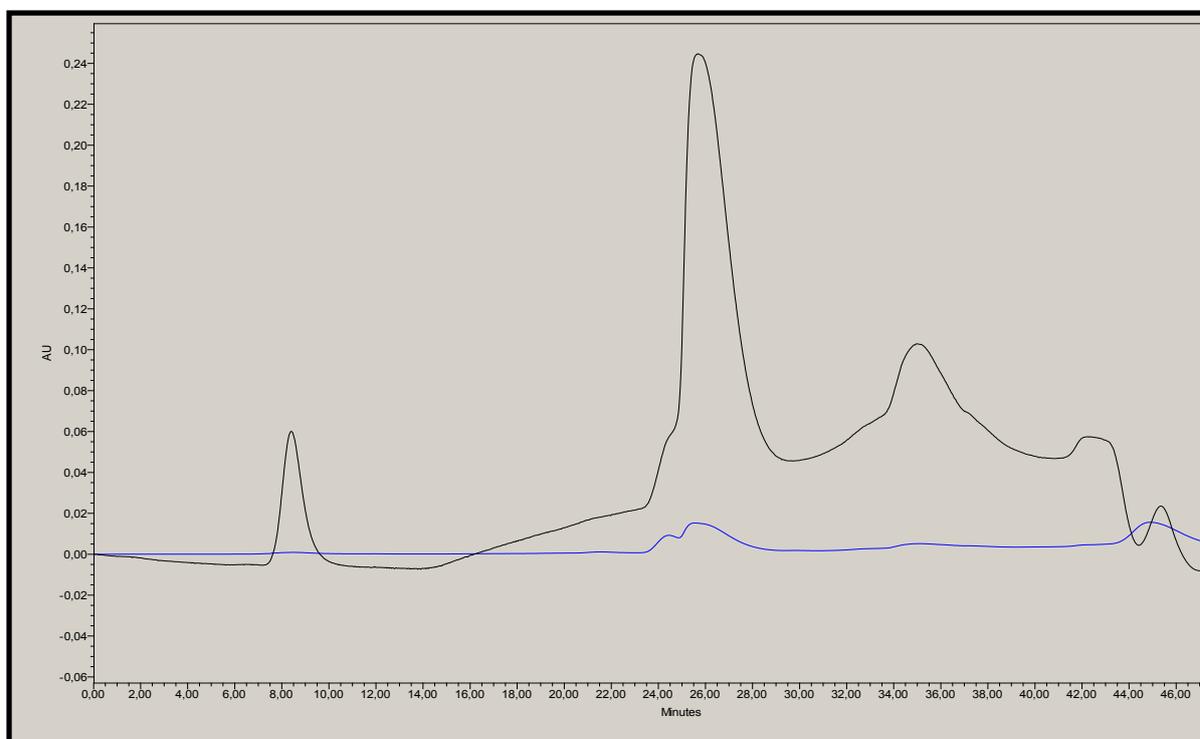


**Figura 27:** SDS PAGE. Calle 1: Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BIO-RAD). Calle 2: Fracción con actividad inhibitoria proveniente de la cromatografía de intercambio aniónico. Calle 3: Fracción con actividad inhibitoria de tripsina proveniente de la cromatografía de afinidad utilizando como muestra en la siembra el TT70 de Imilla Negra.

En la calle 2 de la **Figura 27**, se puede apreciar una banda de alrededor de 12 kDa coincidente con la misma banda del pico retenido de la afinidad observada en la calle 3. La cromatografía de intercambio iónico, en las condiciones ensayadas, podría servir para separar parcialmente el isoINHIBIDOR de 12,5 kDa.

### **A.16 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

La fracción retenida en la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada, que contiene 2 compuestos de aproximadamente 7,6 kDa y 12 kDa (al menos uno con actividad inhibitoria de proteasas serínicas), fue sometida a una HPLC.

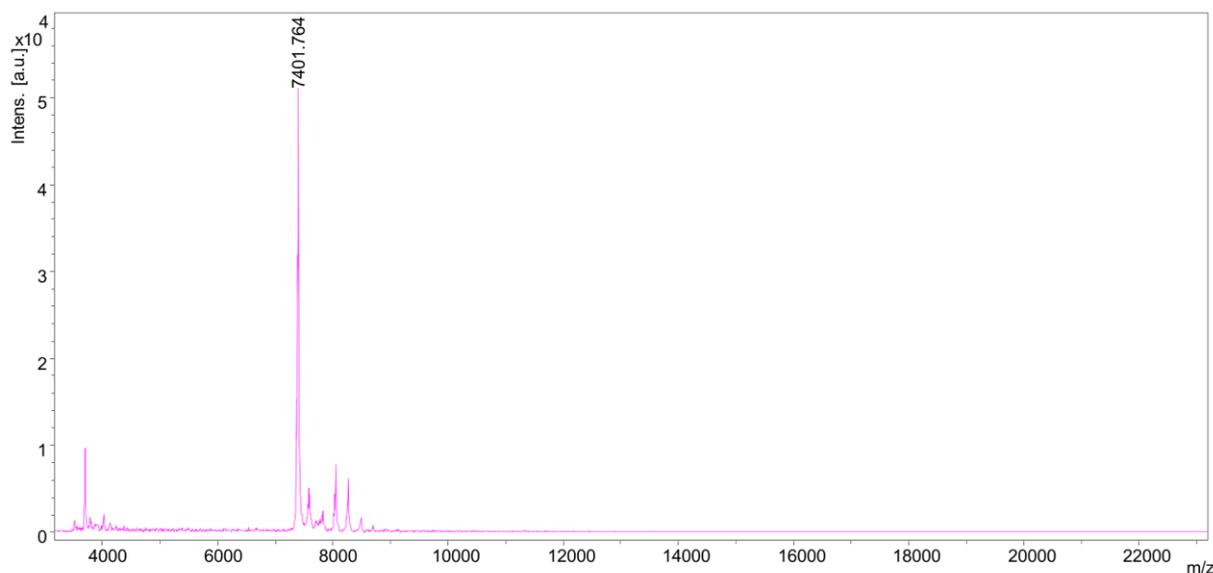


**Figura 28:** HPLC de la fracción retenida por cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada. La línea negra representa la absorbancia medida a 214 nm y la línea azul la absorbancia medida a 280 nm. La fracción que va del minuto 24 al minuto 28 fue eluida cuando el gradiente alcanzó el 50% de acetonitrilo y presenta un máximo de absorbancia de 0,24 UA a 214 nm.

Se puede observar claramente en la **Figura 28** que no se cuenta con suficiente cantidad de muestra luego de la elución de la columna luego de la HPLC.

Los picos obtenidos por HPLC fueron sometidos a MALDI-TOF/MS para evaluar sus masas moleculares. Debido a la escasa cantidad de muestra que se obtuvo en esta

última etapa de trabajo, sólo se pudo encontrar en los picos de HPLC un compuesto de 7,4 kDa (**Figura 29**), que quizás se corresponda con uno de los compuestos que en el pico retenido de la cromatografía de afinidad que tenía una masa molecular de 7,6 kDa. La fracción del HPLC correspondiente a la masa de 7,4 kDa es la primera fracción retenida por la columna (que va del minuto 24 al minuto 28). La elución del HPLC se llevó a cabo con un gradiente de acetonitrilo/agua, que fue de 0 a 100% de acetonitrilo, con una velocidad de 1ml/min. La fracción retenida de este compuesto salió de la columna cuando se alcanzó el 50% de acetonitrilo.



**Figura 29:** Espectro de MALDI-TOF/MS de la fracción retenida (50% ACN, 0,24 UA a 214 nm.) en la columna C4 en el proceso de HPLC. Se puede observar que sólo se obtiene un péptido de 7,4 kDa.

A continuación, y para aprovechar toda la información adquirida mediante los ensayos proteómicos de PMF-MALDI-TOF/MS y a la secuenciación *de novo* MALDI-TOF-TOF/MS-MS, se intentó obtener una secuencia consenso de uno de los dos inhibidores de serín protesas, con la finalidad de construir cebadores para una futura clonación y expresión heteróloga con el fin de disponer de suficiente cantidad de IPP puro para realizar los ensayos microbiológicos propuestos en los objetivos de este trabajo.



En amarillo se puede ver la secuencia señal de la proteína, en turquesa la región del propéptido, y quedando el resto como la proteína madura. Utilizando la herramienta bioinformática de Expasy "*Compute pI/Mw tool*" ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), se pudo observar que este inhibidor (la secuencia de la proteína madura) tendría un peso molecular de 9944.57 Da y un pI de 6.91. En lo que respecta a su forma de preproteína (124 aminoácidos, desde la secuencia del péptido señal), su peso molecular es de 13875,19 Da y su pI de 5,57; y en lo que respecta a su forma de proproteína (102 aminoácidos), su peso molecular es de 11411,23 Da y su pI de 5,64. Esta secuencia será la base para el diseño de cebadores de la sección siguiente. Este diseño se basó en que los cebadores contengan secuencias reales, obtenidas mediante la información adquirida de las técnicas proteómicas y además, también se decidió utilizar la información adquirida respecto a las secuencias teóricas obtenidas del alineamiento múltiple (**Tabla 4** y **Figura 30**).

## PARTE B

### CLONADO Y EXPRESION DE IPPS DE PAPA ANDINA

Tal como se manifestó en la sección Material Vegetal, la selección del material elegido para el clonado y expresión estuvo fundamentada en la elección de una variedad que tenga características macroscópicas similares a Imilla Negra, la cual no pudo seguir caracterizándose por agotamiento de la muestra. Por este motivo esta parte del trabajo se realizó usando cultivos *in vitro* a través de la generación de “vitroplantas” para conservación de la variedad a estudiar. Para ello se utilizaron la variedad Overa y también la variedad Chacarera con el fin de adicionar más información al estudio.

En esta sección, el ADNc obtenido a partir del ARNm que codifica para el inhibidor completo de las variedades Overa y Chacarera en sus formas de preproinhibidores, fue ligado al vector pNZY28 y posteriormente clonado en *E. coli* NZYStar.

Finalmente, solo se subclonó el preproinhibidor de la variedad Overa conteniendo el péptido señal en el vector de expresión pHTP1, y se expresó el mismo en *Escherichia coli* BL 21.

#### **B.1 Extracción del ARN total**

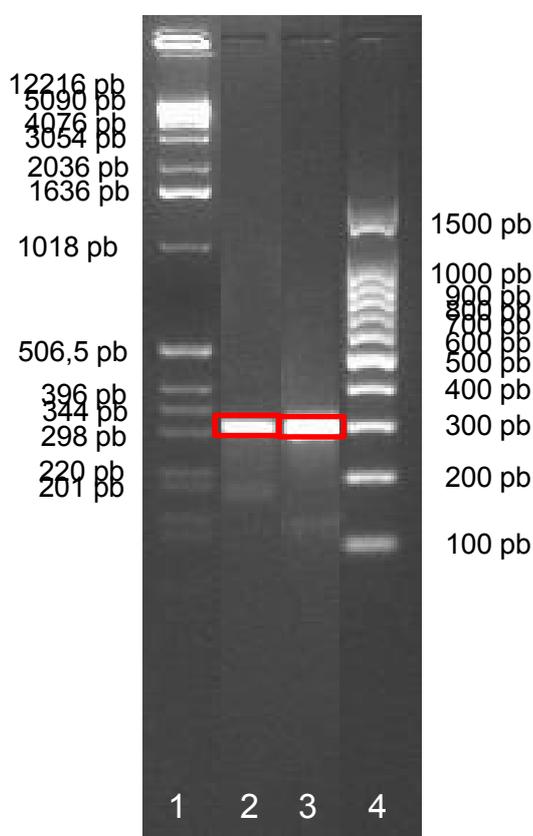
A partir de plantas de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Overa y variedad Chacarera provenientes de cultivo *in vitro*, se aisló el ARN total. Aproximadamente 100 mg de planta fueron triturados y el ARN eluido de las microcolumnas que contienen las membranas de sílice, se cuantificó por absorbancia a 260 nm y su integridad se evaluó en gel de agarosa 2% (p/v).

#### **B.2 Síntesis de la doble cadena híbrida ARN-ADNc**

Se sintetizó la primera cadena de ADN complementaria al ARNm por reacción de retrotranscripción utilizando los primers oligo-p(dT)15 y como molde, aproximadamente 1,2 µg del ARN total previamente obtenido y desnaturalizado a 65 °C durante 15 min seguido de una incubación de 5 min en hielo.

**B.3 Amplificación de las secuencias codificantes para los IPPs**

Para la amplificación por PCR se utilizó como molde, cADN del transcripto del inhibidor de serin proteasa de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Overa y variedad Chacarera. Los productos de dicha amplificación, analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se muestran en la **Figura 31**. El tamaño de cada banda corresponde, en todos los casos, al esperado para la secuencia codificante para cada IPP maduro, cercano a los 300 pares de bases. Se utilizaron los cebadores Falineamiento (*Forward*) y Rev2 (*Reverse*) (ver en Metodología la **Tabla 9**).



**Figura 31:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR utilizando primers específicos para la secuencia codificante para el IPP serínico maduro de la variedad Overa (calle 2) y la variedad Chacarera (calle 3). Las bandas señaladas en rojo corresponden a los ADNc amplificados con el peso esperado. Calle 1: Marcador TrackIt 1kb DNA ladder (Invitrogen) (10 uL). Calle 4: GRS Ladder 100 pb (Grisp) (8 uL).

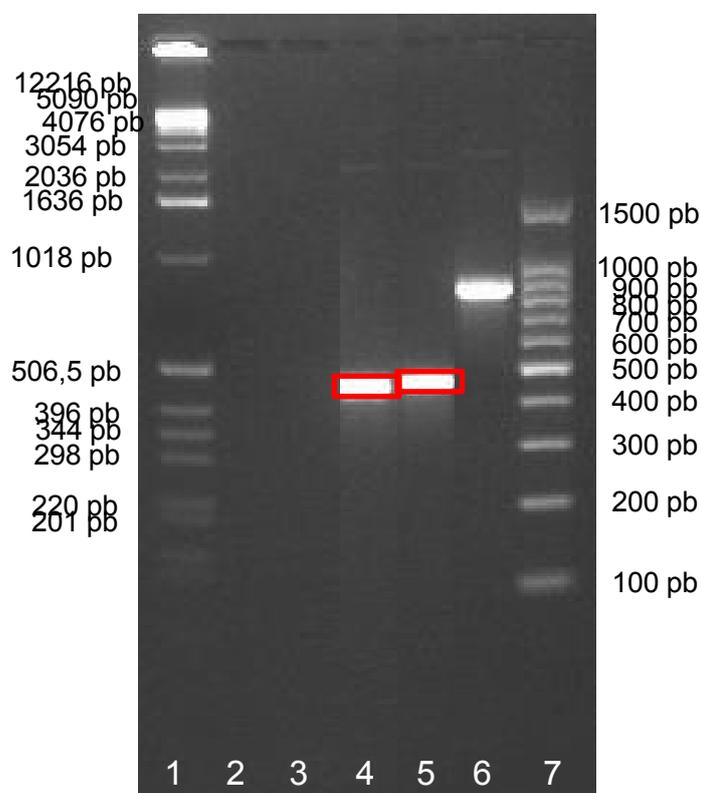
Se cortaron las bandas del tamaño molecular esperado (300pb) del gel de agarosa, para cada variedad, se purificaron los productos de amplificación y cada producto se ligó al vector de clonado pNZY28.

**B.4 Ligación de las secuencias amplificadas en el vector pNZY28**

Los productos de amplificación de 300 pb purificados del gel de electroforesis de cada variedad se ligaron al plásmido pNZY28 (**Figura 47** de Metodología) y se transformaron en la cepa *E.coli* NZYStar (Genotipo de las células competentes: *endA1 hsdR17* ( $r_{k-m_{k+}}$ ) *supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[F' *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>ZΔM15 :Tn10(Tc<sup>R</sup>)*]).

A continuación, se realizó un screening de las colonias transformadas con la finalidad de confirmar las colonias blancas que eran recombinantes. Para ello, se realizó un cultivo de las colonias transformadas con posterior purificación de los plásmidos mediante miniprep (ver Metodología sección B.1.11). Para la confirmación de la inserción de la secuencia de interés, se utilizaron primers específicos para dos secuencias reconocidas en el vector; cada una aproximadamente 75 pb cuesta abajo y 75 pb cuesta arriba de la secuencia insertada.

En la **Figura 32** se muestra la banda del fragmento correspondiente a la secuencia codificante para cada IPP maduro (300 pb aproximadamente) ligada a las secuencias del plásmido (150 pb aproximadamente) obtenidas por PCR. La banda del carril 4 corresponde a la variedad Overa y la banda del carril 5 corresponde a la variedad Chacarera.



**Figura 32:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del screening de colonias transformadas con el plásmido pNZY28. Calle 1: Marcador TrackIt 1kb DNA ladder (Invitrogen) (10 uL). Calle 2: No se sembró. Calle 3: Control de la PCR (sin muestra). Calle 4: chPTI dentro del plásmido pNZY28. Calle 5: oPTI dentro del plásmido pNZY28. Calle 6: Control de la ligación con inserto control de 700 pb. Calle 7: GRS Ladder 100 pb (Grisp) (8 uL).

### B.5 Secuenciación de los productos de amplificación contenidos en el plásmido pNZY28

Una vez obtenidas las bandas del peso molecular esperado, se enviaron los productos de PCR a secuenciar (ver Metodología la sección B.1.12), para confirmar su identidad. La secuenciación obtenida por el método de Sanger, utilizando los cebadores T7 promoter sequencing primer (*Forward*) y pUC/M13 Primer, Forward (24mer) (*Reverse*) (ver en Metodología la **Tabla 6**), demostró mediante búsqueda en base de datos utilizando la herramienta bioinformática BLASTN que se había clonado correctamente la secuencia codificante para un IPP maduro de la variedad Overa y de la variedad Chacarera en el plásmido pNZY28.

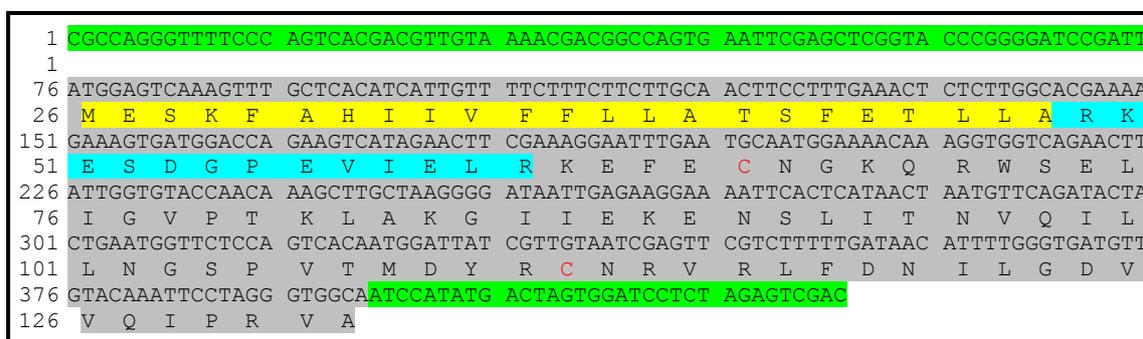
En la **Figura 33** se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación de la variedad Overa que coincide con la secuencia esperada para un IPP serínico. Dicha molécula, que denominaremos de ahora en adelante, oPTI, consiste en 71 aminoácidos. Se utilizó la herramienta bioinformática de ExPASy “*Compute pI/Mw tool*” ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), y los siguientes parámetros fisicoquímicos teóricos fueron observados para el oPTI maduro: peso molecular de 7868,17 Da y punto isoeléctrico de 8,01. En lo que respecta a su forma de preproteína (107 aminoácidos, desde la secuencia del péptido señal), su peso molecular es de 11960,93 Da y su pI de 5,63; y en lo que respecta a su forma de proproteína (84 aminoácidos), su peso molecular es de 9349,80 Da y su pI de 5,77.

1	CGCCAGGGTTTTCCC	AGTCACGACGTTGTA	AAACGACGGCCAGTG	AATTCGAGCTCGGTA	CCCGGGGATCCGATT
1					
76	ATGGAGTCAAAGTTT	GTCACATCATTGTT	TTCTTTCTTCTTGCA	ACCTCCTTTGAAACT	CTCTTGGCAGCAAAA
26	M	E	S	K	F
	A	H	I	I	V
	F	F	L	L	A
	T	S	F	E	T
	L	L	A	R	K
151	GAAAGTGTATGGACCA	GAAGTCATAGAACTT	CAAAAGGAATTTGAA	TGCAATGGAAAACATA	AGCTGGCCAGAAGTT
51	E	S	D	G	P
	E	V	I	E	L
	Q	K	E	F	E
	C	N	G	K	L
	S	W	P	E	L
226	ATTGGTGTACCAGCA	CATTATGCTAAGGGA	ATAATTTAGAAGGAA	AATCACTCATAACT	AATGTTTCAGATACTA
76	I	G	V	P	A
	H	Y	A	K	G
	I	I	*	K	E
	N	S	L	I	T
	N	V	Q	I	L
301	CTGAATGGTTCTCCA	GTCACAATGGATTAT	CGTTGTAATCGAGTT	CGTCTTTTGTATAAC	ATTTGGGTGATGTT
101	L	N	G	S	P
	V	T	M	D	Y
	R	C	N	R	V
	R	L	F	D	N
	I	L	G	D	V
376	GTACAAATTCCTAGG	GTGGCAATCCATATG	ACTAGTGGATCCTCT	AGAGTCGACCCGCCA	GATCAC
126	V	Q	I	P	R
	V	A			

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE B

**Figura 33:** Arriba: Secuencia nucleotídica del oPTI de la variedad Overa clonado dentro del vector pNZY28. Se muestra subrayado el codón de la Metionina de iniciación del vector y se resalta: en verde; la porción correspondiente al vector; en gris claro, la secuencia codificante para el oPTI maduro. Abajo: Secuencia aminoacídica del oPTI deducida a partir de la secuencia nucleotídica. Resaltada en gris, se muestra la secuencia del oPTI maduro; resaltado en amarillo se encuentra el péptido señal para liberar al oPTI maduro al espacio extracelular; en turquesa y gris, la región del propéptido; en rojo, las cisteínas que forman enlace disulfuro.

En la **Figura 34** se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica de la variedad Chacarera. A dicha molécula la denominaremos de ahora en adelante chPTI. Esta molécula también posee 71 aminoácidos. Utilizando la herramienta bioinformática de Expsy "Compute pI/Mw tool" ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), los parámetros fisicoquímicos teóricos del chPTI maduro son: peso molecular de 8042,37 Da y punto isoeléctrico de 8,76. En lo que respecta a su forma de preproteína (107 aminoácidos, desde la secuencia del péptido señal), su peso molecular es de 12163,19 Da y su pI de 6,58. Y en lo que respecta a su forma de proproteína (84 aminoácidos), su peso molecular es de 9552,05 Da y su pI de 7,99.



**Figura 34:** Arriba: Secuencia nucleotídica del chPTI de la variedad Chacarera clonado dentro del vector pNZY28. Se muestra subrayado el codón de la Metionina de iniciación del vector y se resalta: en verde; la porción correspondiente al vector; en gris claro, la secuencia codificante para el chPTI maduro. Abajo: Secuencia aminoacídica del chPTI deducida a partir de la secuencia nucleotídica. Resaltada en gris, se muestra la secuencia del chPTI maduro; resaltado en amarillo se encuentra el péptido señal para liberar al chPTI al espacio extracelular; en turquesa y gris, la región del propéptido; en rojo, las cisteínas que forman enlace disulfuro.

En la **Figura 35** se muestra el alineamiento de las secuencias de inhibidores clonados (oPTI y chPTI) con la secuencia consenso obtenido por análisis proteómico (MALDI-TOF/TOF y PMF-MALDI/TOF) del inPTI, inhibidor caracterizado y purificado de la variedad Imilla Negra (ver sección A de Resultados). Se observa un 97,14% de identidad de inPTI con oPTI y un 91,51% de identidad con chPTI. Y un 93,40% de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE B

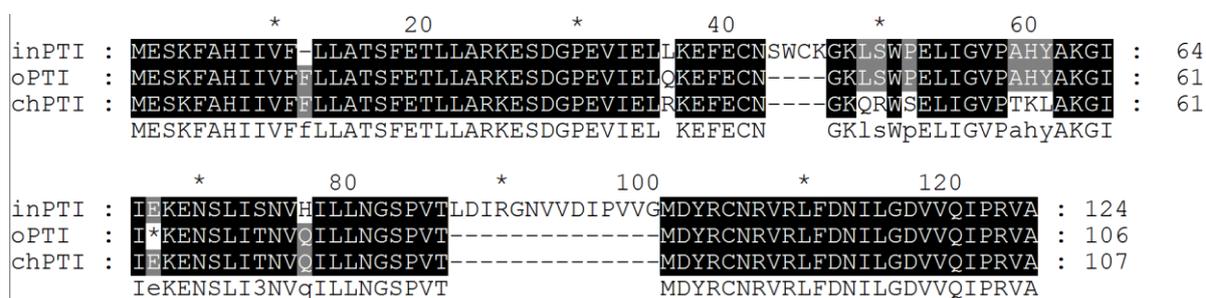
identidad entre oPTI y chPTI. Se utilizó la herramienta bioinformática MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) para poder realizar el análisis de identidad anteriormente mostrado.

Se puede concluir que a pesar de no tener un 100% de identidad con el inPTI, tanto oPTI como chPTI, la elección de las variedades Overa y Chacarera, como reemplazantes de Imilla Negra para la continuación de los estudios de inhibidores de serín proteasas no fue desacertada.

Utilizando la herramienta bioinformática SCRATCH Protein Predictor (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/>) para predecir la formación de los puentes disulfuros, se pudo establecer que oPTI forma 1 puente disulfuro entre la cisteína 41 y la cisteína 87. El mismo resultado fue observado para chPTI (Cys 41-Cys 87).

Estos inhibidores tienen características similares a un tipo de inhibidor denominado, inhibidor de proteasas serínicas de tipo I (Cleveland, 1987), muy similares a los inhibidores de tipo Kunitz.

Otro dato obtenido por el mismo programa predice la solubilidad de la proteína en agua una vez sobreexpresada. Los resultados obtenidos predicen un valor de solubilidad en agua de 80,2% para el oPTI y un valor de 65,7% para el chPTI.



**Figura 35:** Alineamiento múltiple de las secuencias clonadas de la variedad Chacarera (chPTI), la variedad Overa (oPTI) y la secuencia consenso anteriormente formulada perteneciente a la variedad de Imilla Negra (inPTI). Se utilizaron los softwares ClustalOmega y GeneDoc.

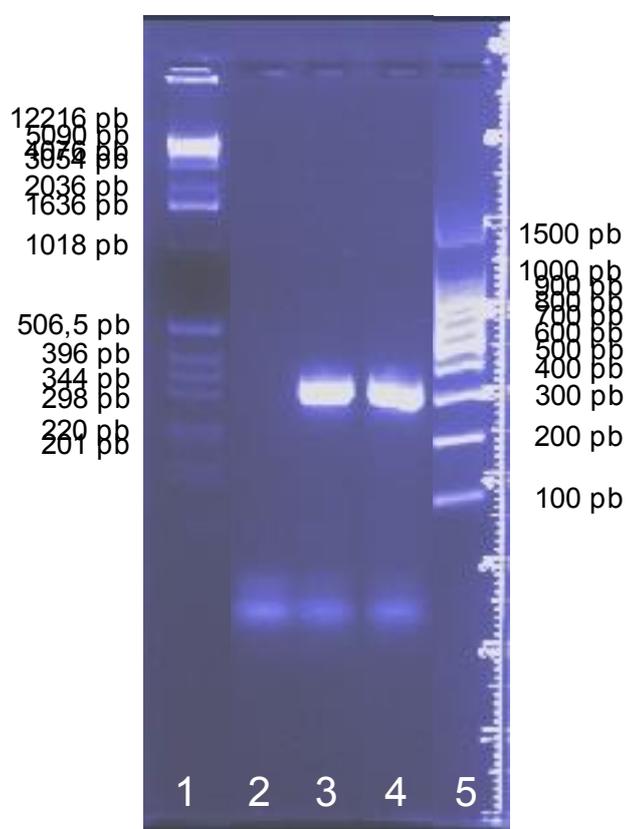
### **B.6 Clonado del oPTI en el vector de expresión pHTP1**

A fin de expresar el oPTI en el sistema de clonado y expresión NZYEasy (ver **Figura 46**, en la sección B.2.1 Metodología) se procedió a la técnica de clonado direccional mediante el agregado de secuencias nucleotídicas que formen “5’ overhangs” simple hebra en la secuencia codificante para el oPTI, con primers diseñados específicamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE B

El fragmento del oPTI se “levantó” del plásmido pNZY28 mediante PCR utilizando primers específicos (ver en Metodología la **Tabla 11**) con secuencias adicionales simple hebra en cada región 5’ de manera de tal de crear fragmentos de PCR con los respectivos 5’ *overhangs* que el sistema precisaba para la ligación con el vector pHTP1.

El producto de la PCR se corrió en una electroforesis en un gel de agarosa al 2% (**Figura 36**). Se observa una banda cercana a los 300 pb, del tamaño esperado para el oPTI. La banda correspondiente al inserto se extrajo del gel y se ligó al vector de expresión pHTP1 (ver en Metodología la sección B.2.1).

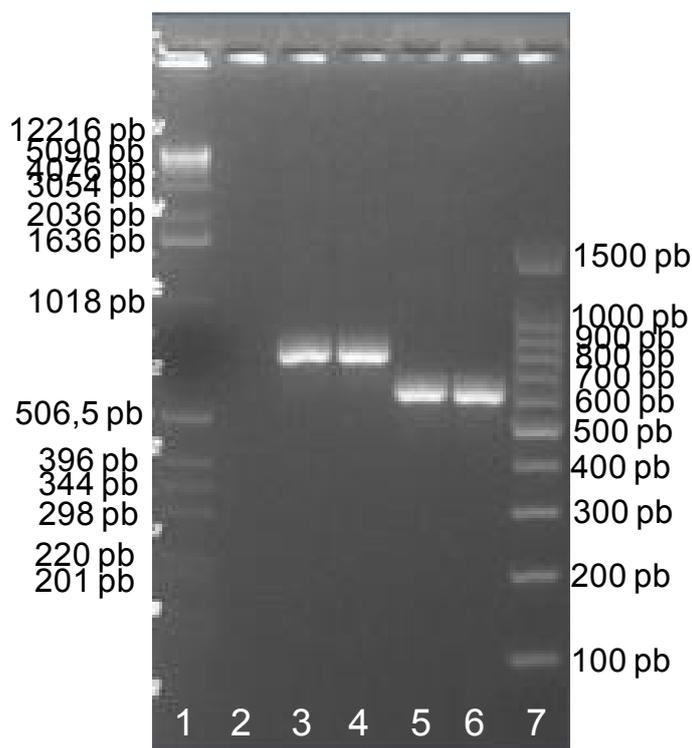


**Figura 36:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR con los nuevos primers específicos para fabricar los 5’ *overhangs* necesarios para clonar en el plásmido pHTP1. El análisis indica que las muestras sembradas en los carriles 1 y 5 corresponden a los patrones moleculares TrackIt 1kb DNA ladder (Invitrogen) (10 uL) y GRS Ladder 100 pb (Grisp) (8 uL) respectivamente. Las colonias recombinantes con el respectivo gen del inhibidor maduro de cada variedad corresponden a los carriles 3 y 4. En el carril 2 se sembró una alícuota del control de la PCR sin muestra alguna.

Con el producto de esta ligación, se transformaron *E. coli* competentes de la cepa BL21 (DE3). Con la finalidad de confirmar la presencia del inserto en estos plásmidos, se

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE B

realizó una amplificación por PCR de minipreparados obtenidos a partir de colonias recombinantes, utilizando los cebadores T7 promoter primer (*Forward*) y T7 terminator primer (*Reverse*), cuyas secuencias rodean el sitio de clonado múltiple, corriente arriba y corriente abajo, respectivamente (ver en Metodología la **Tabla 12**), dentro de la secuencia del plásmido pHTP1. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; en la **Figura 37** se muestra el producto de una de estas reacciones.



**Figura 37:** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del screening rápido de colonias *E.coli* BL21 (DE3), transformadas con el plásmido pHTP1 conteniendo el gen del oPTI, mediante reacciones de PCR con cebadores que hibridan con segmentos del plásmido. El análisis indica que las muestras sembradas en los carriles 1 y 7 corresponden a los patrones moleculares TrackIt 1kb DNA ladder (Invitrogen) (10 uL) y GRS Ladder 100 pb (Grisp) (8 uL) respectivamente. Las colonias recombinantes con el inserto control corresponden a los carriles 3 y 4. En los carriles 5 y 6 se sembró una alícuota del plásmido recombinante de clones con el inserto con la secuencia que codifica para la expresión del oPTI maduro. En el carril 2 se sembró el control negativo de la PCR sin muestra alguna.

En los carriles 3 y 4 se observan las bandas de 800 pb correspondientes a los clones con el inserto control dentro del plásmido, en tanto en los carriles 5 y 6 se observan los insertos correspondientes a los clones con las secuencias que codifican para el oPTI con un tamaño aproximado a los 600 pares de bases aproximadamente, coincidiendo

así con el tamaño esperado para la secuencia codificante para el oPTI (300 pb) teniendo en cuenta además la secuencia del vector por fuera del gen de interés (290 pb, aproximadamente), indicando que estos plásmidos eran recombinantes. Se puede observar lo anteriormente mencionado en el esquema de la **Figura 38**.

```

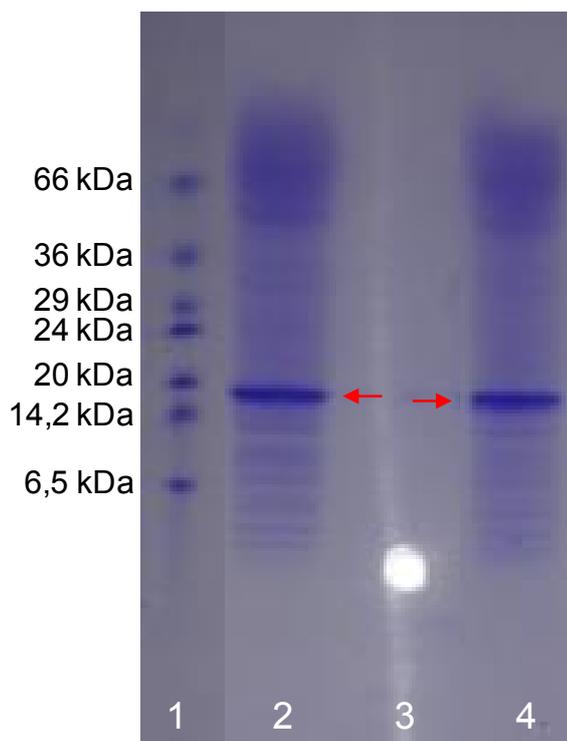
TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGC
GGCCCTCAGCAAGGGCTGAGGATGGAGTCAAAGTTTGCTCACATCATTGTTTTCTTTCTTC
TTGCAACCTCCTTTGAACTCTCTTGGCACGAAAAGAAAGTGATGGACCAGAAGTCATAGA
ACTTCAAAGGAATTTGAATGCAATGGAAAATAAGCTGGCCAGAACTTATTGGTGTACCA
GCACATTATGCTAAGGGAATAATTTAGAAGGAAAATTCCTCATAACTAATGTTTCAGATACT
ACTGAATGGTTCTCCAGTCACAATGGATTATCGTTGTAATCGAGTTCGTCTTTTGATAACA
TTTTGGGTGATGTTGTACAAATTCCTAGGGTGGCTGACCTCAGCTTCCGCTGACCTCAGCT
TCCGCTGAGGTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCT
GAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
CAATAACTAGCATAACC
    
```

**Figura 38:** En la figura se pueden ver las secuencias de los cebadores (sombreados en gris) utilizados en la PCR, que se encuentran dentro de la secuencia nucleotídica del plásmido pHTP1 (sombreado en turquesa). Sombreado en amarillo se pueden apreciar las secuencias 5' *overhangs* añadidas a la secuencia de ADN que codifica para el oPTI en su forma de preproinhibidor (sombreado en verde).

### **B.7 Producción y análisis del oPTI**

#### *B.7.1 Expresión del oPTI*

Se transformaron bacterias de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido recombinante pHTP1 y se indujo la expresión del oPTI cultivando las colonias transformadas en presencia de IPTG (ver en Metodología la sección B.2.2). Se analizó por SDS-PAGE el perfil de proteínas de las células transformadas, después de la inducción de la expresión del oPTI (**Figura 39**).



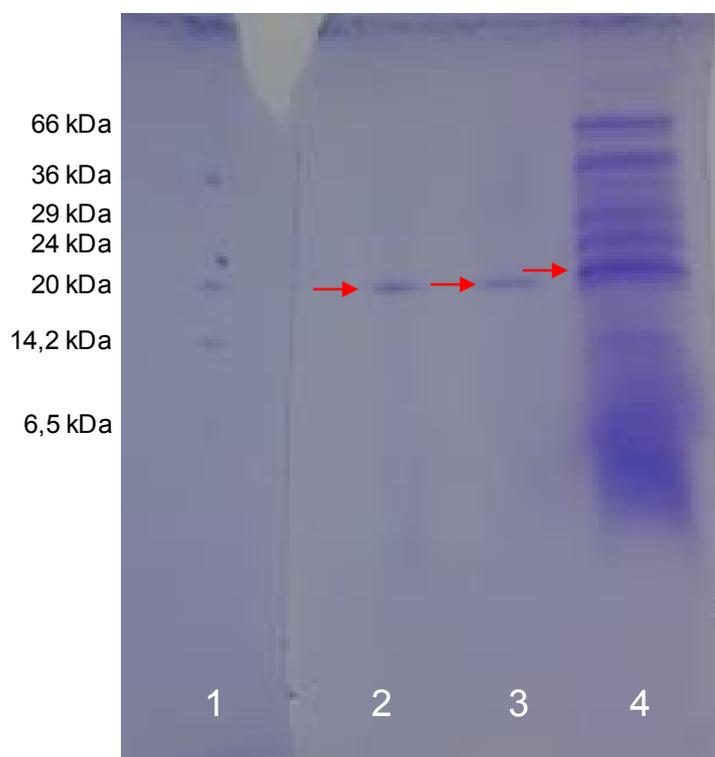
**Figura 39:** Análisis por SDS-PAGE al 16% del sobrenadante de cultivos de *E.coli* de la cepa BL21 transformadas con el plásmido pHTP1 conteniendo la secuencia codificante para el oPTI. Se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra concentrada en tubos AMICON 10K, con 5  $\mu$ L de buffer de muestra 6X y 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego se hirvieron durante 5 minutos y 15  $\mu$ L de la solución resultante se sembraron en cada carril. Carriles: 1) SIGMA marker low ranger (6,5-66 kDa). 2) 15  $\mu$ L de la fracción retenida por el tubo AMICON 10K del sobrenadante de la expresión, con  $\beta$ -mercaptoetanol. 3) 15  $\mu$ L de la fracción no retenida por el tubo AMICON 10K del sobrenadante de la expresión, sin  $\beta$ -mercaptoetanol. 4) 15  $\mu$ L de la fracción retenida por tubo AMICON 10K del sobrenadante de la expresión, sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Se señala con flechas rojas la presencia en el gel del oPTI.

Se puede apreciar en la **Figura 39** que se pudo expresar el oPTI en forma de preproinhibidor. Se llega a esta conclusión debido al peso molecular apreciado en el gel de SDS-PAGE. Al parecer no se pudo procesar fuera de la bacteria con ninguna proteasa y por lo tanto se obtendría un peso de 12 kDa sumado a la secuencia agregada por el vector en el N-terminal, la cual incluye la cola de histidinas (2100 Da aproximadamente); dando como resultado aproximado 14100 Da. Hay que tener en cuenta que los SDS-PAGE no son métodos totalmente exactos para el cálculo de la masa molecular de proteínas. Para justificar esto debería analizarse a futuro con alguna técnica proteómica o se secuenciación proteica.

Además, se probó sobreexpresar el oPTI en casi las mismas condiciones de cultivo, pero sólo haciendo una pequeña modificación; que fue modificar la temperatura a 25°C luego del agregado de IPTG a los 500 mL de cultivo (**Figura 40**).

### B.7.2 Purificación del oPTI

En primera instancia, se realizó una dilución del sobrenadante de la expresión del oPTI (1/10). Luego, se intentó purificar parcialmente el oPTI realizando tratamientos térmicos de 60°C (TT60) y 70°C (TT70) durante una hora a la dilución anteriormente mencionada. Esto se hizo pensando en la resistencia a altas temperaturas que poseen los inhibidores debido a su estructura compacta y pequeño tamaño. Gracias a esta estrategia, se pudo observar mediante posterior análisis por SDS-PAGE, que los sobrenadantes resultantes correspondientes a los diferentes tratamientos mostraron una marcada purificación de la muestra debido a que en el extracto se pudieron separar las proteínas del medio que eran termolábiles. El gel de SDS-PAGE puede observarse en la **Figura 40**.



**Figura 40:** Análisis por SDS-PAGE al 16% de la purificación del oPTI mediante diferentes tratamientos térmicos. Carriles: 1) SIGMA marker low ranger (6,5-66 kDa); 2) TT60; 3) TT70; 4) Fracción retenida del AMICON 10 K del oPTI expresado a 25°C. Se sembraron 10 µL de cada

muestra. Se corrió a 80 volts durante 90 minutos. El buffer de muestra contenía  $\beta$ -mercaptoetanol. Se señala con flechas rojas la presencia en el gel del oPTI.

Pese a la distorsión de la corrida, en el gel de la **Figura 40** se observa una banda que correspondería al oPTI, en los carriles 2 al 4 (señalados con una flecha roja) que contienen alícuotas de las fracciones TT60, TT70 y la fracción retenida por el AMICON 10 K del oPTI expresado a 25°C.

Se puede llegar a la conclusión que claramente no fue mejor la expresión a 25°C del oPTI, comparada con la expresión del mismo a 37°C.

### *B.7.3 Ensayo de inhibición del oPTI frente a tripsina*

La actividad inhibitoria del inhibidor de proteasa fue testado *in vitro* contra tripsina. El sobrenadante de la expresión del oPTI, concentrado en los tubos AMICON 10K hasta llegar a una concentración de 2 mg/mL, demostró actividad inhibitoria. Los tratamientos térmicos (TT60 y TT70) no demostraron inhibición, tal vez debido a que sólo hay poca cantidad de inhibidor en ellos. Más adelante se podría evaluar la actividad de los tratamientos térmicos sin diluir, esto fue debido a que no se contó con suficiente cantidad de muestra.

### PARTE C

#### ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE INHIBIDORES DE PROTEASAS *IN VIVO* EN PLANTAS DE PAPAS

Tal como se nombrara en la sección introductoria sobre el análisis de la expresión de genes de IPPs, la evidencia actual sugiere que dicha producción ocurre mediante la ruta de los octadenanoides, que catalizan la ruptura del ácido linoleico y la formación del ácido jasmónico, induciendo éste la expresión de los IPPs. Todos estos descubrimientos indican que las plantas se defienden por sí mismas, induciendo directamente la expresión de compuestos, como los IPPs, ante el ataque de agentes patógenos. Una defensa efectiva de las plantas contra las plagas depende casi críticamente de la eficacia de los efectores que median la resistencia (Purushottam *et al.*, 2012). Los IPPs no son los únicos compuestos que se liberan en defensa de la planta frente a estrés abiótico y/o biótico, también hay, drogas pleiotrópicas, AJs, ABA, AS, ET, MEJA, defensinas, entre otras. En nuestro caso y con la finalidad de verificar los niveles de expresión de genes de IPPs frente a diferentes situaciones de estrés abiótico se realizó un análisis de expresión de genes de IPPs *in vivo* en vitroplantas de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Overa.

Debido a que estos ensayos fueron preliminares, se debe ajustar la técnica para realizar mejores controles correspondientes al gen de referencia debido a que dichos genes no mostraron la misma cantidad de expresión en los diferentes tratamientos efectuados a las vitroplantas. Además se debe ajustar el número de vitroplantas por cada tratamiento (mínimo 3). Sin embargo, se pudo observar que claramente hay una sobreexpresión del gen correspondiente a un inhibidor de proteasa serínica (**Figura 41 A y B**) cuando la planta es sometida a estrés (en este caso adicionando MeJA y viendo el efecto luego de 48 hs).

En la **Figura 41 A** se observa los niveles de expresión de un gen de referencia (actina) para todas las condiciones, mostrando un nivel basal de expresión en casi todos los casos. A la derecha del mismo gráfico de la **Figura 41 A**, se observa una elevada sobreexpresión de genes de IPPs (sometidos a MeJA) en comparación con los otros tratamientos realizados.

En la **Figura 41 B** se observa la expresión de otro gen que codifica para una proteína ribosomal (18 S). La cuantificación relativa de los valores de expresión del gen de

referencia 18 S mostró niveles aumentados en los tratamientos 2, 11 y 12. A la derecha de dicha figura se observa la sobreexpresión de IPPs en las mismas condiciones.

Muestra 1: Control 0 hs sin tratamiento.

Muestra 2: Disolvente de Metil Jasmonato (MEJA) por 24 hs.

Muestra 4: MEJA por 24 hs.

Muestra 6: Agujas descartables originando heridas en las hojas por 24 hs.

Muestra 7: Tratamiento 2 y 6.

Muestra 8: Agujas descartables originando heridas en las hojas y MEJA por 24 hs.

Muestra 9: Disolvente de MEJA por 48 hs.

Muestra 10: MEJA por 48 hs.

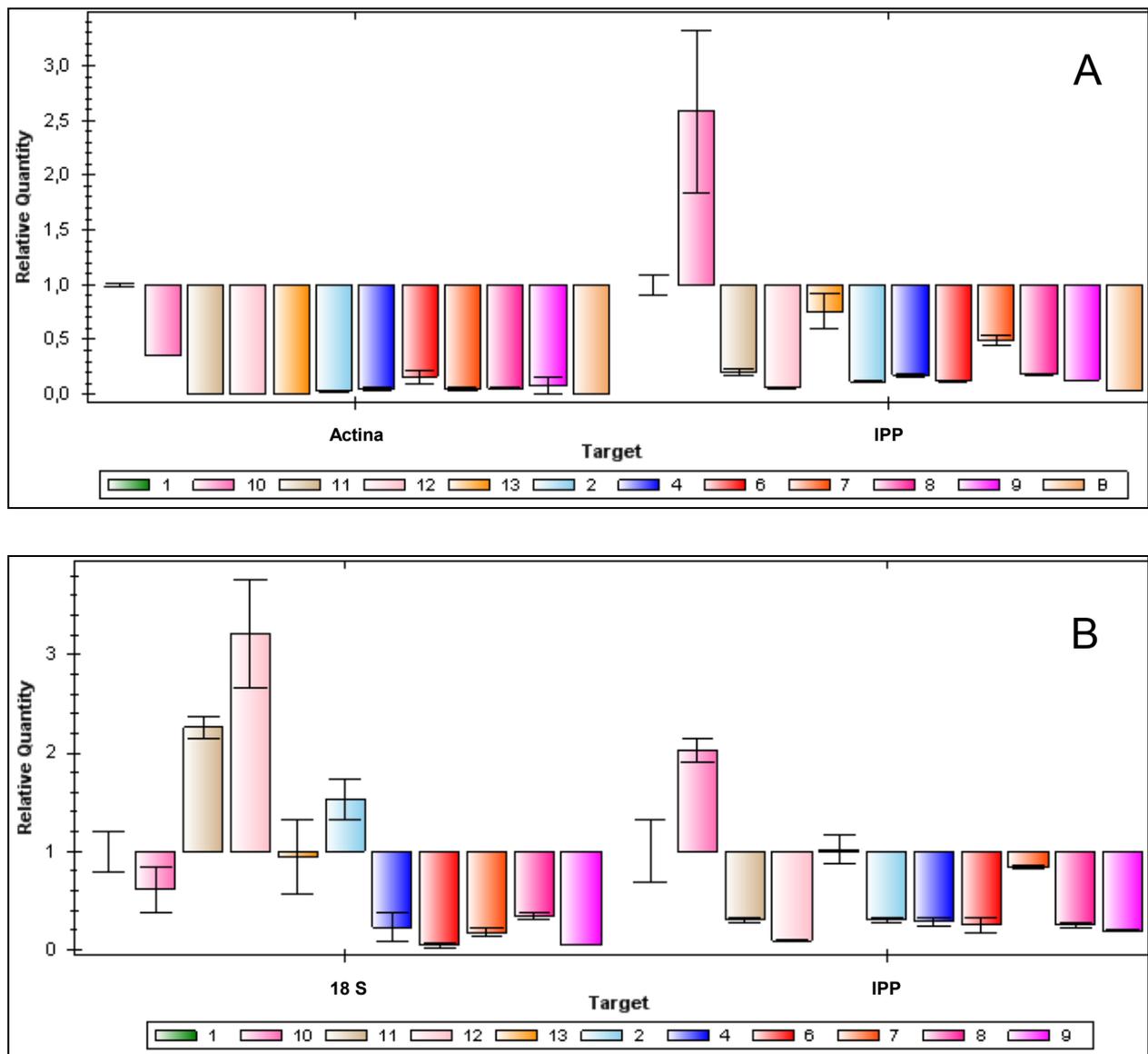
Muestra 11: Agujas descartables originando heridas en las hojas por 48 hs.

Muestra 12: Tratamiento 9 y 11

Muestra 13: Tratamiento 10 y 11.

Todos los resultados correspondientes a la expresión de genes fueron relativizados respecto a la muestra 1 (control sin tratamiento alguno). La expresión de ambos genes en lo que respecta a la muestra 10 (correspondiente a la planta expuesta a MeJA y analizada 48 hs después) es claramente mayor, entre 2,6 veces más que la muestra control para el gen del inhibidor (**Figura 41 A**).

En la **Figura 41 B**, la expresión del gen de la proteína ribosomal del ARN 18 S en las muestras 2, 11 y 12 son claramente mayor que el mismo gen en la muestra 10. La expresión del gen que codifica para el inhibidor de proteasas serínicas es el doble, comparando con la muestra control sin tratamiento alguno. Los números anteriormente mencionados se pueden apreciar en las **Tablas 5 y 6**.



**Figura 41:** Resultados de la qPCR. A) Se observa una mayor expresión de genes de IPPs en la muestra 10, comparado con la expresión del gen de actina en la misma muestra. B) En éste gráfico, la expresión del gen de referencia de la proteína ribosomal 18S mostró niveles aumentados en los tratamientos 2, 11 y 12, pero se observa mayor expresión también en los genes de IPPs de la muestra 10.

En las abscisas se pueden observar las 11 diferentes muestras con distintos tratamientos cada una respecto a los genes de referencia (actina y la proteína del ARN 18S). En las ordenadas se puede observar la cantidad relativa respecto a la muestra 1 (control sin tratamiento alguno).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE C

**Tabla 5:** En rojo se muestra la sobreexpresión del gen que dió una diferencia significativa respecto a la expresión del mismo gen en las muestras control (sin tratamiento). El gen de referencia en este caso es actina. La muestra B, significa el blanco de la qPCR.

Target	Muestra	Ctrl	Cantidad Relativa	Cantidad Relativa SEM	Cantidad Relativa Corregida SEM	Mean Cq	Cq SEM
Actin	1	*	1,00000	0,01846	0,01846	24,12	0,02664
Actin	10		0,34830	0,00000	0,00000	25,64	0,00000
Actin	11		0,00000				
Actin	12		0,00000				
Actin	13		0,00000				
Actin	2		0,02678	0,01299	0,01299	29,34	0,69973
Actin	4		0,04478	0,01561	0,01561	28,60	0,50279
Actin	6		0,15728	0,06521	0,06521	26,79	0,59815
Actin	7		0,05013	0,02036	0,02036	28,44	0,58598
Actin	8		0,05406	0,00870	0,00870	28,33	0,23232
Actin	9		0,07244	0,07762	0,07762	27,91	1,54582
Actin	B		0,00000				
inib	1	*	1,00000	0,08996	0,08996	24,42	0,12978
<b>inib</b>	<b>10</b>		<b>2,58445</b>	<b>0,73960</b>	<b>0,73960</b>	<b>23,05</b>	<b>0,41286</b>
inib	11		0,20192	0,03056	0,03056	26,73	0,21837
inib	12		0,06106	0,00859	0,00859	28,45	0,20299
inib	13		0,75630	0,16398	0,16398	24,82	0,31281
inib	2		0,11421	0,00552	0,00552	27,55	0,06968
inib	4		0,17178	0,01793	0,01793	26,96	0,15055
inib	6		0,12116	0,00600	0,00600	27,46	0,07143
inib	7		0,49115	0,04915	0,04915	25,44	0,14438
inib	8		0,18073	0,00296	0,00296	26,89	0,02359
inib	9		0,13085	0,00058	0,00058	27,35	0,00635
inib	B		0,02826	0,00000	0,00000	29,56	0,00000

**Tabla 6:** En rojo se muestra la sobreexpresión del gen que dió una diferencia significativa respecto a la expresión del mismo gen en las muestras control (sin tratamiento). El gen de referencia en este caso es el gen que codifica para el ARN 18S. La muestra B, significa el blanco de la qPCR.

Target	Muestra	Ctrl	Cantidad Relativa	Cantidad Relativa SEM	Cantidad Relativa Corregida SEM	Mean Cq	Cq SEM
18 S	1	*	1,00000	0,20440	0,20440	22,62	0,29489
18 S	10		0,61475	0,23073	0,23073	23,33	0,54148
18 S	11		2,25890	0,10728	0,10728	21,45	0,06852
18 S	12		3,21257	0,55095	0,55095	20,94	0,24742

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE C

18 S	13		0,94813	0,38006	0,38006	22,70	0,57831
18 S	2		1,53345	0,20462	0,20462	22,01	0,19251
18 S	4		0,22974	0,14117	0,14117	24,75	0,88652
18 S	6		0,04378	0,02039	0,02039	27,14	0,67198
18 S	7		0,17749	0,04701	0,04701	25,12	0,38213
18 S	8		0,34092	0,02915	0,02915	24,18	0,12336
18 S	9		0,04852	0,00152	0,00152	26,99	0,04526
18 S	B		0,00000				
inib	1	*	1,00000	0,31399	0,31399	26,61	0,45299
<b>inib</b>	<b>10</b>		<b>2,02350</b>	<b>0,11874</b>	<b>0,11874</b>	<b>25,59</b>	<b>0,08466</b>
inib	11		0,30476	0,02527	0,02527	28,33	0,11961
inib	12		0,08777	0,00909	0,00909	30,12	0,14950
inib	13		1,02062	0,14349	0,14349	26,58	0,20283
inib	2		0,30182	0,02002	0,02002	28,34	0,09571
inib	4		0,28419	0,04265	0,04265	28,43	0,21650
inib	6		0,25314	0,07942	0,07942	28,59	0,45265
inib	7		0,83748	0,01689	0,01689	26,87	0,02910
inib	8		0,25108	0,03159	0,03159	28,61	0,18150
inib	9		0,19397	0,01094	0,01094	28,98	0,08137
inib	B		0,00000				

En conclusión, se ha diseñado un ensayo utilizando PCR en tiempo real para estudiar la expresión de genes de IPPs implicados en la defensa de las plantas. Se han optimizado los oligonucleótidos y las condiciones adecuadas para realizar PCR en tiempo real y obtener así una cuantificación óptima de la expresión de genes de IPPs.

Por otro lado, nuestro estudio sugiere un rol emergente en el estudio de la expresión génica de IPPs de papas andinas frente a estrés abiótico (mediado por MEJA) debido a que estos resultados indican que existe una diferencia significativa en los niveles de mRNA para las plantas tratadas con MEJA durante 48 hs.

### PARTE D

#### ENSAYOS ANTIMICROBIANOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PAPAS

Tal como se expresó en la sección introductoria, los resultados preliminares hallados de las actividades antimicrobianas de IPPs extraídos de la familia *Solanaceae*, incluyendo las especies *tuberosum* y *lycopersicum*, entre otras, ha propiciado la investigación de estas actividades en nuestro material de estudio, *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* (papas andinas). Dentro de esta familia y especie, los IPPs serínicos son los más estudiados en cuanto a la búsqueda de dichas actividades.

A continuación se presentan los resultados preliminares de actividades antimicrobianas realizadas con:

- a) Extractos semipuros de Imilla Negra
- b) Extractos semipuros de Churqueña, Sacampaya roja y Malcacha
- c) oPTI recombinante

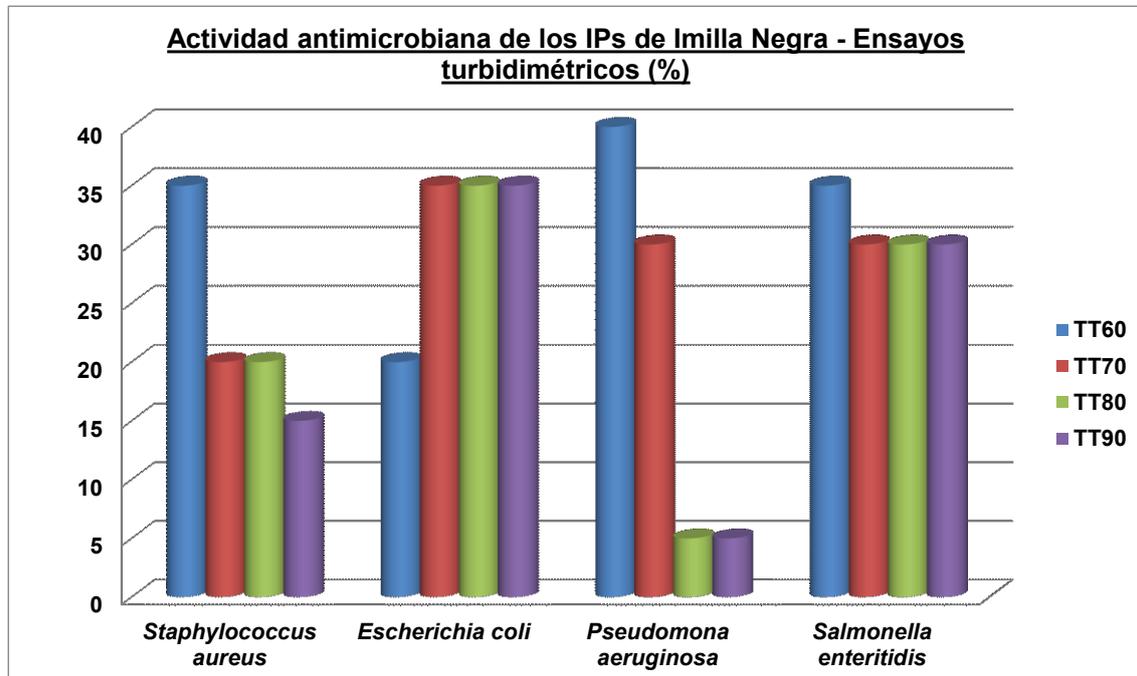
#### **D.1 Ensayos microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana de los IPPs de los extractos semipuros de papas andinas (Imilla Negra)**

##### *D.1.1 Efecto inhibitorio de extractos de Imilla Negra sobre el crecimiento de bacterias*

Con el fin de aportar mayor conocimiento en el estudio de los extractos parcialmente purificados de Imilla Negra, aportados en la sección 1, se realizaron diferentes ensayos de actividad antimicrobiana. Se estudió el efecto de los extractos crudos de papas andinas de la variedad Imilla Negra sobre la multiplicación celular de algunas bacterias. El porcentaje de inhibición bacteriano en ausencia o en presencia del compuesto en estudio se realizó por turbidimetría midiendo la densidad óptica a 600 nm (**Figura 42**). Se encontró que los extractos con tratamiento térmico a 60°C (TT60), con una concentración protéica de 121 µg/mL, presentaron un efecto inhibitorio entre el 20 y el 40% de las cepas estudiadas, sin embargo a mayores temperaturas el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D

efecto inhibitorio de los IPPs disminuía cuando se ensayaba frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (18% en TT70 y TT80) y (5% en TT80) *Pseudomona aeruginosa*.



**Figura 42:** Gráfico comparativo de las actividades antimicrobianas de los TTs de Imilla Negra frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

Del análisis de los resultados, surge como observación que los extractos de papas andinas de la variedad Imilla Negra con TT60 presentaron efecto inhibitorio del 35% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* y del 40% frente a *Pseudomona aeruginosa*. Por otro lado, los TT70, TT80 y TT90 mostraron un 35% de efecto inhibitorio frente a cepas de *Escherichia coli*.

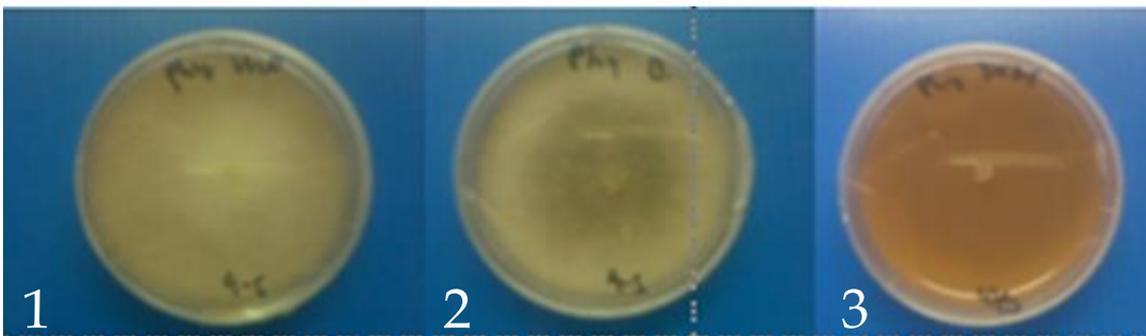
Estos resultados preliminares deberán ser optimizados en futuros estudios, de modo de aumentar la concentración de inhibidores en las muestras para alcanzar la posible inhibición total de las cepas en estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D

### D.1.2 Efecto inhibitorio de los extractos semipuros de *Imilla Negra* sobre el desarrollo micelial de cultivos de *Phytophthora capsici*

Posteriormente se evaluó el efecto de los extractos crudos de papas andinas de la variedad *Imilla Negra* sobre el desarrollo micelial del pseudohongo fitopatógeno elegido.

*Phytophthora capsici* es un oomicete patógeno de plantas que causa el tizón tardío y la pudrición de plantas de pimientos y otros cultivos comerciales de importancia agronómica. El estudio de la posible inhibición del desarrollo micelial de estos hongos se realizó en primer lugar en medio de cultivo V8 sin embargo no se obtuvieron buenos resultados de inhibición en estos medios. Por este motivo se realizaron los bioensayos de inhibición en medio líquido. Para ello se colocaron discos de agar cortados con sacabocados, con crecimiento de micelio de la cepa en agua, en buffer Tris/HCl de pH 8,0 y en solución de TT60. Se incubaron las muestras durante 10 días y se evaluó luego la viabilidad celular colocando un disco proveniente del ensayo anterior en el centro de una placa de Petri con el medio de cultivo correspondiente. Al analizar el efecto *in vitro* de los extractos sobre los cultivos de *Phytophthora capsici* se observó inhibición del crecimiento del hongo en la muestra de IPPs que recibieron tratamiento térmico a 60°C (**Figura 43**).



**Figura 43:** Cultivos de *Phytophthora capsici* incubados durante 10 días. El tratamiento 1 corresponde a una preincubación del disco con micelio fúngico en agua; el tratamiento 2 a una solución 0,1 M de buffer Tris-HCl pH 8,0 y el 3 en una solución de extractos crudos de IPPs de papas andinas tratadas térmicamente a 60°C. En los tratamientos 1 y 2 se observa una coloración blanco amarillenta debido al contraste que genera el medio V8 junto al crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*. En cambio, el tratamiento 3 presenta una coloración de fondo color naranja correspondiente sólo al medio V8, aquí no se observa crecimiento fúngico.

Como conclusión de estos bioensayos podemos afirmar que los extractos crudos de inhibidores de proteasas de papas andinas sometidos a tratamiento térmico a 60°C ejercen un fuerte efecto fungicida sobre cepas de *Phytophthora capsici* (**Figura 43, 3**) ya que no se observa crecimiento del micelio contenido en el disco que fue incubado previamente en la solución de TT60. En oposición y para confirmar esta actividad biológica, se observó desarrollo miceliar en los discos que fueron incubados en agua estéril y en la solución buffer, empleadas como muestras control.

### **D.2 Determinación del % de inhibición del crecimiento microbiano mediante recuento en placa de distintas variedades de papas andinas**

En otro experimento, se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de papas andinas con tratamiento térmico a 60°C correspondientes a las variedades Churqueña, Sacampaya Roja y Malcacha. Churqueña y Sacampaya Roja produjeron inhibición moderada del orden del 40% sobre cepas de *Escherichia coli*, sin embargo el mayor efecto inhibitorio lo produjo la variedad Malcacha (80%). Al evaluar la inhibición producida sobre cepas de *Salmonella enteritidis* se encontró que la variedad Churqueña no presentó actividad inhibitoria pero los extractos de las otras variedades mostraron un escaso efecto. En forma similar, el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* no fue inhibido por la variedad Malcacha pero las variedades Churqueña y Sacampaya Roja mostraron una actividad antimicrobiana significativa (80%). Finalmente, el efecto de inhibición más significativo fue producido por los extractos de las tres variedades sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas (95 – 100%). Se puede observar en el esquema de la sección D.1.2 de Metodología, el procedimiento realizado para el recuento en placa y en la **Tabla 7**, se pueden observar los resultados del ensayo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D

**Tabla 7:** Ensayo de recuento en placa de las UFCs correspondiente a los 4 tipos de bacterias ensayadas *Escherichia coli* (E.c.), *Salmonella enteritidis* (S.e.), *Staphylococcus aureus* (S.a.), *Pseudomona aeruginosa* (P.a.), en los extractos crudos TT60 y sin tratar. Los ensayos se realizaron con las variedades Churqueña (CH), variedad Sacampaya Roja (SR) y variedad Malcacha (M).

Especie + tratamiento	E.c. control	% de crecimiento	E. c. + TT60 CH	% de crecimiento	E. c. + TT60 SR	% de crecimiento	E. c. + TT60 M	% de crecimiento
Nº de colonias	629	629 colonias = 100%	387	60	381	60	133	20
	incontables		mas de 650	100	261	40	103	15
Especie + tratamiento	S.e. control	% de crecimiento	S.e. + TT60 CH	% de crecimiento	S.e.+ TT60 SR	% de crecimiento	S.e + TT60 M	% de crecimiento
Nº de colonias	473	650 colonias = 100%	527	100	422	65	275	40
	mas de 650		mas de 650	100	439	70	340	50
Especie + tratamiento	S.a. control	% de crecimiento	S.a. + TT60 CH	% de crecimiento	S.a.+ TT60 SR	% de crecimiento	S.a.+ TT60 M	% de crecimiento
Nº de colonias	14	800 colonias = 100%	0	0	3	0	39	5
	mas de 650		307	40	30	5	40	5
Especie + tratamiento	P.a. control	% de crecimiento	P.a. + TT60 CH	% de crecimiento	P.a.+ TT60 SR	% de crecimiento	P.a.+ TT60 M	% de crecimiento
Nº de colonias	mas de 650	800 colonias = 100%	109	15	181	20	mas de 650	100
	mas de 650		mas de 400	60	mas de 400	60	mas de 650	100

Estos resultados preliminares, fundamentalmente la inhibición producida sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* son muy promisorios y podrían contribuir a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal con potencial aplicación en el área de la salud, en el sector agronómico y/o en la industria de los alimentos (Ayensa *et al.*, 2002).

### **D.3 Ensayos microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana del nuevo inhibidor obtenido en forma recombinante (oPTI)**

#### *D.3.1 Ensayos antimicrobianos mediante halos de inhibición*

Estos ensayos tal como se describe en Metodología sección D.1.4 fueron realizados debido a que se disponía de una buena concentración de inhibidor recombinante (oPTI), propiciando una mejor visualización de la inhibición en superficie de la placa de crecimiento. Esta técnica generalmente es utilizada para los análisis de rutina en laboratorios de bioquímica clínica o de análisis clínicos donde se usa el antibiograma para evaluar la inhibición de crecimiento que ejercen determinados antibióticos sobre cepas patógenas. En la misma se utilizan discos conteniendo antibióticos en una concentración conocida y se los deposita en la superficie del agar, con medio de cultivo, conteniendo las

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D

bacterias sembradas. Se incubó por 24 hs a 37°C y se evalúan los halos de inhibición del crecimiento para evaluar si hay o no actividad antimicrobiana.

Los ensayos fueron realizados de la siguiente manera: Se depositaron 10 µL de oPTI recombinante en la superficie de placas de petri conteniendo agar TSA y las cepas bacterianas patógenas mostradas en la **Tabla 8** y las fotos de los halos de inhibición se pueden apreciar en la **Figura 44**.

**Tabla 8:** Actividad antimicrobiana del oPTI, medio de cultivo y temperatura de incubación de las cepas indicadas. -, sin zona de inhibición; +, 1 mm < zona < 5 mm; ++, zona > 5 mm. ESB — Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal; NCTC — National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory Service, London, UK; ATCC — American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

ORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA	ACTIVIDAD
<b>Gram negativos</b>		
<i>Salmonella braenderup</i>	TSA, 37°C	++
<i>Salmonella enteritidis</i> NCTC 5188	TSA, 37°C	+
<i>Salmonella tiphymurium</i> IPIMARSD 28	TSA, 37°C	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	TSA, 37°C	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ESB 03	TSA, 37°C	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TSA, 37°C	-
<i>Proteus vulgaris</i>	TSA, 37°C	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ref	TSA, 37°C	++
<i>Yersinia enterocolitica</i>	TSA, 37°C	-
<i>Proteus spp (mirabilis)</i>	TSA, 37°C	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (sensible)	TSA, 37°C	++
<i>Acinetobacter baumannii</i> (resistente)	TSA, 37°C	++
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (resistente)	TSA, 37°C	++
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (sensible)	TSA, 37°C	++
<b>Gram positivos</b>		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	TSA, 37°C	-

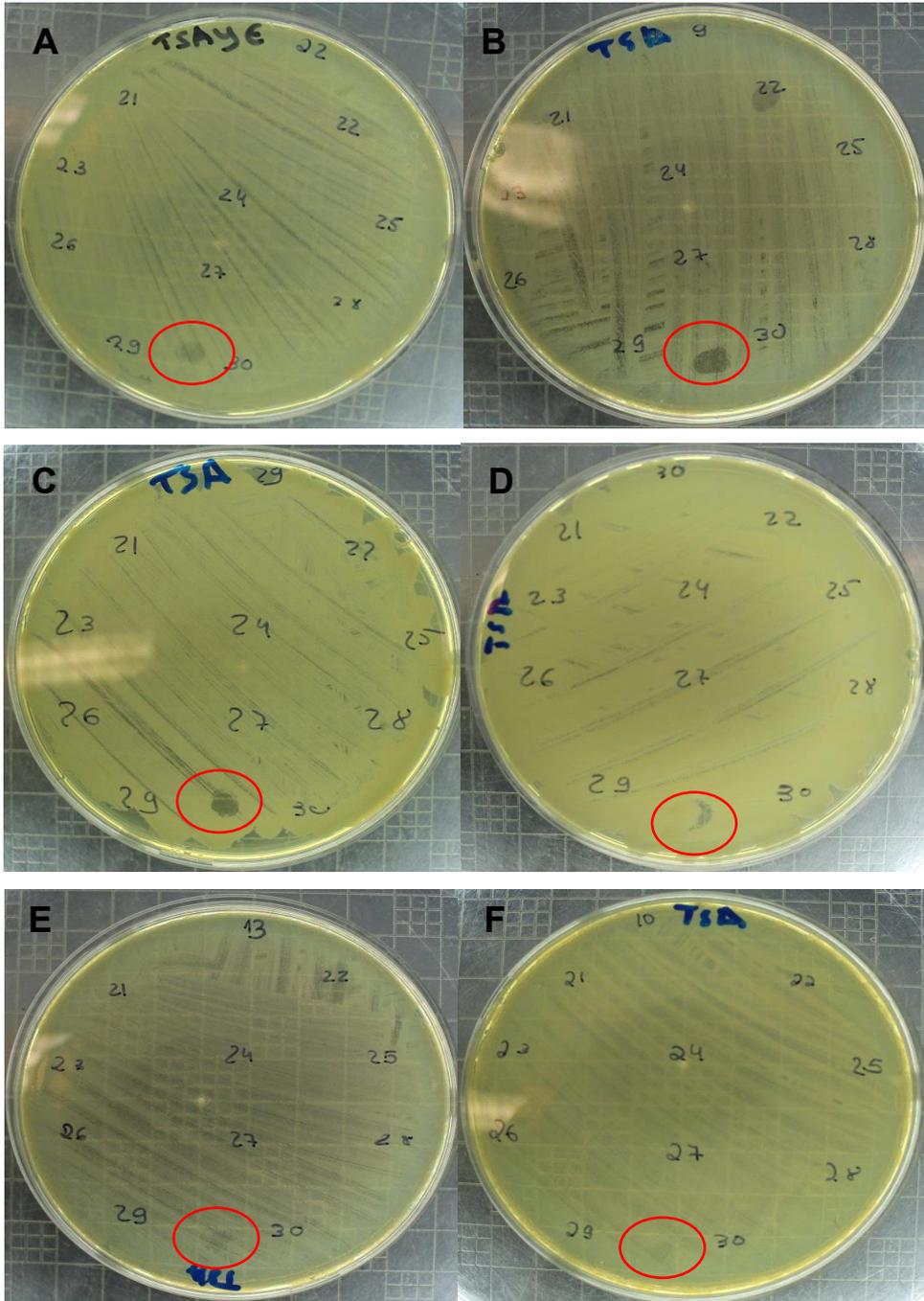
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D

<i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 12956	TSA, 37°C	-
<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ 13590	TSA, 37°C	-
<i>Enterococcus flavescens</i> DSMZ 7370	TSA, 37°C	-
<i>Enterococcus gallinarum</i> DSMZ 20628	TSA, 37°C	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i> DSMZ 20680	TSA, 37°C	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	TSA, 37°C	-
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 3610	TSA, 37°C	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	TSA, 37°C	++
<i>Listeria monocytogenes</i> 7946	TSA, 37°C	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 7947	TSA, 37°C	-
<i>Listeria innocua</i> 2030 C	TSA, 37°C	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 18 N (mrsa)	TSA, 37°C	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2037 M1 (MSSA)	TSA, 37°C	-
<i>Staphylococcus aureus aureus</i> ATCC 29213	TSA, 37°C	-
<b>Hongos</b>		
<i>Candida albicans</i>	TSA, 37°C	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	TSA, 37°C	-

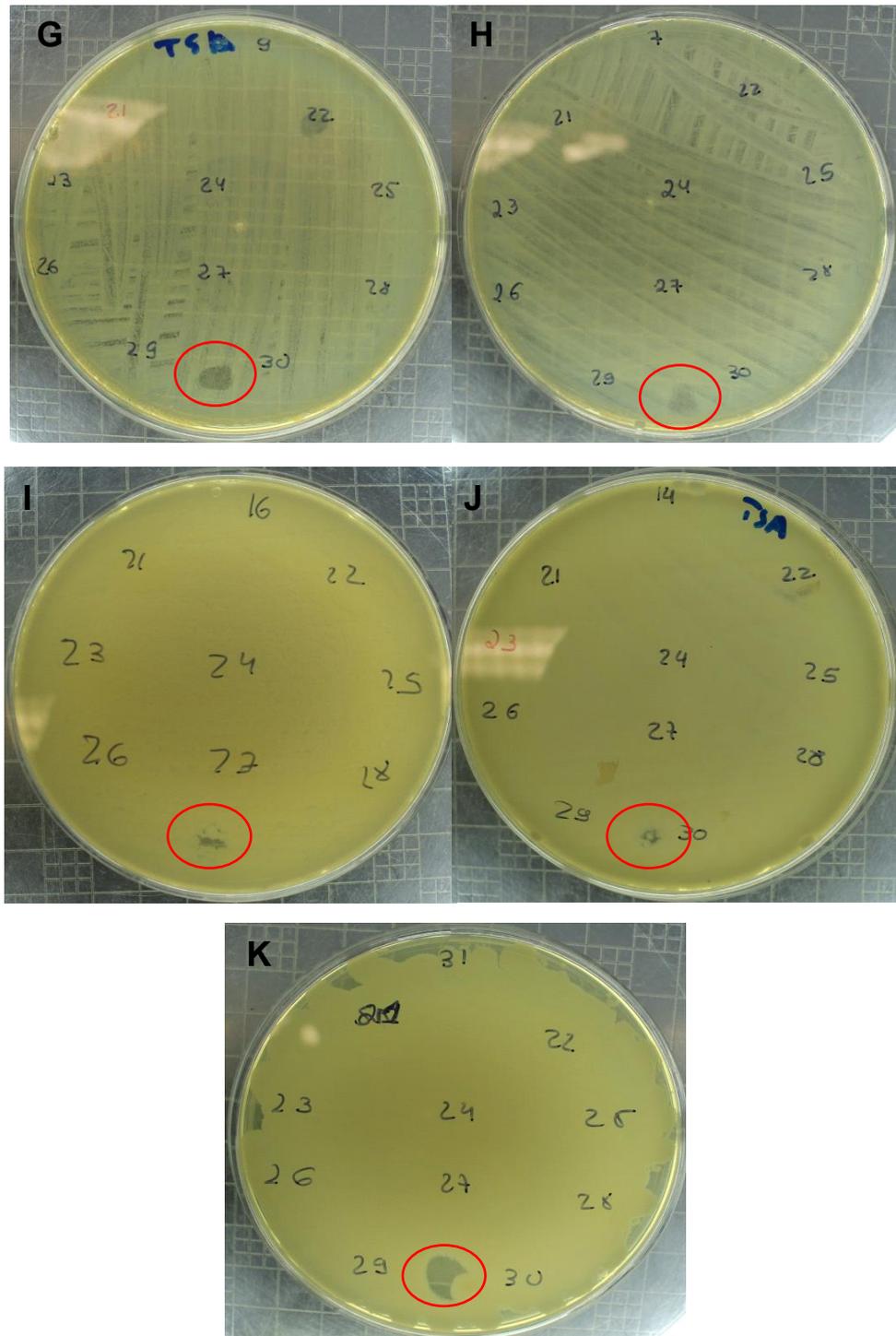
En la **Figura 42** se observa el crecimiento de cada bacteria en placa, donde fueron depositadas diferentes muestras ajenas a nuestro trabajo. Como se trata de un “screening inicial” utilizando el oPTI expresado en las últimas instancias del trabajo de tesis, se pretende mostrar las inhibiciones visualmente, con el objeto de comparar con otras muestras de investigación clínica que no han dado inhibición.

Como perspectiva de trabajo a futuro se plantea profundizar estos ensayos para que sean estadísticamente reproducibles y publicables en revistas de interés biotecnológico.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PARTE D



**Figura 44:** Cultivos de los microorganismos crecidos en contacto con el oPTI luego de 24 hs. Los halos de inhibición se pueden apreciar (remarcados con un círculo rojo) donde fue colocada la muestra (oPTI, 10  $\mu$ L a una concentración de 2 mg/mL). En la figura se pueden observar halos de inhibición en los siguientes microorganismos: A) *Yersinia enterocolitica* de referencia, B) *Pseudomona aeruginosa* ESB 03, C) *Bacillus stearothermophilus*, D) *Escherichia coli* ATCC 8739, E) *Acinetobacter baumannii* (sensible), F) *Acinetobacter calcoaceticus* (resistente), G) *Acinetobacter calcoaceticus* (sensible), H) *Acinetobacter baumannii* (resistente), I) *Salmonella braenderup*, J) *Salmonella enteritidis* NCTC 5188 y K) *Salmonella tiphymurium* IPIMARSD 28. Los

sitios donde están los números indican el lugar donde se han sembrado controles y otras muestras de investigación clínica.

Según la **Tabla 8** y lo que se puede observar en las placas de la **Figura 44**, las bacterias mayormente afectadas por el oPTI son las bacterias gram negativas.

Estos resultados preliminares confirman los datos obtenidos con los extractos parcialmente purificados por tratamientos térmicos y también son acordes con varios de los datos encontrados en bibliografía en los últimos años (Shamsi *et al.*, 2016; Paik, 2016; Macedo, 2016; Habib *et al.*, 2016; Kumar, 2016; Silva de Brito *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2014; Clemente *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2012; Shilpa Satheesh *et al.*, 2010) que hacen referencia a la inhibición del crecimiento bacteriano de muchos IPPs de origen vegetal.

Los resultados preliminares relacionados con la actividad antimicrobiana de los IPPs alientan el estudio de este tipo de biomoléculas como posibles aditivos de origen natural para la conservación de alimentos, propuesta realizada en el plan de tesis doctoral actual.

# **METODOLOGÍA**

## **PARTE A**

### **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE IPPs**

#### **A.1 Preparación de los extractos crudos**

Como material de partida se emplearon tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* de las variedades Imilla Negra, Sacampaya Roja, Malcacha y Churqueña.

Los tubérculos se pelaron y trituraron en presencia de ditioneitol (DTT) 0,2 mM en frío para prevenir la oxidación por polifenoles (Obregón *et al.*, 2012; Anderson, 1968). El homogenato resultante se incubó por 30 min a 4°C para sedimentar el almidón y luego se centrifugó el sobrenadante en forma diferencial a 2500 y 10000 g por 60 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo (EC). La concentración de proteínas de los extractos crudos se estimó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **A.2 Determinación de actividad inhibitoria de proteasas**

##### *A.2.1 Detección de inhibidores de proteasas de los principales grupos mecanísticos*

Con el fin de poder detectar inhibidores de proteasas de distintos grupos catalíticos, se evaluó la actividad enzimática de proteasas modelo tales como tripsina, papaína, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, subtilisina y quimotripsina, en ausencia y presencia de los extractos crudos (ECs) de inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs). Para cada ensayo se establecieron los tiempos de incubación entre la enzima y su inhibidor y luego se determinaron las actividades de inhibición proteolíticas específicas frente a cada proteasa, incluyéndose los controles de enzima y sustrato correspondientes.

La actividad inhibitoria fue estimada como la actividad proteolítica residual en presencia del inhibidor y expresada como porcentaje de inhibición (I%), respecto del ensayo control, utilizando la siguiente ecuación:

$$I (\%) = [(T-T^*)/T] \times 100$$

Donde T\* y T son las respectivas actividades de proteasa con y sin el inhibidor.

### A.2.2 Determinación de actividad de serín proteasas

#### *Tripsina:*

Para la determinación de la actividad de proteasas serínicas, se empleó Tripsina Tipo I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich). El ensayo se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 conteniendo CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mM, utilizando una concentración de enzima de 2,8x10<sup>-7</sup> M y como sustrato una solución de N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida (BAPNA) 10 mM.

#### *Subtilisina:*

Se evaluó también la actividad de Subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Fluka). El ensayo se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 50 mM conteniendo 10% DMSO pH 8,60; utilizando una concentración de enzima de 2,8x10<sup>-7</sup> M y como sustrato una solución de Z-Gly-Gly-Leu-pNA (GLPNA) 10 mM.

#### *Quimotripsina:*

Se empleó luego Quimotripsina Tipo II de páncreas bovino (Sigma). El ensayo se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 conteniendo CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 50 mM, utilizando una concentración de enzima de 2,8x10<sup>-7</sup> M y como sustrato una solución de N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa 10 mM.

En todos los casos la actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm por el lapso de 300 segundos a 37°C

### A.2.3 Determinación de actividad inhibitoria de serín proteasas

Para la determinación de actividad inhibitoria de los casos anteriores (tripsina, subtilisina, quimotripsina), primero se preincubó la mezcla de reacción sin sustrato y con diferentes muestras de IPPs durante 5 minutos, luego se agregó

sustrato y la actividad inhibitoria fue registrada por un retraso en el aumento de la absorbancia a 410 nm por el lapso de 300 segundos a 37°C.

Los ECs con IPPs que mostraron actividad inhibitoria sobre tripsina, fueron también evaluados frente a Subtilisina y Quimotripsina ya que se ha informado en la bibliografía que estos inhibidores podrían estar involucrados en ciertas parasitosis (Qiu Yuling *et al.*, 2013).

### *A.2.4 Determinación de actividad inhibitoria de cisteín proteasas*

Para analizar la actividad inhibitoria de proteasas cisteínicas se utilizó la enzima Papaína de *Carica papaya* (Roche). El ensayo se llevó a cabo en buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,50, con el agregado de KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM, utilizando una concentración de enzima de  $4,5 \times 10^{-8}$  M y como sustrato una solución de L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA) 4 mM. Primero se preincubó la mezcla de reacción sin sustrato y con diferentes muestras de IPPs durante 5 minutos, luego se agregó sustrato y la actividad fue registrada por un retraso en el aumento de la absorbancia a 410 nm por el lapso de 300 segundos a 37°C con respecto a la proteasa con sustrato sin inhibidor.

### *A.2.5 Determinación de actividad de metalocarboxipeptidasas*

Carboxipeptidasa A:

Se evaluó actividad Carboxipeptidasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich) en concentración  $7,0 \times 10^{-9}$  M en buffer Tris-HCl 0,1 M; pH 7,50; conteniendo NaCl 0,2 M, frente al sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, 10 mM.

Carboxipeptidasa B:

Se utilizó Carboxipeptidasa B de páncreas porcino (Calbiochem) en concentración  $7,0 \times 10^{-9}$  M en buffer Tris-HCl 0,1 M; pH 7,50; con NaCl 0,2 M y sustrato una solución de N-(4-Methoxyphenylazoformyl)-Arg-OH HCl, 10 mM.

### *A.2.6 Actividad inhibitoria de CPA y CPB*

Los ECs con IPPs que mostraron actividad inhibitoria sobre Carboxipeptidasa A fueron también evaluados frente a Carboxipeptidasa B, inhibidor vinculado a cáncer y varias enfermedades neurodegenerativas.

En ambos casos (CPA y CPB), primero se preincubó la mezcla con la muestra de EC con IPPs sin sustrato durante 5 minutos, luego se agregó sustrato y se registró la actividad inhibitoria mediante la disminución del descenso de la absorbancia a 350 nm durante 300 segundos a 37°C con respecto al control con proteasa en presencia de sustrato y en ausencia de inhibidor.

### **A.3 Tratamiento térmico del extracto crudo**

Para poder aislar inhibidores de bajo peso molecular en los ECs de las distintas variedades de papas andinas estudiadas (Imilla Negra, Sacampaya Roja, Malcacha y Churqueña), se realizó un tratamiento térmico como estrategia inicial de purificación parcial de estos extractos. Las muestras fueron tratadas térmicamente a 60°C, 70°C, 80°C y 90°C durante 1 hora. Luego se centrifugaron durante 90 min a 10000 g (4°C). Los sobrenadantes obtenidos se denominaron TT60, TT70, TT80 y TT90.

### **A.4 Concentración y Purificación del extracto crudo**

#### *A.4.1 Separación y concentración por centrifugación con tubos Amicon con membrana de corte de 3 y 10 kDa*

Se realizó la centrifugación de las muestras TT60 de las variedades Sacampaya Roja y Malcacha en tubos Amicon con membranas de corte de 3 kDa (0,5; 4 y 25 mL) y 10 kDa (4 y 25 mL). Las fracciones superiores retenidas por las membranas y las inferiores no retenidas por las mismas fueron recolectadas y almacenadas a -20°C. Se realizó el mismo procedimiento con la fracción TT60, TT70 y TT80 de las variedades Imilla Negra, Malcacha y Sacampaya Roja logrando de este modo concentrar eficientemente los

inhibidores de tripsina contenidos en el extracto. Se midió luego la actividad inhibitoria sobre tripsina de los retenidos por las membranas.

## **A.5 Caracterización de los extractos crudos**

### *A.5.1 Efecto del pH sobre la actividad inhibitoria de los ECs*

Para estimar la actividad inhibitoria a distintos pHs, se prepararon soluciones del EC de la variedad Imilla Negra (10%v/v) en buffers de Good (Good *et al.* 1966) adecuados para cubrir los siguientes valores de pH: 2,10; 4,30; 6,95, 8,10; 9,25 y 11,20. Las mezclas fueron incubadas por 60 min a temperatura ambiente y se midió luego la actividad inhibitoria residual frente a tripsina.

<b>REACTIVOS</b>	
Extracto crudo papa andina	100 µL
Buffer de Good (pHs: 2,10; 4,30; 6,95; 8,10; 9,25 y 11,20)	600 µL
<b>MEDIDA DE ACTIVIDAD</b>	
Buffer Tris HCl 0,1 M; CaCl <sub>2</sub> 50 mM; pH =8	900 µL
Proteasa: ej. Tripsina [ $2,8 \times 10^{-7}$ M]	10 µL
Sustrato: BAPNA [10mM]	40 µL

Preparación de los buffers:

<b>TAPS</b>	1,3265 g (M = 265,3)
<b>AMP</b>	1,2462 g (M = 249,3)
<b>MOPS</b>	1,1560 g (M = 231,2)
<b>CAPS</b>	1,1065 g (M = 221,31)
<b>MES</b>	1,0860 g (M= 217,2)

A excepción de CAPS (que se disolvió en 25 mL de NaOH 0.1 M), el resto se disolvió en 100 mL de agua destilada.

## A.5.2 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad inhibitoria de los ECs

Se estudió también el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad del EC. El ensayo se llevó a cabo adicionando diferentes concentraciones de NaCl (0.05M, 0.15M, 0.25 M, 0.50M, 1 M y 2M) al EC.

La actividad inhibitoria de tripsina fue evaluada según se describió anteriormente.

REACTIVOS	
Extracto crudo papa andina	100 µL
NaCl	600 µL
MEDIDA DE ACTIVIDAD	
Buffer Tris HCl 0,1 M; CaCl <sub>2</sub> 50 mM; pH =8	900 µL
Proteasa: ej. Tripsina [ $2,8 \times 10^{-7}$ M]	10 µL
Sustrato: BAPNA [10mM]	40 µL

## A.6 Cromatografía de afinidad

Se propuso la cromatografía de afinidad como estrategia para purificar los IPPs con alto grado de pureza. Las matrices empleadas fueron preparadas con este fin por inmovilización en soportes de glioxil-agarosa con tripsina inmovilizada de acuerdo a la metodología desarrollada por Obregón (Obregón, *et al.* 2012; Obregón, *et al.* 2008) con modificaciones.

### A.6.1 Proceso de inmovilización

Las condiciones generales para la inmovilización de tripsina fueron seleccionadas en función de:

- i) La inmovilización de otras enzimas en glioxil-agarosa.
- ii) Los conocimientos previos en la preparación y caracterización de la solución de tripsina comercial.

iii) Las condiciones no desactivantes para la tripsina comercial. De esta última condición se deduce que el uso de un elevado valor de pH no afecta la actividad de la tripsina (Cisneros *et al.*, 2010).

Las enzimas fueron inmovilizadas en soportes de glioxil agarosa empleando agarosa 6 BCL (Hispanagar) como soporte. Los grupos aldehídos fueron previamente activados para que reaccionen con los grupos amino libres de los residuos aminoacídicos de la enzima. El gel (gliceril-agarosa) se preparó a partir de una solución de agarosa en presencia de NaOH y NaBH<sub>4</sub> y glicidol. Posteriormente se llevó a cabo una oxidación con NaIO<sub>4</sub> con agitación de paletas durante 2,5-3 hs a temperatura ambiente y finalmente, se lavó el gel de glioxil-agarosa con abundante agua destilada. La inmovilización de la enzima se realizó mezclando la tripsina (45 mg de proteína/g de agarosa) con la glioxil-agarosa (volumen total de 25 mL). Este proceso se realizó en frío y a pH 10,05 con bicarbonato de sodio 100 mM y glicerina al 25% (v/v). Luego de tres horas de agitación se lavó con abundante agua, filtró y conservó el gel a 20°C (Obregón *et al.*, 2012)).

El soporte resultante, conteniendo la enzima inmovilizada mediante enlaces covalentes (la base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa fue estabilizado mediante hidrogenación), fue adecuado para usar en la cromatografía de afinidad.

El EC tratado térmicamente y sin tratar fue sometido a cromatografía de afinidad empleando tripsina inmovilizada previamente en el soporte glioxil agarosa. Los inhibidores fueron eluidos de la matriz por cambio de pH del solvente de elución empleado.

### **A.7 Cromatografía de intercambio aniónico**

La purificación de los IPPs se llevó a cabo en un equipo de FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences) con colector automatizado. Se utilizó una columna Hi Trap Q HP de 5 mL y se empleó como material de partida los extractos crudos de papas andinas de la variedad Imilla Negra, parcialmente purificados mediante tratamientos térmicos y fracciones retenidas de las cromatografías de afinidad.

En este proceso se cargaron 15 mL de muestra a la columna y se equilibró con buffer Glicina-NaOH 50 mM de pH 9,0. A continuación se aplicó un gradiente de NaCl 1 M desde 0 hasta un 35% del mismo a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La cromatografía fue monitoreada espectrofotométricamente por medidas de absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben los aminoácidos aromáticos de las proteínas.

### **A.8 Cromatografía líquida de alta eficacia o “high performance liquid chromatography” (HPLC)**

La fracción retenida en la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada fue analizada por HPLC con detector UV. Dichos análisis fueron llevados a cabo utilizando un cromatógrafo Gilson (Modelo 712) equipado con una columna C4 (5 $\mu$ ) 250 mm x 4,60 mm (Phenomenex). El proceso cromatográfico fue realizado a temperatura ambiente (25°C) y el volumen de inyección fue de 100  $\mu$ l para todas las experiencias. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50) acidificada con TFA al 0,1% (pH 3,0). El material de elución fue monitoreado espectrofotométricamente a 214 y 280 nm.

### **A.9 Análisis de pureza e identificación de los IPPs con herramientas proteómicas**

#### *A.9.1 Caracterización electroforética de los IPPs aislados o purificados*

Los IPPs aislados se analizaron por SDS PAGE para determinar sus pesos moleculares. También se les determinó el punto isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque.

#### *A.9.2 Protocolo de alta resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE)*

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores

concentraciones de acrilamida comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina (Laemmli U.K., 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C), y un gel de resolución (20% T y 3% C).

Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias.

Preparación de las muestras:

El extracto crudo sin tratar y los extractos crudos tratados térmicamente y liofilizados se reconstituyeron en agua destilada.

<b>PREPARACION DE MUESTRAS</b>	
Muestra liofilizada y resuspendida	150 $\mu$ L
Buffer de muestra 6X para electroforesis	30 $\mu$ L
$\beta$ -mercaptoetanol	9 $\mu$ L

Las muestras se calentaron en baño seco a 90°C durante 5 minutos y posteriormente fueron centrifugadas a 5 minutos a 11000 g antes de ser sembradas.

<b>BUFFER DE MUESTRA</b>	
Tris	9,42 g
SDS	12,00 g
$\beta$ -mercaptoetanol	30,00 mL
Glicerol	48,00 mL
Azul de bromofenol	12,00 mg
Se llevó a pH: 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100 mL

Preparación de los geles:

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indica a continuación:

<b>BUFFER DEL GEL</b>	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1 M, c.s.p., pH = 8,45	
AD, c.s.p.	100 mL
<b>GEL DE APILAMIENTO (4%T, 3%C)</b>	
Acril-Bis (49,5:3)	0,700 mL
Buffer del gel	1,275 mL
AD	3,225 mL
PSA 10%	0,045 mL
TEMED	0,001 mL
<b>GEL DE RESOLUCIÓN (20%T, 3%C)</b>	
Acril-Bis (49,5:3)	5,655 mL
Buffer del gel	2,805 mL
AD	0,045 mL
PSA 10%	0,045 mL
TEMED	0,007 mL

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida:

Se aplicaron las muestras y en los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

<b>BUFFER ANÓDICO 0,2 M</b>	
Tris	24,2 g
HCl 1 M, c.s.p., pH = 8,90	0,3 g
AD, c.s.p.	1000 mL
<b>BUFFER CATÓDICO 0,1 M</b>	
Tris	12,1 g
Tricina 0,1 M	17,9 g
SDS 0,1%	1,0 g
AD, c.s.p.	1000 mL

Las corridas se realizaron a amperaje constante (15 mA por gel) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 25 mA por gel al ingresar las

proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Fijación y Tinción:

Tinción con Coomasie Brilliant Blue R-250:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos en solución fijadora durante 30 minutos (los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos; y se recomienda un máximo de fijación de 45 minutos) y teñidos por inmersión en solución colorante durante una hora (se recomienda un máximo de coloración de una hora y media). Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda. Los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos.

<b>SOLUCIÓN FIJADORA</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	400 mL
AD, c.s.p.	1000 mL
<b>SOLUCIÓN COLORANTE</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
AD, c.s.p.	1000 mL
<b>SOLUCIÓN DECOLORANTE</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
AD, c.s.p.	1000 mL

Tinción con Coomassie Brilliant Blue G-250:

Esta tinción es ideal para teñir péptidos pequeños. Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 minutos (los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos; y se recomienda un máximo de fijación de 45 minutos) y teñidos por inmersión en solución colorante durante una hora (se recomienda un máximo de coloración de una hora y media). Posteriormente se realizaron sucesivos lavados con

solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,5 µg de proteína por banda. Los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos.

<b>SOLUCIÓN FIJADORA</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	400 mL
AD, c.s.p.	1000 mL
<b>SOLUCIÓN COLORANTE</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
Coomassie brilliant blue G-250	250 mg
AD, c.s.p.	1000 mL
<b>SOLUCIÓN DECOLORANTE</b>	
Ácido acético glacial	100 mL
AD, c.s.p.	1000 mL

Tinción con plata:

El método se basa en dos propiedades químicas del tiosulfato: mejoramiento de la imagen por pretratamiento de geles fijados y formación de complejos solubles de Ag que eliminan el background inespecífico (precoprecipitación de sales insolubles de Ag) durante el desarrollo de la imagen. La sensibilidad es de nanogramos.

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante al menos 1 hora para prevenir la difusión de las proteínas, remover sustancias interferentes y obtener geles con menos background.

Posteriormente fueron lavados 3 veces, 20 minutos c/u, con solución de lavado 1 para remover el ácido acético cuya acidez interferiría con el tiosulfato del siguiente paso.

Se trataron con solución de pretratamiento durante 1 minuto exacto.

Luego se lavaron 3 veces con agua bidestilada (ABD) durante 20 segundos cada vez para remover el exceso de tiosulfato que podría generar background por combinación con el sulfuro de plata.

Los geles se trataron 20 minutos con solución de Ag en oscuridad. El formaldehído de esta solución, además de servir como entrecruzador, aumenta la sensibilidad y el contraste sin el aumento de background.

Se lavaron con ABD 2 veces, 20 segundos cada una para remover el exceso de nitrato de plata, el cual podría consumir el tiosulfato muy rápidamente.

Se sumergieron en solución de desarrollo hasta que no aparecieron más bandas. La velocidad del revelado depende del tipo y concentración de las proteínas; entre 30 segundos (banda de 500 ng) y 2 min (bandas de 50 ng).

La reacción se detuvo con solución de stopping durante 10 minutos, y posteriormente los geles se sumergieron en metanol al 30% durante 30 minutos a 4°C seguido por otros 30 minutos en solución de glicerol al 40%.

<b>SOLUCIÓN FIJADORA</b>	
Metanol	50 mL
Ácido acético	12 mL
Formaldehído 37%	50 µL
AD c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN DE LAVADO 1</b>	
Etanol 30%	
<b>SOLUCIÓN DE PRETRATAMIENTO</b>	
Tiosulfato de sodio pentahidratado	0,03 g
AD, c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN DE PLATA</b>	
Nitrato de plata	0,2 g
Formaldehído 37%	100 µL
AD c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN DESARROLLADORA</b>	
Carbonato de sodio	6 g
Solución de pretratamiento	1 mL
Formaldehído 37%	75 µL
AD c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN STOPPING</b>	
Metanol	10 mL
Ácido acético	12 mL
AD c.s.p.	100 mL

## A.9.3 Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) (Westergaard *et al.* 1980) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI). Permite resolver muestras muy complejas y determinar diferentes valores de pI en una misma corrida, tanto en trabajos analíticos como preparativos.

Preparación de las muestras:

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 µg/µL y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a liofilizar las mismas (con excepción del extracto crudo) y luego redisolviendo el precipitado en agua bidestilada (en el caso de muestras con alto contenido proteico como el EC y el tratamiento térmico a 60°C el volumen final de siembra se redujo respecto al de las demás de modo de lograr una concentración adecuada).

Las muestras listas para usar fueron conservadas en freezer a -80 °C hasta el momento de ser sometidas a IEF.

Preparación de los geles:

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

<b>SOLUCIÓN DE POLIACRILAMIDA AL 5%</b>	
Acrilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C)	2,0 mL
Agua MiliQ	5,5 mL
Anfolitos (Bio-Lyte 3/10)	0,5 mL
Glicerol (25% p/v)	2,0 mL

La solución de poliacrilamida se desgasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante aproximadamente 20 minutos y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

REACTIVOS DE POLIMERIZACIÓN	
Riboflavina (sol. saturada)	100 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L
PSA al 10%	70 $\mu$ L

La mezcla fue depositada con micropipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante toda la noche a temperatura ambiente y en presencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida:

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 5-12  $\mu$ L y 9 siembras por placa como máximo), permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con AD) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas a voltaje constante: 100 V durante los primeros 30 min, 200 V los siguientes 15 min y 450 V los 60 min finales.

Fijación y Coloración:

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

SOLUCIÓN FIJADORA	
Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 mL
TCA	12,5 g
AD, c.s.p.	100 mL

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

<b>SOLUCIÓN COLORANTE</b>	
CuSO <sub>4</sub> (se disolvió primero en agua)	500 mg
Ácido acético glacial	10 mL
Etanol	27 mL
Coomassie brilliant blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN DECOLORANTE I</b>	
Ácido acético glacial	7 mL
Etanol	12 mL
CuSO <sub>4</sub>	500 mg
AD, c.s.p.	100 mL
<b>SOLUCIÓN DECOLORANTE II</b>	
Ácido acético glacial	7 mL
Etanol	12 mL
AD, c.s.p.	100 mL

Estimación de los puntos Isoeléctricos:

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (Broad pI kit, Amersham): Amiloglucosidasa (pI 3,50); Inhibidor de Tripsina (pI 4,55);  $\beta$ -Lactoglobulina A (pI 5,20); Anhidrasa carbónica B, bovina (pI 5,85); Anhidrasa carbónica B, humana (pI 6,55); Mioglobina, banda ácida (pI 6,85); Mioglobina, banda básica (pI 7,35); Lentil lectina, ácida (pI 8,15); Lentil lectina, media (pI 8,45); Lentil lectina, básica (pI 8,65) y Tripsinógeno (pI 9,30).

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

### A.9.4 Electrotransferencia

Procedimiento:

Se realizó un gel de SDS-PAGE del inhibidor obtenido mediante cromatografía de afinidad sobre tripsina agarosa. Luego de la corrida, el gel se equilibró durante 15 minutos con el buffer de transferencia (CAPS: 10 mM, MeOH 10%, DTT 5 mM, NaOH pH 11). Se colocó una hoja de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en metanol durante 10 segundos. y luego se sumergió esta membrana, 4 trozos de papel Whatman y las esponjas en el buffer de transferencia, al menos durante 15 minutos. Se preparó el "sándwich" como para Western: esponjas, 2 hojas de papel, membrana de PVDF, gel, 2 hojas de papel, esponjas. Se aseguró que no queden burbujas de aire dentro. Se conectó a la fuente de poder y se utilizó un amperaje constante de 100 mA durante 2 horas. Después de desconectar y retirar las membranas de PVDF y el gel, se lavó por inmersión en agua MiliQ durante 5-10 minutos, con agitación. La membrana se tiñó con Rojo Ponceau (0,1% de colorante en ácido acético al 1%) durante 5 minutos.

Al finalizar la tinción, la membrana se decoloró con ácido acético al 2% durante 1 minuto, seguido por varios lavados con agua. La membrana se secó, se envolvió con papel plástico y se conservó a -20°C. Se cortó la banda de interés y se envió a secuenciar el N-terminal de la proteína al Servicio de Secuenciamiento: Tufts Core Facility; Physiology Dept.; Boston; EEUU.

El EC y los IPPs aislados se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar sus pesos moleculares. También se determinó el punto isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque (IEF).

### A.9.5 Caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF descrita inicialmente por Hillenkamp (Hillenkamp *et al.* 1990) es una técnica precisa y muy sensible para la determinación de masas moleculares de hasta 200 kDa. La técnica consiste en mezclar la muestra a ser determinada con una matriz, la cual es introducida al espectrómetro e irradiada con un láser pulsátil al máximo de absorción de la matriz. La interacción de los fotones con la matriz y la muestra resulta en la

formación de iones intactos relacionados con la masa molecular de la muestra, que en nuestro caso es una proteína. Este mecanismo acoplado con un espectrómetro de masas TOF permite calcular las masas de la muestra basado en el tiempo que tarda el ión formado en recorrer la distancia entre el lugar de formación del ión y el detector. El cuadrado de este tiempo es proporcional a la masa del ión e inversamente proporcional a la carga del mismo. Esta técnica tiene una sensibilidad demostrada de detectar masas de hasta 200000 Da de muestras de apenas 5 pmol.

$$m/z \propto (\text{tiempo de vuelo})^2$$

m= masa molecular

z= carga de la molécula

El error típico en esta técnica es de alrededor de 10 Da en masas de 10000 Da o de 50 Da para masas de 50000 Da (Beavis y Chait 1991). Este tipo de espectrometría es una medida de la masa química de la molécula, por ende no es afectada por las propiedades físicas e hidrodinámicas de la proteína como pasa con técnicas como el SDS-PAGE. Otra ventaja del MALDI es que es prácticamente insensible a cualquier buffer en el que este la muestra, haciendo que sean necesarios menos pasos de purificación previa de la proteína para poder utilizarlo (Beavis *et al.* 1989).

### A.9.6 Métodos Proteómicos

Desalado de extractivos:

Los extractos biológicos fueron desalados y concentrados como fue descrito por Villanueva (Villanueva *et al.*, 2003). La matriz de C18 fue activada con acetonitrilo, luego se lavó varias veces con agua, a continuación se añadió la muestra, se mezcló por agitación y se centrifugó a 15000 g durante 30 segundos. Por último, los péptidos y proteínas vinculadas a la resina de C18 se eluyeron con isopropanol-TFA 0,1%, mezclando por agitación y centrifugando a 15000 g durante 1 min. El sobrenadante de la última etapa se utilizó para análisis por MALDI-TOF MS.

### A.9.6.1 Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting):

La huella peptídica o Peptide Mass Fingerprinting (PMF) es una técnica analítica para la identificación de proteínas de organismos cuyo genoma sea conocido y esté disponible. Brevemente, la proteína de interés desconocida es digerida por una enzima (una de las más usadas es la tripsina) generando péptidos más pequeños. La masa absoluta (todavía sin saberse) de estos péptidos es determinada por espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF). La gran ventaja de este método para la identificación de proteínas es que sólo se debe saber las masas de los péptidos. El principal inconveniente es que la auténtica secuencia proteica (u homóloga cercana) debe estar presente en las bases de datos disponibles.

### A.9.6.2 Digestión tríptica:

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas por tinción de los geles de acuerdo al método de Coomassie coloidal. Las bandas seleccionadas fueron cortadas, lavadas con agua milli Q y acetonitrilo varias veces para remover el colorante y secadas en vacío. Los fragmentos del gel fueron cubiertos por una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM conteniendo DTT 10 mM por 30 min a 37°C, luego fueron centrifugadas y lavadas con acetonitrilo por 5 min. Los fragmentos fueron incubados en una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM conteniendo iodoacetamida 50 mM por 20 min a temperatura ambiente y oscuridad, y lavados con agua milli Q y acetonitrilo alternativamente. La digestión tríptica fue lograda usando buffer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pH 8,5 conteniendo tripsina (4 ng/ $\mu\text{L}$ ) por 12 hs a 37°C. Los péptidos resultantes fueron recuperados por extracción con acetonitrilo al 50% (v/v) y luego secados en un SpeedVac, redisueltos en TFA al 0,1% (v/v).

### A.9.6.3 PMF por MALDI-TOF/MS:

Los péptidos, productos de la digestión tríptica, fueron sembrados en una placa Ground Steel MP 384 utilizando como matriz  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-HCCA) y fueron analizados por MALDI-TOF/MS. La identificación del mapa

tríptico se intentó obtener usando el programa Mascot Tool (<http://www.matrixscience.com>) según los siguientes parámetros de búsqueda: (1) Tipo de búsqueda, Peptide mass Fingerprinting; (2) Enzima, tripsina; (3) Base de datos, SwissProt 55.2; (4) Taxonomía, Viridiplantae; (5) Modificaciones variables, Metilcarbamida (C), Oxidación (M); (6) Valores de masas, monoisotópico; (7) Peso de la Proteína, 24 kDa; (8) Tolerancia del peso de la proteína, + 1000 ppm; (9) Carga de la proteína, +1. Valor de probabilístico de MOWse: El valor de la proteína es  $-10 \cdot \log(P)$ , donde P es la probabilidad que el apareamiento observado es un evento al azar. Los valores de la proteína mayores que 56 son significantes ( $p < 0,05$ ) (Obregon *et al.* 2012; Obregon *et al.* 2009a; Obregon *et al.* 2009b).

#### A.9.6.4 Espectrometría de masas (EM) en tándem (MALDI-TOF-TOF/MS-MS):

La EM suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular, así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas. Debe reiterarse la elevada sensibilidad de la EM (en condiciones muy especiales pueden detectarse señales correspondientes a sólo 10 iones) por lo que es la preferida para la determinación de trazas en química ambiental y en los controles antidopaje.

Un tándem de espectrometría de masas (EM-EM o MS/MS) es cualquier sistema que contiene al menos dos etapas de análisis, separadas por una interfase en la cual los iones procedentes del primer analizador generalmente son activados y se fragmentan.

En el más simple de los experimentos de masas, EM-EM, el primer analizador genera el espectro de masas de una sustancia y selecciona los iones correspondientes a un mismo valor de  $m/z$ , que se denominan iones precursores.

El principio del procedimiento de la espectrometría de masas en tándem se ilustra en la figura adjunta en ésta página.

Los iones precursores son activados y se fragmentan, pasando al segundo analizador, con lo que se obtiene el espectro de masas de los iones precursores seleccionados (barrido de iones fragmento).

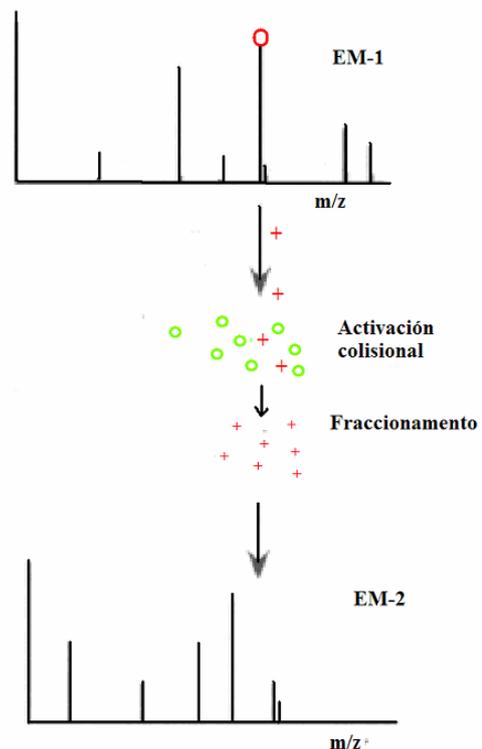
Existen dos categorías principales de espectrómetros que permiten realizar experimentos EM-EM: tándem de espectrómetros en el espacio y en el tiempo. El tándem en el espacio es el resultado del acoplamiento de instrumentos (cuadrupolo triple) y el tándem en el tiempo es la realización de una secuencia apropiada de eventos en un mismo instrumento de almacenamiento de iones (por ejemplo en una trampa de iones o la cámara de iones en un ciclotrón).

El equipo utilizado para la obtención de todos los espectros de masas fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF Ultraflex Extreme (Bruker, Alemania).

Todos los análisis de espectrometría de masas se han realizado en el Servicio de Proteómica y Bioinformática de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) el cual pertenece al Instituto Nacional de Proteómica, PROTEORED, España.

### A.9.6.5 Análisis de la huella peptídica (PMF):

Para la identificación de los inhibidores, se llevó a cabo el análisis de la huella peptídica o “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) realizando la digestión triptica de las bandas obtenidas a partir de geles SDS-PAGE. Las bandas fueron cortadas, lavadas y decoloradas. Luego, los residuos de cisteína libres se redujeron y sometieron a alquilación y las muestras así tratadas se incubaron en presencia de tripsina a 37°C durante 2 horas para la digestión de los inhibidores. Los péptidos generados fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS. Para estos análisis fue utilizado el software Mascot Tool (<http://www.matrixscience.com>).



### A.9.6.6 Secuenciación *de novo* de péptidos internos del inhibidor mediante MALDI-TOF-TOF/MS-MS:

Para el MS/MS, los iones generados por el proceso de PMF-MALDI-TOF/MS fueron acelerados a 8 kV a través de una rejilla a 6,7 kV en una región de desplazamiento libre de campo, corta y lineal. En ésta región, los iones pasaron a través de un dispositivo selector de iones temporizados que fue capaz de seleccionar un péptido de una mezcla de péptidos que estaban a diferentes valores de  $m/z$  para fragmentaciones subsecuentes en la celda de colisión. Después de que fueron seleccionadas varias moléculas de un tipo de péptido a un determinado valor de  $m/z$  por el selector de iones temporizados, las mismas pasaron a través de un lente de retardo donde los iones fueron desacelerados y luego introducidos dentro de la celda de colisión, que fue operada a 7 kV. Fue llevada a cabo la fragmentación en el modo de simple descomposición metaestable (sin gas de colisión y con la energía de colisión configurada a 1 keV).

PARTE B

## CLONADO Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE IPPS

**B.1 Clonado de los inhibidores**

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos de clonación se emplearon plantas de las variedades Overa y Chacarera.

*B.1.1 Extracción del ARN total*

A partir de las plantas enteras (incluyendo los tallos, las hojas y las raíces) de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Overa y variedad Chacarera provenientes de cultivo *in vitro*, se aisló el ARN total empleando el kit comercial RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), que hace uso de las propiedades de unión selectiva de las membranas a base de sílice. Aproximadamente 100 mg de planta fueron triturados con nitrógeno líquido en un mortero y el polvo resultante se procesó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El ARN eluido de las microcolumnas que contienen las membranas de sílice, se cuantificó por absorbancia a 260 nm usando un nanoespectrofotómetro UV-visible de micro-volumen (Nanodrop 1000, Thermo) y su integridad se evaluó en gel de agarosa 2% (p/v).

*B.1.2 Síntesis de la doble cadena híbrida ARN-ADNc*

Se sintetizó la primera cadena de ADN complementaria al ARNm por reacción de retrotranscripción mediante un kit comercial (First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo) utilizando los cebadores oligo-p(dT)<sub>15</sub> y como molde, aproximadamente 1,2 µg del ARN total previamente obtenido y desnaturalizado a 65 °C durante 15 min seguido de una incubación de 5 min en hielo. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL. La composición de la mezcla de reacción y los parámetros de termociclado empleados en la síntesis del híbrido ARN-ADNc, fueron los indicados en el kit arriba mencionado.

B.1.3 Amplificación por PCR

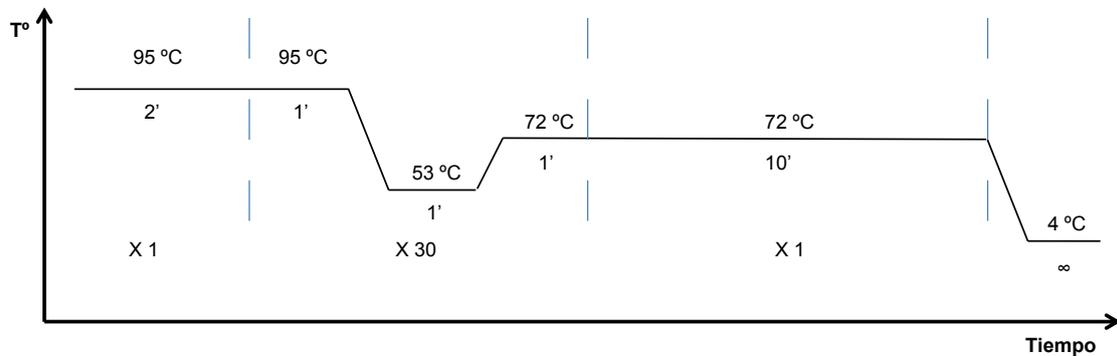
Para la amplificación por PCR se utilizó como molde, el ADNc del transcripto del inhibidor de serin proteasa de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedades Overa y Chacarera obtenido en el paso anterior. Se utilizaron los cebadores Falineamiento (*Forward*) y Rev2 (*Reverse*) (**Tabla 9**).

**Tabla 9:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores *Forward* y *Reverse* utilizados para amplificar, mediante PCR, el ADNc del IPP obtenido por RT a partir del ARN total extraído del tejido vegetal de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Overa y variedad Chacarera.. Se muestran los parámetros de los cebadores: longitud, porcentaje de GC y temperaturas de desnaturalización (Tm) aproximadas.

<b>Falineamiento (Forward)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	ATGGAGTCAAAGTTTGCTCACATCATTG
Longitud:	28
%GC:	39
Tm:	65,7°C
<b>Rev2 (Reverse)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	GCCACCCTAGGAATTTGTAC
Longitud:	20
%GC:	50
Tm:	58,4°C

Como el producto de reacción sería clonado, se utilizó una Taq polimerasa modificada recombinante purificada de *Escherichia coli* (NZYTaQ DNA polymerase, MB001), ya que ésta no posee capacidad correctora de errores y puede poliadenilar los extremos 3' de los productos de PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µL, en una solución conteniendo 0,2 mM dNTPs y 2,5 U de NZYTaQ ADN polimerasa (NZY tech) en el buffer correspondiente (50 mM Tris-HCl; pH 9,0; 50 mM NaCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>). En todos los casos, se utilizó 2 µL de molde y 1 µL de cada uno de los cebadores forward y reverse de concentración 10 µM (0,4 µM en la mezcla de reacción). El primer *Forward* estaba diseñado desde el codón del primer aminoácido de la proteína madura. El primer *Reverse*, por su parte, hibridaba desde la secuencia que codificaba para el último aminoácido. La amplificación se realizó utilizando

el programa que se muestra en la **Figura 45** en un termociclador Thermal cycler (VWR, Doppio, Bélgica).



**Figura 45:** Programa utilizado para la amplificación por PCR. Inicialmente, la muestra se desnaturalizó a 95°C durante 2 min. A continuación hubo 30 ciclos de: 95°C durante 1 min, 53°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Luego, la muestra fue tratada a 72°C durante 10 min para permitir una completa extensión y finalmente, se conservó a 4°C hasta ser retirada del termociclador.

### B.1.4 Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN

Las electroforesis de geles de agarosa para visualizar el ADN, se llevaron a cabo en geles de agarosa al 2% en buffer TAE (5 g/L Tris base; 1 mL/L ácido acético; 0,05 M EDTA; pH 8,5). Las muestras se sembraron en el gel sin tratar con ningún tipo de buffer de tinción, debido a que la master mix utilizada contenía buffer para teñir las moléculas de ADN para poder sembrar directamente en el gel. Todos los geles contenían Gel Red en una concentración 1X. Las corridas se efectuaron en una cuba de electroforesis Mini-Sub® Cell GT Cell y en una cuba Wide Mini-Sub Cell GT Cell, a un voltaje constante de 100 V. La visualización de las bandas se realizó iluminando los geles con luz ultravioleta (Sambrook y Maniatis, 1989). Para la purificación del ADN retenido en los geles de agarosa, se utilizó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 250, Cat. N° 28706). El ensayo se basa en la disolución de la agarosa a 50°C en una solución suministrada por el Kit. La solución resultante se pasa a través de una membrana de sílica en una columna, la cual retiene moléculas de ADN de un tamaño mayor a 70 pares de bases pero no nucleótidos, enzimas, sales, agarosa, Gel Red u otras

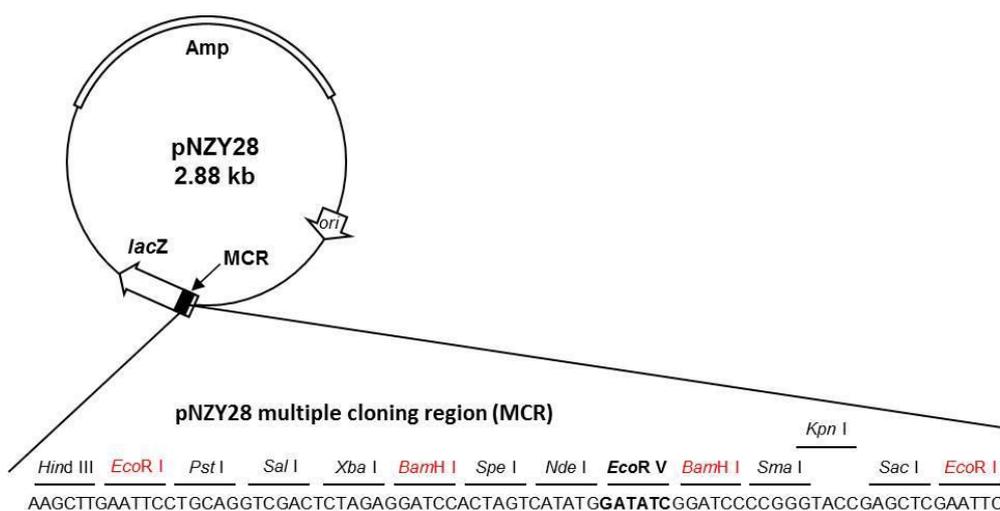
impurezas; la columna se lava con una solución que contiene alcohol para eliminar la agarosa. La muestra se recuperó en 50 µL de una solución de agua MiliQ estéril.

### B.1.5 Adenilación de productos de PCR

El vector pNZY28 (NZYtech, **Figura 46**) que se utilizó para clonar el producto de PCR se encuentra diseñado para ligar secuencias de ADN con adenina en sus extremos 5' como poseen los productos de amplificación cuando se utilizan polimerasas con actividad transferasa terminal como la NZYTaq DNA polimerasa, MB001.

### B.1.6 Ligación de productos de PCR al vector de clonado pNZY28

La ligación al vector de clonado pNZY28 (NZYtech) se realizó en una solución de 10 µL que contenía: 3 µL del producto de PCR con la adenilación, 1 µL de pNZY28 (50 ng/µL) y 2 U de ADN ligasa T4 (NZYtech) en el buffer de reacción NZY. La cantidad de inserto en la mezcla de reacción se estimó en 25 ng. La calidad y cantidad de los productos nucleotídicos fueron chequeadas mediante espectrofotometría de UV, usando un nanofotómetro (Implen, Isaza, Portugal). La mezcla se incubó a 4°C durante 12 horas.



**Figura 46:** Puntos de referencia de la secuencia del vector pNZY28.

## B.1.7 Principales características del vector pNZY28

Pares de bases	2886
Codón de inicio <i>lacZ</i>	1
Promotor de la T7 ARN polimerasa	24-44
T7 promoter sequencing primer binding site	24-39
Región de clonado múltiple	45-126
M13/pUC U19-mer sequencing primer binding site	144-161
Región de fago f1	283-737
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	2855-2878

T7 promoter sequencing primer	5'-(TAATACGACTCACTATAGGG)-3'
M13/pUC U19-mer sequencing primer	5'-(GTTTTCCCAGTCACGACGT)-3'
M13/pUC Reverse Sequencing primer	5'-(GAGCGGATAACAATTCACACAGG)-3'

## B.1.8 Transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinantes

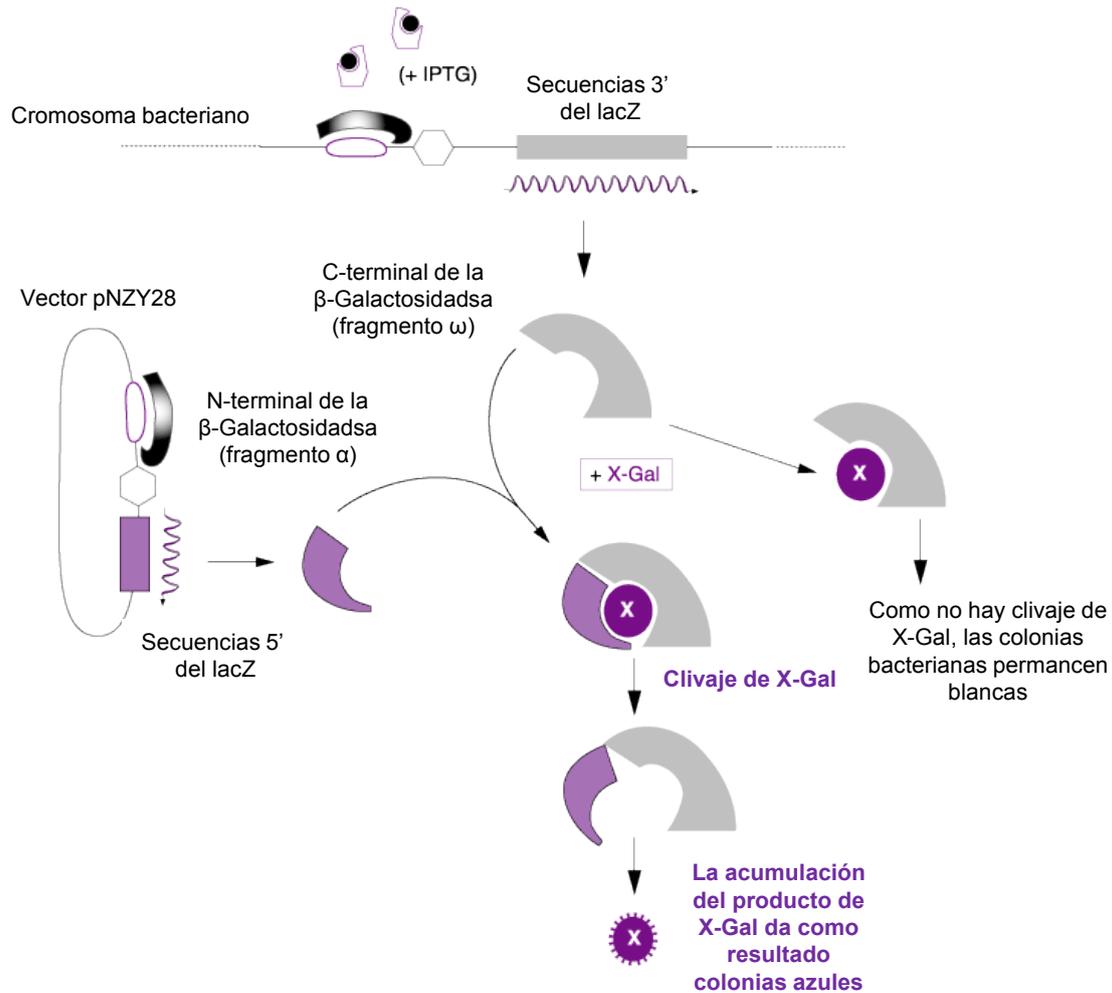
La transformación de la cepa *E. coli* NZYStar con pNZY28 (**Figura 46**) y pHTP1 (NZYtech, **Figura 48**) recombinados con la secuencia codificante para los IPPs se realizó utilizando el método de shock térmico (Sambrook y Maniatis, 1989). El genotipo de NZYStar es: *endA1 hsdR17* ( $r_{k-}$ ,  $m_{k+}$ ) *supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[F' *proA+B+ lacI<sup>q</sup>ZΔM15 :Tn10(Tc<sup>R</sup>)*]. Las colonias NZYStar transformantes se sembraron, en condiciones asépticas, en placas de LB-agar (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar) que contenían ampicilina (100 μg/mL). Previo a su uso, se esparcieron 20 μL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactopiranósido) 50 mg/mL y 100 μL de IPTG (isopropil β-tiogalactopiranósido) 100 mM sobre las placas. El reconocimiento de colonias portadoras de plásmidos pNZY28 con la secuencia que codifica para el respectivo IPP se realizó mediante la visualización de la ausencia de actividad β-galactosidasa (ver apartado Mecanismo de α-complementación). Por otra parte, la transformación de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3), cuyo genotipo es [F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdSB* (rB- mB-) λ(DE3 \**lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*)], con el plásmido recombinante pHTP1 con la secuencia que codifica para el respectivo IPP, se realizó por el mismo método que para la cepa NZYStar. Las células tratadas se plaquearon en

condiciones asépticas, en placas de LB agar en presencia de kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Información detallada del sistema pHTP1 se encuentra en el apartado Vector de Expresión: pHTP1.

### *B.1.9 Mecanismo de $\alpha$ -complementación*

El vector de clonado pNZY28 (NZYtech), de 2886 pares de bases (pb), incluye un pequeño fragmento del gen de la  $\beta$  galactosidasa (gen *lacZ*) de *E. coli* que contiene secuencias reguladoras y codifica para los primeros 146 aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima (fragmento  $\alpha$ ). Dentro de esta región se encuentra un sitio de clonado múltiple que mantiene el marco de lectura del fragmento  $\alpha$  (Matthews, 2005). Este vector se utiliza junto con células hospedadoras que expresan la porción carboxilo terminal de la  $\beta$  galactosidasa (fragmento  $\omega$ ). Ni el fragmento  $\alpha$  que porta el plásmido ni el fragmento  $\omega$ , codificado en el genoma de la bacteria, son activos por separado sino que se asocian para dar lugar a la enzima activa. Las bacterias transformadas no recombinantes *lac*<sup>+</sup> resultantes son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia del cromógeno X-Gal. Este último es sustrato de  $\beta$  galactosidasa y genera un producto azul al ser hidrolizado por la enzima. Habitualmente, la inserción de un fragmento en el sitio de clonado del plásmido impide esta  $\alpha$ -complementación al producir un fragmento  $\alpha$  inactivo. De esta forma, las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes forman colonias blancas en presencia de X-Gal.

La expresión del fragmento  $\omega$  se encuentra regulada por el represor *lac* el cual puede ser desplazado por una molécula de IPTG. De este modo la presencia de IPTG es necesaria para que se dé la  $\alpha$ -complementación (**Figura 47**).



**Figura 47:** Mecanismo de α-complementación para el gen *lacZ* (Applied Molecular Genetics – Bioc 471a/571a. Lecture 4 - *E. coli* Hosts and Plasmid Biology).

#### B.1.10 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas se realizó utilizando el kit comercial GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma). La misma se basa en el procedimiento de la lisis alcalina (Sambrook y Maniatis, 1989); para la purificación del plásmido se utiliza una matriz de sílica montada en una columna como la que se usó para recuperar el ADN luego de su extracción de geles de agarosa (ver sección B.1.4). Las bacterias (*E.coli* de la cepa NZYStar) de un cultivo de 5 mL se lisaron en una solución de resuspensión del kit. El lisado se pasó a través de la columna de sílica, la cual se lavó para luego recuperar la muestra en aproximadamente 50 µL de agua MiliQ estéril.

B.1.11 Screening rápido de colonias transformadas

A fin de identificar las colonias portadoras de plásmidos recombinantes, se realizó un protocolo de *screening* rápido. Se crecieron presuntas colonias recombinantes en 5 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche a 37°C con agitación. Una alícuota de 2 mL de este cultivo se centrifugó, en una centrifuga refrigerada a 14000 g durante 2 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y las células se trataron con el GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Cat. Nr. PLN70) siguiendo las especificaciones del fabricante. El inserto clonado fue verificado mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores “T7 promoter sequencing primer” (*Forward*) y “pUC/M13 Primer, Forward (24mer)” (*Reverse*) (**Tabla 10**), que se encuentran ubicados a unos 75 pb *upstream* (cuesta arriba) hacia el extremo 5’ y 75 pb *downstream* (cuesta abajo) hacia el extremo 3’ del sitio de clonado múltiple del vector pNZY28. Una alícuota de la fase acuosa del producto de PCR (5 µL) se corrió en una electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 10:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores *Forward* y *Reverse* utilizados para corroborar la presencia del IPP en el plásmido pNZY28. Se muestran los datos de los cebadores: longitud, porcentaje de GC y temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ ) aproximadas.

<b>T7 promoter sequencing primer (<i>Forward</i>)</b>	
Secuencia (5’a 3’):	TAATACGACTCACTATAGGG
Longitud:	20
%GC:	40
$T_m$ :	54,3°C
<b>pUC/M13 Primer, Forward (24mer) (<i>Reverse</i>)</b>	
Secuencia (5’a 3’):	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Longitud:	24
%GC:	63
$T_m$ :	70,4°C

*B.1.12 Confirmación del clonado del gen del IPP dentro del plásmido pNZY28*

A continuación los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger (Macrogen, Korea). El análisis de dicha secuencia verificó que se había clonado correctamente la secuencia codificante para el IPP maduro de la variedad Overa en el plásmido pNZY28. El análisis de las secuencias se realizó utilizando las herramientas informáticas disponibles en EXPASY [<http://ca.expasy.org/>].

**B.2 Expresión heteróloga**

*B.2.1 Clonado direccional del oPTI en el vector de expresión pHTP1. Adición de secuencias 5' "overhangs"*

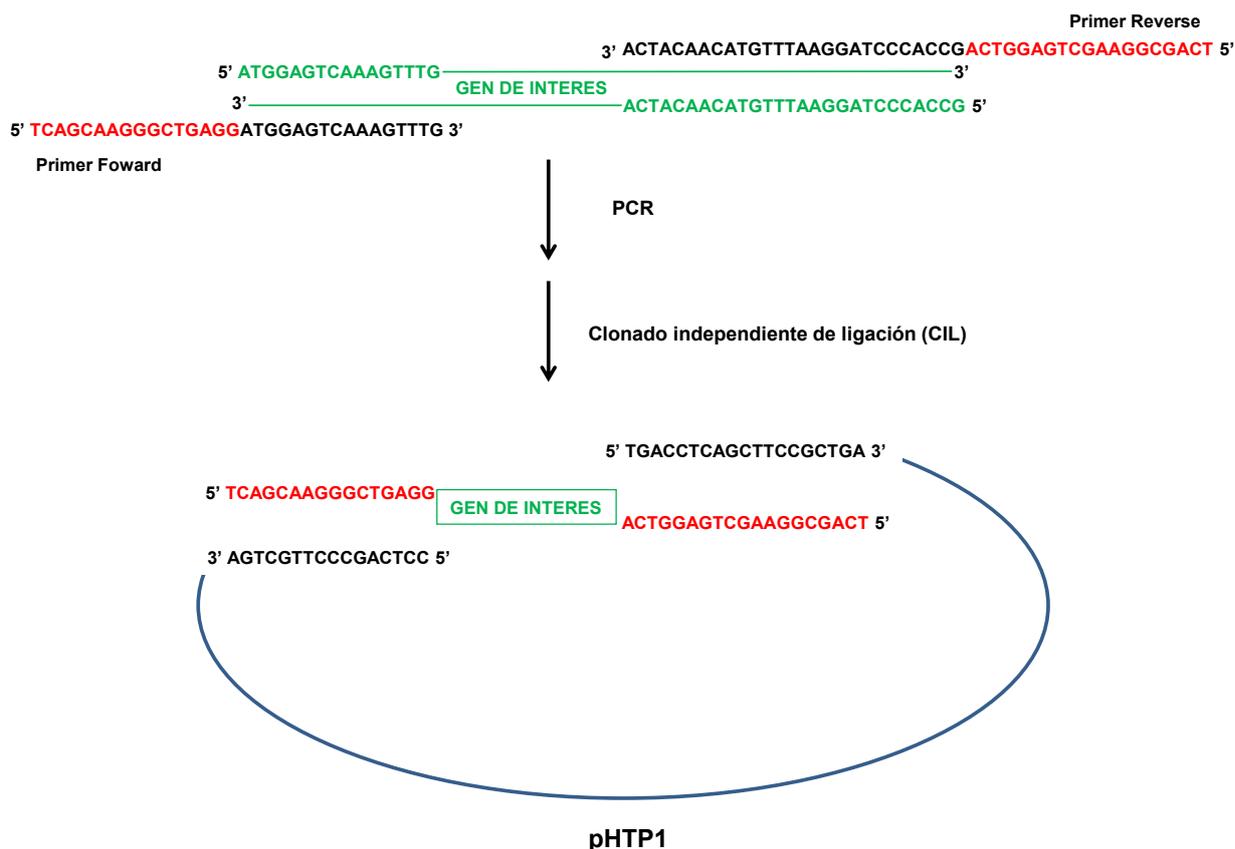
A fin de expresar el oPTI en el sistema de clonado y expresión NZYEasy (**Figura 48**), se procedió a la técnica de clonado direccional mediante el agregado de secuencias nucleotídicas que formen "5' overhangs" simple hebra en la secuencia codificante para el oPTI, con cebadores diseñados específicamente. Para poder realizar este paso, se tuvo que recuperar la secuencia codificante para el IPP serínico de la variedad Overa del plásmido pNZY28, con cebadores específicos (**Tabla 11**) para adicionar los 5' overhangs necesarios para introducir la secuencia codificante del oPTI en el vector de expresión pHTP1 (**Figura 49**).

**Tabla 11:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores *Forward* y *Reverse* utilizados para agregar a las secuencias clonadas, un 5' overhang (en amarillo) en cada extremos de la secuencia que codifica para el IPP maduro, recuperada del plásmido de clonado pNZY28. Se muestran los datos de los cebadores: longitud, porcentaje de GC y temperaturas de desnaturalización (T<sub>m</sub>) aproximadas.

<b>F<sub>exp</sub></b> <b>(Forward)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	TCAGCAAGGGCTGAGGATGGAGTCAAAGTTTG
Longitud:	32
%GC:	50

Tm:	73,8°C
<b>Rexp (Reverse)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	TCAGCGGAAGCTGAGGTCA GCCACCCTAGGAATTTGTACAACATCA
Longitud:	46
%GC:	50
Tm:	81,6°C





**Figura 49:** Diagrama esquemático del diseño de los cebadores y obtención del producto de PCR, y de la complementariedad de bases entre el inserto y el vector según el sistema de clonado y expresión NZYEasy.

Se realizó una PCR en las mismas condiciones en las que se generó la secuencia codificante antes de introducirla en el vector de clonado. Se sembró en un gel de agarosa al 2% y se cortó y purificó la banda correspondiente. Se utilizó una mezcla enzimática llamada NZYEasy enzyme mix, la cual es una formulación patentada usada para el clonado independiente del proceso de ligación. El inserto así generado puede ser entonces fácilmente clonado en vectores pHTP, que son suministrados de forma lineal con las terminaciones complementarias de simple cadena requeridas (protocolo del sistema de clonado y expresión NZYEasy). Con el producto de la ligación se transformaron *E.coli* BL21 (DE3) y se plaquearon.

Con la finalidad de confirmar la presencia de inserto en estos plásmidos, se realizó una amplificación por PCR de minipreparados obtenidos a partir de colonias recombinantes, utilizando los cebadores T7 promoter primer (*Forward*) y T7 terminator primer (*Reverse*) (Tabla 12).

**Tabla 12:** Secuencias nucleotídicas de los cebadores *Forward* y *Reverse* utilizados para corroborar la presencia del oPTI en el plásmido pHTP1. Se muestran los datos de los cebadores: longitud, porcentaje de GC y temperaturas de desnaturalización (Tm) aproximadas.

<b>T7 Promoter primer (<i>Forward</i>)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	TAATACGACTCACTATAGGG
Longitud:	20
%GC:	40
Tm:	54,3°C
<b>T7 terminator primer (<i>Reverse</i>)</b>	
Secuencia (5'a 3'):	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Longitud:	19
%GC:	53
Tm:	57,3°C

Se espera observar los insertos correspondientes a los clones con las secuencias que codifican para el oPTI con un tamaño aproximado a los 600 pares de bases aproximadamente, coincidiendo así con el tamaño esperado para la secuencia codificante para el oPTI (300 pb) teniendo en cuenta además la secuencia del vector por fuera del gen de interés (290 pb, aproximadamente), indicando que estos plásmidos eran recombinantes.

Los cebadores hibridan en secuencias que se encuentran ubicadas a unos 144 pb *upstream* (cuesta arriba) hacia el extremo 5', y 143 pb *downstream* (cuesta abajo) hacia el extremo 3' del sitio de clonado múltiple del vector o del inglés "*multiple cloning site*" (MCS) del plásmido pNZY28.

### *B.2.2 Producción del oPTI recombinante*

Para la producción del IPP recombinante se preparó un precultivo con colonias frescas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la secuencia que codifica para el IPP maduro dentro del vector de expresión pHTP1, en 10 mL de caldo LB con kanamicina (50 µg/mL). El precultivo fue incubado durante toda la noche a 37°C. Una alícuota (5 mL) se agregó a 500 mL de LB-kanamicina, y se incubó a 37°C con agitación (4 g) en un incubador orbital (Gallenkamp) hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,5 a 0,7. Luego se agregó IPTG hasta una concentración final 1mM y se incubó

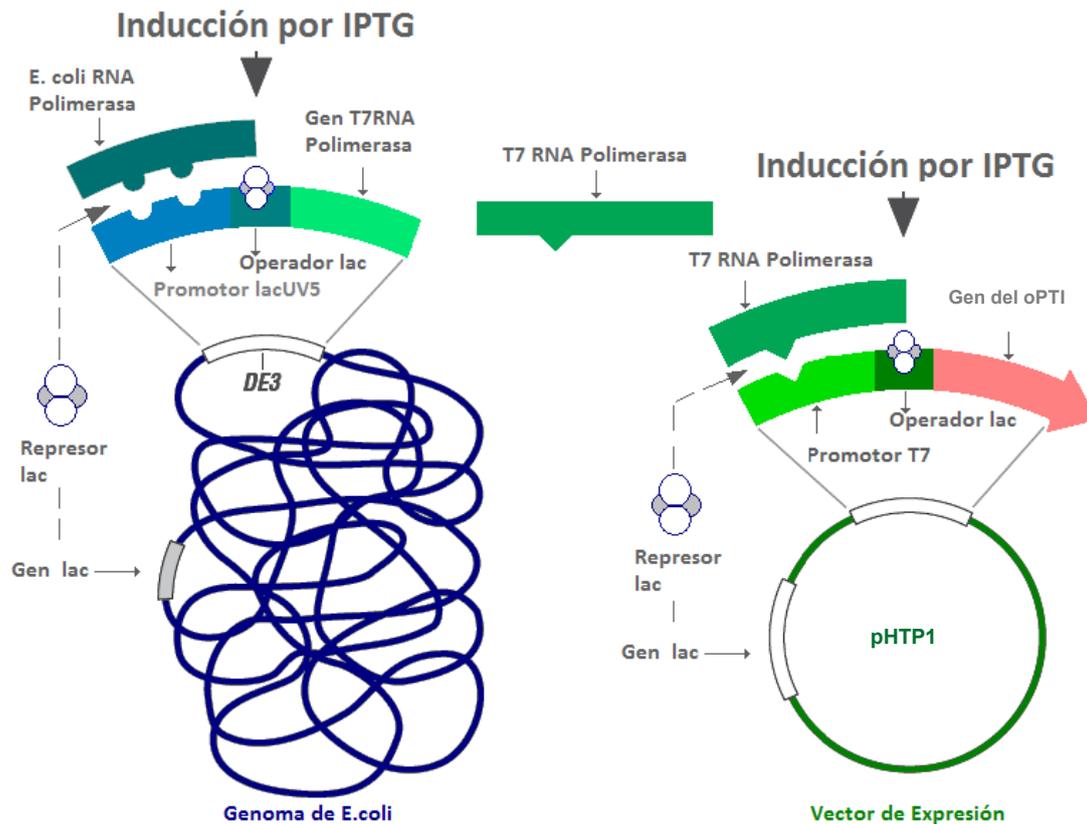
durante 20 horas en las mismas condiciones. El cultivo resultante se centrifugó durante 30 minutos a 2500 g en tubos de 50 mL.

Cabe señalar que la secuencia clonada del oPTI fue analizada para observar si contenía un péptido señal para que la proteína pudiera ser exportada al periplasma. El péptido señal pudo ser detectado mediante el análisis a través de diferentes softwares como PrediSi (Hiller *et al.*, 2004), Signal-Blast (Frank y Sippl, 2008), Phobius (Kall *et al.*, 2007), Signal 3-L (Shen y Chou, 2007) y OCTOPUS (Viklund y Elofsson, 2008).

Pasadas 20 horas de la inducción, todo el líquido contenido en los 500 mL del cultivo se sometió a centrifugaciones a 2100 g durante 30 min en tubos de 50 mL. Luego, el sobrenadante se filtró empleando tubos AMICON 10K de 15 mL (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units – 10,000 NMWL) centrifugando a 2100 g cada 30 min, concentrando de esta manera el oPTI que quedó en el espacio extracelular, hasta alcanzar una concentración de 2 mg/mL.

La producción en periplasma tiene variadas ventajas como la simplificación de la purificación de la proteína recombinante, puesto que el periplasma contiene menor cantidad de proteínas endógenas y además, la correcta formación de los puentes disulfuro puede ser facilitada porque el espacio periplasmático entrega el ambiente oxidativo necesario (Choi *et al.*, 2006).

El vector a utilizar en el presente trabajo corresponde al vector de expresión pHTP1. El funcionamiento del vector se encuentra estrechamente ligado a las características del hospedador elegido (**Figura 50**) y posee como marcador de selección un gen que confiere resistencia a kanamicina (diferente al antibiótico usado para clonar).



**Figura 50:** Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedador a *E. coli* BL21 (DE3) y como vector de expresión el vector pHTP1. En la imagen es posible apreciar la inducción por IPTG de la transcripción de T7 RNA polimerasa, la cual, una vez expresada transcribe el gen de la proteína recombinante de interés, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG (Quiroga Campano, 2010).

La **Figura 50** muestra los elementos disponibles para el control de los niveles de T7 RNA polimerasa y la posterior transcripción del gen insertado en el vector pHTP1. En lisógenos  $\lambda$ DE3, la T7 RNA polimerasa se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*, el cual permite un grado de transcripción en el estado no inducido y en la ausencia de control adicional, es recomendado para la expresión de variados genes cuyos productos tienen efectos inocuos en el crecimiento de las células hospedadoras (Novagen, 2006).

### B.2.3 Análisis por SDS-PAGE del oPTI

Las electroforesis en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) fueron realizadas siguiendo el protocolo convencional de Laemmli utilizando un gel concentrador de acrilamida al 5% (p/v) y un gel separador de 12%

(p/v) de acrilamida. Las muestras se trataron con un volumen igual de tampón de muestra [Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; glicerol 10% (v/v); SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,001% (p/v)] y se corrieron siempre reducidas. Para ello, se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se calentaron, antes de la electroforesis, durante 5 minutos en un baño seco a 99°C. Las electroforesis se realizaron en una cuba Bio-Rad Mini Protean III, a un amperaje constante de 80 mA, en buffer Tris-glicina [Tris 0,3% (p/v); glicina 1,44% (p/v); SDS 0,1% (p/v)]. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 por inmersión en una solución del colorante [0,1% (p/v) en solución fijadora: metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] y se destiñeron con solución de ácido acético 10% (v/v) durante toda la noche.

### *B.2.4 Cuantificación de proteínas*

El contenido de proteínas se estimó por el método de Bradford, el cual utiliza el colorante Coomassie Blue G-250 como reactivo. La técnica se basa en el cambio de longitud de onda del máximo de absorción del Coomassie Blue G-250 libre (465 nm) al unirse a proteínas (595 nm). En las condiciones ensayadas, el límite de detección de esta técnica es cercano a los 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Como estándar se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) con la que se realizó una curva de calibración. Las medidas se realizaron por duplicado, en microcubetas de 1 mL. La solución de reacción contenía 990  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford Protein Assay y 33  $\mu\text{L}$  de solución de proteína. La reacción se dejó transcurrir durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se midió la absorbancia a 595 nm en un nanofotómetro (Implen, Isaza, Portugal) que también sirve de espectrofotómetro con cubetas.

### *B.2.5 Estudio de la capacidad inhibidora de tripsina del oPTI*

Los ensayos de inhibición de tripsina bovina (Sigma) se llevaron a cabo a pH 8 y 37°C; condiciones óptimas de reacción de la tripsina. Las soluciones de la enzima y el IPP recombinante (oPTI) fueron preparadas en agua MiliQ. Durante los experimentos la concentración de sustrato (10  $\mu\text{M}$ ) se mantuvo siempre mayor que la de enzima (0,3 nM), condición saturante o de velocidad inicial máxima de Michaelis-Menten. Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas transparentes de 96 pocillos (Costar,

Corning Life Sciences). Todas las medidas fueron realizadas por triplicado en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  y los cambios de intensidad, medidos a una longitud de onda de excitación de 410 nm, fueron registrados en un lector de placas (Infinite M200 PRO, TECAN).

PARTE CEXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE IPPS EN CULTIVOS *IN VITRO* DE PAPAS ANDINAS**C.1 Análisis de expresión de genes**

La investigación de la expresión de los genes es un paso inicial y esencial para entender la función de un gen dentro de un contexto fisiológico. Para ello una técnica esencial que se utiliza para evaluar dichos estudios es la PCR en tiempo real o qPCR. Los ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) son reproducibles, cuantitativos, y rápidos. Ellos pueden ser adaptados al estudio de especies de plantas modelo y plantas que no son modelo, sin la necesidad de tener toda la información a disposición sobre la secuencia del genoma o del transcriptoma. En éste trabajo se provee de un protocolo para un ensayo de qPCR de confianza, el cual puede ser fácilmente adaptado a cualquier especie de planta de interés. Se describe el diseño de la estrategia de qPCR y el diseño de cebadores, consideraciones para la generación del material vegetal, preparación del ARN y síntesis de cADN, preparación de la qPCR y su respectiva corrida, y el análisis de la información de la qPCR, interpretación, y presentación final (Abdallah y Bauer 2016).

En esta parte del trabajo se pretende cuantificar los niveles de expresión de genes de IPPs serénicos, frente a diferentes situaciones de stress abiótico. Para ello se utilizará como muestra todos los órganos de las vitroplantas obtenidas.

Para realizar los ensayos anteriormente mencionados, las papas andinas de las variedades Overa y Chacarera fueron crecidas en cámara de cultivo (Aralab Fitoclima 10000EHF) a 25 °C y 80% de humedad con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Luego, a partir de una planta de cada variedad, se realizó el cultivo *in vitro* para evitar la variabilidad genética entre las mismas. Se realizó la desinfección de las plantas con etanol al 70% durante 1 min, 3 lavados con agua destilada estéril, un lavado con Hipoclorito de Sodio al 2% durante 5 min y por último 3 lavados más con agua destilada estéril. Para los cultivos *in vitro* se utilizó como medio Murashige y Skoog 4,4 g/L, de sacarosa 30 g/L, 6-benzilamino-purina (BAP) 120 µg/L, agar 7 g/L y pH entre 5,5 – 5,7. Las condiciones fueron 25 °C, 50% de humedad y 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Se dejaron crecer los explantos durante 1 mes. Debido a que la

variedad Chacarera presentó demasiadas contaminaciones y no se podía llegar al número deseado de vitroplantas para realizar los ensayos, se realizaron los ensayos solamente con la variedad Overa.

### *C.1.1 Fase 0: preparación de la planta madre*

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se obtuvieron explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantos fue recomendable mantener a la planta madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que osciló alrededor de los 2 meses en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultivaron las plantas en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

### *C.1.2 Fase 1: desinfección del material vegetal*

Una vez elegida la planta madre, se extrajeron los fragmentos a partir de los cuales se obtuvieron los explantos (yemas). Antes de extraer los explantos se hizo una desinfección de los fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes fueron los hongos y las bacterias que habitaban en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debió mantener en condiciones de asepsia.

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajó en cabinas de flujo laminar para extraer los explantos a partir del material vegetal. Estos explanteos se introdujeron en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con etanol al 70% durante 1 min, 3 lavados con agua destilada estéril, luego con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial) diluido al 2% durante un período de 5 min, seguido por 3 enjuagues en agua estéril.

### *C.1.3 Fase 2: introducción del material in vitro*

Luego de la desinfección superficial, las yemas se pusieron en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comenzó el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

### *C.1.4 Fase 3: multiplicación de los brotes*

Durante esta fase se esperó que los explantos que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. El número de plantas que se obtuvo dependió de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo.

### *C.1.5 Fase 4: elección de un medio de enraizamiento de los explantos*

Para enraizar los explantos no se necesitó pasar por esta etapa y emitieron sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollaron yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurrieron en forma simultánea.

### *C.1.6 Fase 5: aclimatación de los explantos enraizados*

Los explantos fueron muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito de todo el proceso, dependió de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrieron cambios de diferente tipo que permitieron la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extrajeron los explantos o plantines enraizados de los tubos, estuvieron poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantos enraizaron y crecieron en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tuvieron estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explanto. Por otra parte, al haber crecido en ambientes tan húmedos también implicó la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

### *C.1.7 Fase 6: Tratamientos de los explantos*

Los explantos fueron tratados de diferentes maneras luego de haberlos dejado crecer 1 mes en la cámara de cultivo. El día 31, se sometieron los plantines a los distintos tratamientos descriptos más adelante y se dejaron crecer nuevamente en la cámara de cultivo durante 24 hs o 48 hs, según el caso. Luego de esperar 24 hs o 48 hs, se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción del ARN de cada explanto.

Los diferentes tratamientos se obtuvieron por duplicado y se nombraron de la siguiente manera:

**Muestra 1:** Control 0 hs sin tratamiento.

**Muestra 2:** Tratamiento con disolvente de Metil Jasmonato (MEJA) por 24 hs.

**Muestra 4:** Tratamiento con MEJA por 24 hs.

**Muestra 6:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas por 24 hs.

**Muestra 7:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas y disolvente de MEJA por 24 hs.

**Muestra 8:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas y MEJA por 24 hs.

**Muestra 9:** Tratamiento con disolvente de MEJA por 48 hs.

**Muestra 10:** Tratamiento con MEJA por 48 hs.

**Muestra 11:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas por 48 hs.

**Muestra 12:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas y disolvente de MEJA por 48 hs.

**Muestra 13:** Tratamiento con agujas descartables originando heridas en las hojas y MEJA por 48 hs.

Las muestras 3 y 5, sufrieron contaminación bacteriana y es por esta razón que no se listan. La solución de MEJA constó de: 2,5% etanol, 0,1% Tween y 100  $\mu$ M MEJA como concentraciones finales de cada uno. Cuando cada planta fue recolectada, se procedió a congelar cada vitro planta entera en nitrógeno líquido y a procesarlas con un mortero y un pistón para producir un fino polvo y así proceder a la extracción de ARN utilizando

el kit Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (USA, Nr. #74904), siguiendo las instrucciones del mismo. La cantidad y calidad del ARN se midió mediante espectrofotometría de UV, utilizando un nanofotómetro (Implen, Isaza, Portugal). Fue sintetizado cDNA de simple hebra utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas UAB, Cat.Nr. #K1612) en un termociclador (VWR, Doppio, Bélgica), de acuerdo a las instrucciones del mismo.

Mediante el secuenciado de fragmentos clonados identificados con inhibidores de serín proteasas se diseñaron cebadores para obtener un producto de qPCR equivalente entre 100-200 pb con un “*annealing*” de los cebadores de 60°C. Se llevaron a cabo las reacciones de qPCR en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con las siguientes condiciones de reacción: 10 min a 95°C y 30 ciclos con 15 seg a 95°C, 15 seg a 60°C, y 15 seg a 70°C. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando 0,5 µM de cada primer mezclado en 12,5 µM de 2xPCR iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y con 120 ng de cDNA en un volumen final de 20 µL. Se procedió a realizar la muestra por duplicado para el gen del inhibidor, así como también para los controles. Los controles negativos de la qPCR fueron realizados con el control negativo de la RT-PCR sin muestra y además también un control negativo con agua. Se calculó la misma concentración de RNA de la muestra a utilizar para realizar la RT-PCR, y así luego, proceder a realizar la qPCR. Los ensayos se realizaron en una placa multiwell blanca de 96 pocillos.

Se utilizó el método CT (del inglés *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ; Livak y Schmittgen, 2001) para la cuantificación relativa de los valores de expresión de del gen de interés usando como genes de referencia el gen de actina y de la proteína ribosomal del ARN 18 S y a las plantas sin tratamiento alguno como muestras controles. Los datos fueron analizados utilizando el software CFX Manager™ versión 3.1 (Bio-Rad).

PARTE D

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE IPPS DE PAPAS ANDINAS

**D.1 Ensayos microbiológicos**

Se ha informado en la bibliografía que los inhibidores de proteasas de origen vegetal tienen efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos patógenos, convirtiéndolos en promisorios agentes antimicrobianos (Malmström *et al.*, 2009; Jin-Young *et al.*, 2005). Por ese motivo se han realizado algunos ensayos preliminares sobre la capacidad antimicrobiana *in vitro* de inhibidores de proteasas frente a distintas cepas de importancia clínica, agronómica y alimentaria.

*D.1.1 Ensayos turbidimétricos*

Para los ensayos microbiológicos, se emplearon los ECs tratados térmicamente (TT). La actividad antimicrobiana de los extractos TT60, TT70, TT80 y TT90 fue ensayada frente a cepas ATCC modelo de *Staphylococcus aureus* (Gram positivo), *Escherichia coli* (Gram negativa), *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Los ensayos se realizaron incubando los extractos en medio de cultivo líquido (Tripteína Soja Caldo, TSC) a 37°C con las distintas cepas bacterianas. Los cultivos bacterianos fueron incubados en caldo nutritivo durante 24 horas a 37°C. Para cada cepa bacteriana se agregaron 100 µL de cultivo bacteriano a 3 tubos de hemólisis conteniendo cada uno 2,5 mL de caldo tripteína soja y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Luego del tiempo mencionado se agregó formol en el primer tubo, nada en el segundo (testigo no inhibido) y 200 µL de solución proveniente de los distintos extractos y se incubaron durante 20 horas. Los tubos fueron examinados en base a la evidencia macroscópica de crecimiento visualizada por la presencia de turbidez, velo o sedimento. La densidad microbiana se determinó en forma indirecta a partir de la medición de los valores de absorbancia de los tubos a 650 nm antes y luego de la incubación durante 20 horas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano por acción de los extractos de acuerdo a la fórmula de Ballows (1976):

$$I\% = 100 - (Am_{20} - A_0 / Am_{ni\ 20} - A_0 * 100)$$

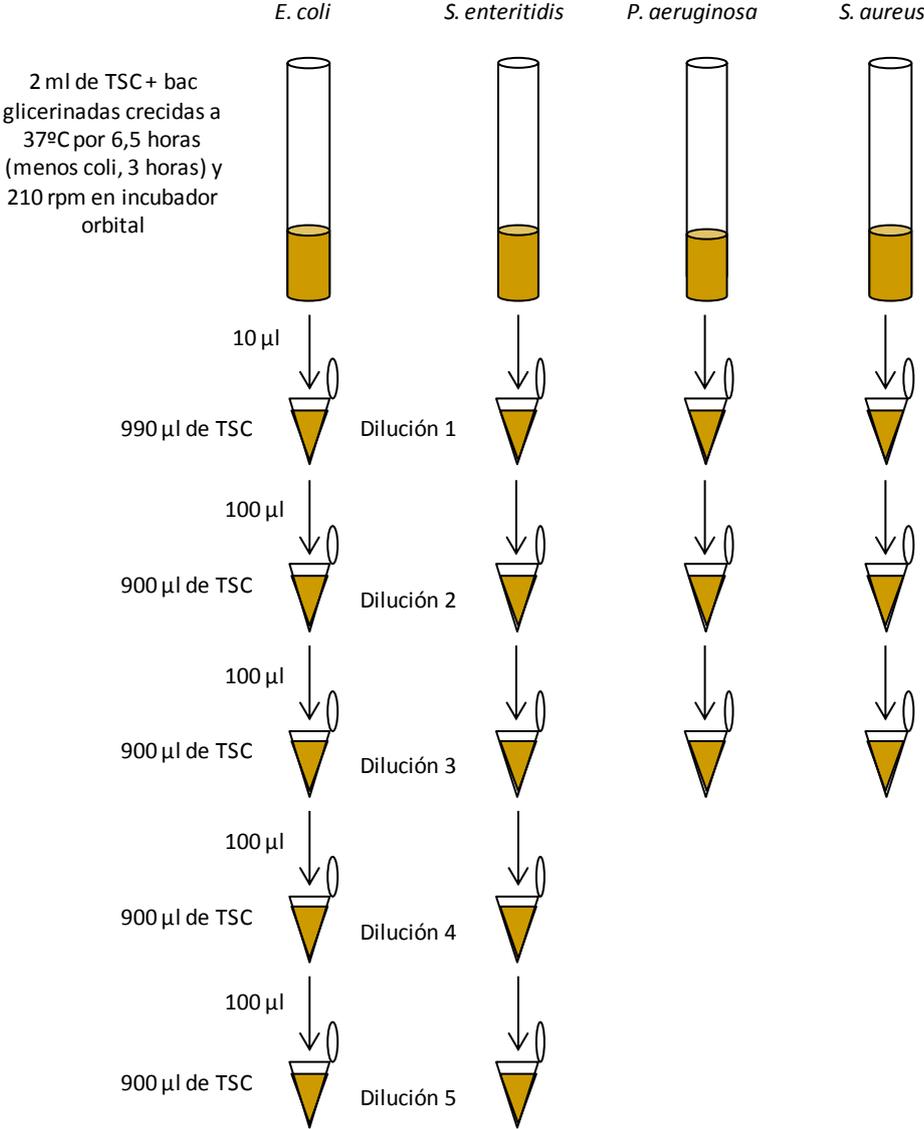
Dónde: Am= densidad óptica (650 nm) del cultivo bacteriano en presencia de los antimicrobianos luego de 20 horas de incubación. Am-ni 20= densidad óptica (650 nm) del cultivo bacteriano no inhibido luego de 20 horas de incubación. A0= densidad óptica (650 nm) antes de la incubación.

### *D.1.2 Ensayos de recuento en placa*

En ensayos posteriores, se realizaron recuento en placa de las UFC (unidades formadoras de colonias) de las bacterias anteriormente mencionadas. El esquema de trabajo desarrollado para el ensayo de recuento en placa de las UFCs de las 4 bacterias ATCC con y sin extractos crudos tratados térmicamente a 60°C se muestra a continuación:

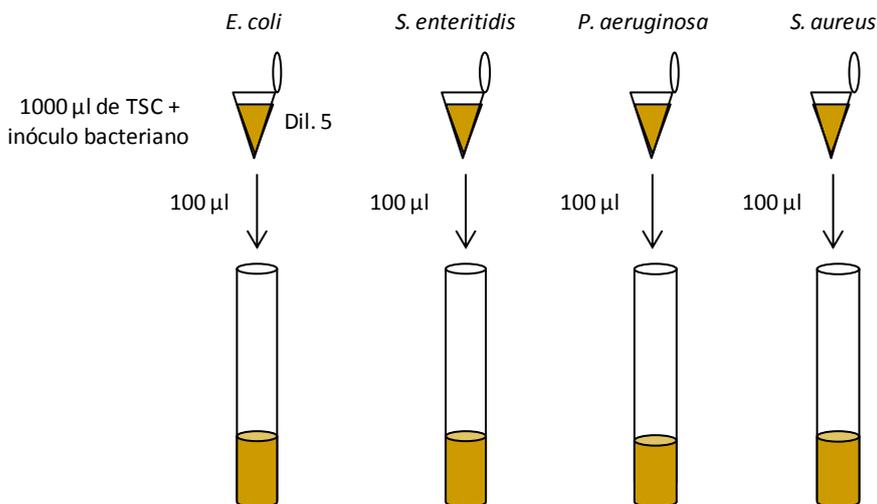


**Preparación del inóculo bacteriano**



**2**

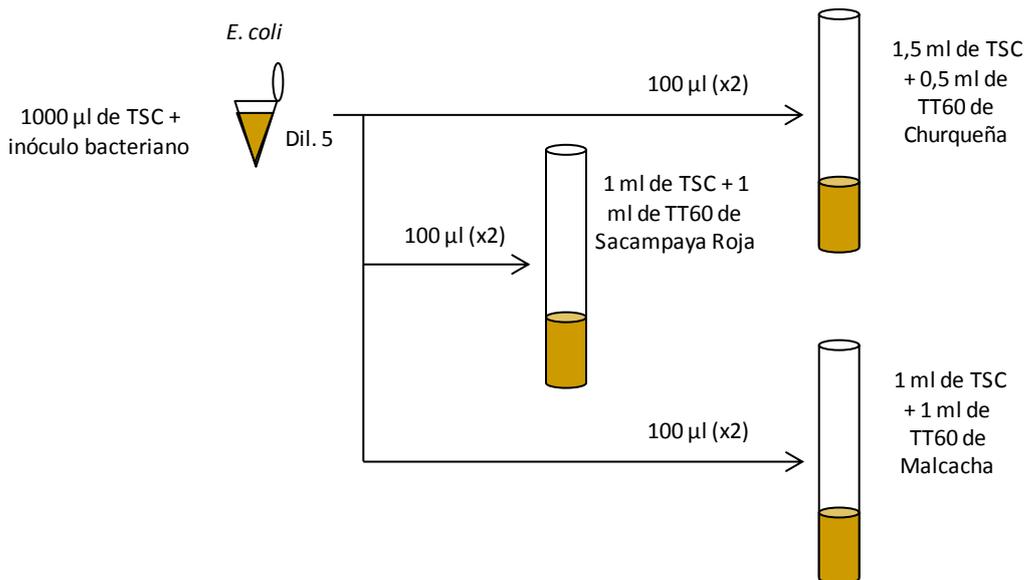
**Preparación de los ensayos "control"**



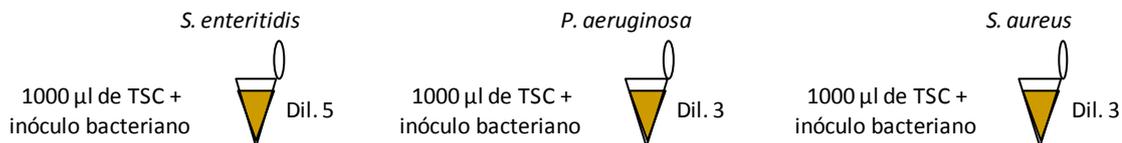
2 ml de TSC + inóculo crecidas a 37°C por 2,5 horas aprox. Y 210 rpm en incub. orbital

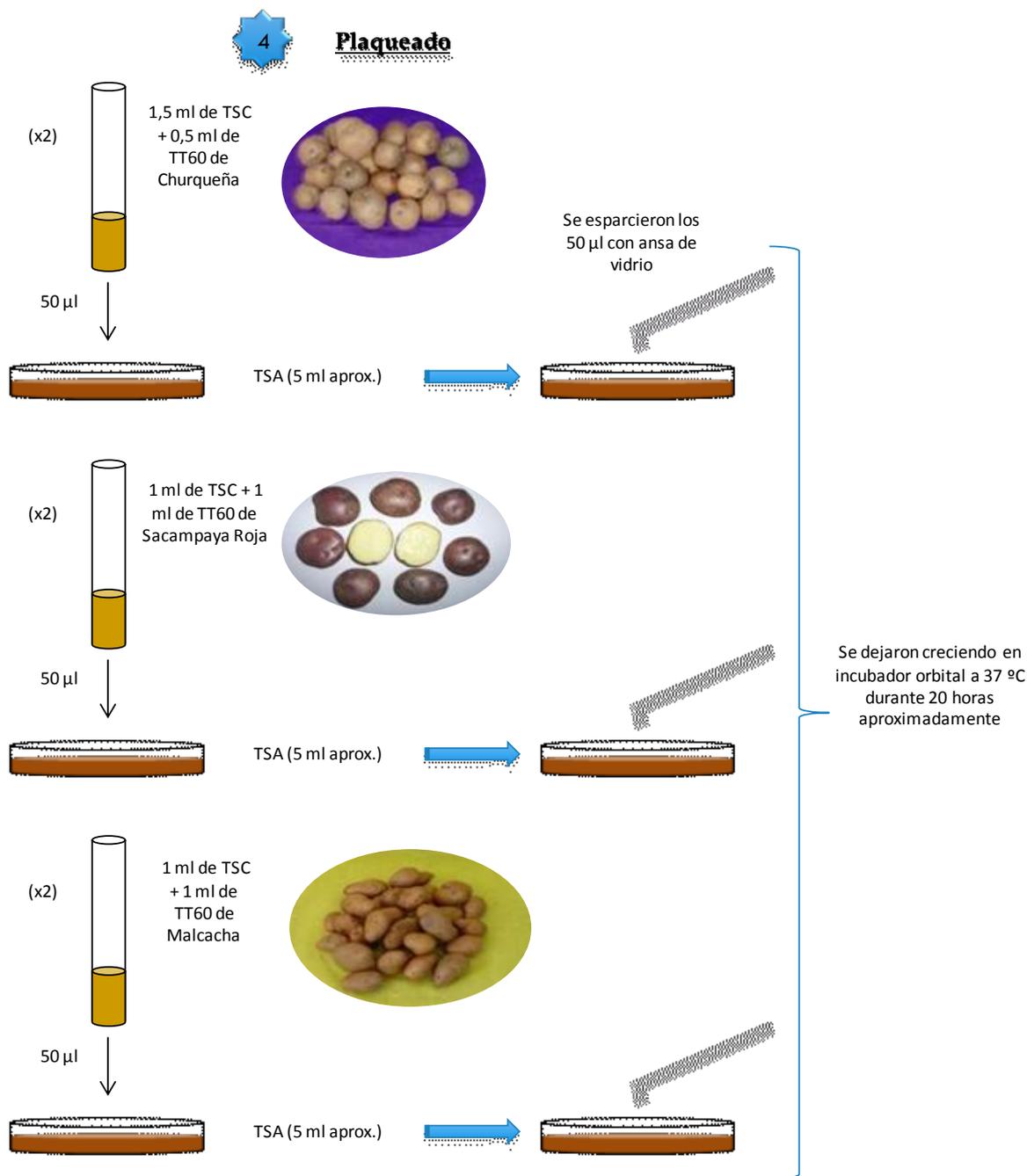
**3**

**Adición de las muestras a los inóculos**



De la misma manera se procedió con las demas bacterias:





### D.1.3 Actividad inhibitoria sobre un fitopatógeno mediante confrontación dual

Se estudió también la actividad inhibitoria del crecimiento micelial de cepas de *Phytophthora capsici* provistas por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Luján por efecto de los IPPs, de acuerdo a la metodología de confrontación dual. Se empleó medio V8 (preparado con un 34% de jugo comercial V8, 8 vegetales de Campbell y un 3% de agar) para el desarrollo de esta cepa. Se recortaron discos del pseudohongo (6 mm de diámetro) y se incubaron en las soluciones con los distintos

inhibidores peptídicos, se colocaron en el centro de pequeñas placas de Petri y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días. Se midió la actividad de los IPPs por la medida de inhibición del desarrollo micelial del pseudohongo ensayados a lo largo del tiempo de incubación en comparación con la placa control (disco de incubado en buffer).

### *D.1.4 Ensayos antimicrobianos mediante halos de inhibición*

#### Materiales:

- Tubos con suero fisiológico (0,85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada estéril).
- Hisopos estériles.
- Medio de cultivo. Se utilizó Tripteína Soja Agar (TSA). El medio TSA posee una concentración baja de iones divalentes y no debe ser suplementado para obtener concentraciones fisiológicas. Este medio no es el recomendado por la NCCLS, pero en medio TSA crecen mejor la mayor parte de las bacterias patógenas. El pH del medio debe ajustarse alrededor de 7, debe almacenarse a 2-8°C y utilizarse dentro de los 7 días siguientes a su preparación. El medio debe dejarse a temperatura ambiente unas dos horas antes de utilizarlo. Si existe agua en la superficie del agar, las placas pueden colocarse en el incubador.
- Volúmenes de muestra (10 µL). Se deben guardar a -20°C y dejarlos a temperatura ambiente hasta descongelarlos antes de utilizarlos. El deterioro de la muestra puede ocurrir si es sometida a frecuentes fluctuaciones de temperatura.

#### Método:

La detección de la actividad antimicrobiana del oPTI fue llevada a cabo de acuerdo al método descrito por Van Reenen (Van Reenen *et al.*, 1998) contra varios microorganismos, con modificaciones.

Se realizaron ensayos de inhibición de microorganismos mediante el método del halo de inhibición, utilizando como muestra el sobrenadante obtenido de la expresión del IPP maduro de la variedad Overa de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum*.

Para la determinación del antibiograma en placa en estafilococos, enterococos, enterobacterias y bacilos gram-negativos no fermentadores se utilizó el siguiente procedimiento:

### Preparación del inóculo:

Método de suspensión directa de colonias: A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas se repicaron varias colonias con un ansa y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland utilizando suero fisiológico. Se agitó en un agitador "vortex" durante 15-20 segundos. Este método es el más adecuado para microorganismos de crecimiento difícil en medios líquidos.

### Microorganismos ensayados:

Se ensayaron los antibiogramas con los siguientes microorganismos que estaban a disposición en el laboratorio:

- 1) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- 2) *Enterococcus faecalis* DSMZ 12956
- 3) *Enterococcus faecium* DSMZ 13590
- 4) *Enterococcus flavescens* DSMZ 7370
- 5) *Enterococcus gallinarum* DSMZ 20628
- 6) *Enterococcus casseliflavus* DSMZ 20680
- 7) *Salmonella braenderup*
- 8) *Salmonella enteritidis* NCTC 5188
- 9) *Salmonella tiphymurium* IPIMARSD 28
- 10) *Escherichia coli* ATCC 8739
- 11) *Klebsiella pneumoniae*
- 12) *Proteus vulgaris*
- 13) *Pseudomonas aeruginosa* ESB 03
- 14) *Bacillus cereus* ATCC 11778
- 15) *Bacillus subtilis* NCTC 3610
- 16) *Bacillus stearothermophilus*
- 17) *S. aureus* ATCC 29213
- 18) *Listeria monocytogenes* 7946
- 19) *Listeria monocytogenes* 7947
- 20) *Staphylococcus aureus* 18 N (mrsa)
- 21) *Staphylococcus aureus* 2037 M1 (MSSA)
- 22) *Yersinia enterocolitica* ref
- 23) *Listeria innocua* 2030 C

- 24) *Yersinia enterocolitica*
- 25) *Candida albicans*
- 26) *Sacharomyces cerevisiae*
- 27) *Proteus spp (mirabilis)*
- 28) *Acinetobacter baumannii* (sensible)
- 29) *Acinetobacter baumannii* (resistente)
- 30) *Acinetobacter calcoaceticus* (resistente)
- 31) *Acinetobacter calcoaceticus* (sensible)

### Reproducibilidad:

El medio de Tripteína Soja Agar (TSA), presenta una buena reproducibilidad entre fabricantes. La reproducibilidad está condicionada a la correcta estandarización de la metodología y a la utilización de controles de calidad.

### Inoculación de las placas:

Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

Se inocularon las placas de TSA completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consiguió deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar la muestra.

### Dispensación de la muestra:

Se colocaron las muestras con material volumétrico estéril. Se debió asegurar que contacte todo el volumen perfectamente con la superficie del agar sin desparramarse. No se situaron a menos de 15 mm del borde de la placa, y fueron distribuidos de forma que no se produjo superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearon más de 12 muestras.

Se incubaron las placas invertidas (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas, a 37 °C en atmósfera aeróbica antes de que transcurrieran 15 minutos. Las placas se incubaron entre 18 y 24 horas.

Interpretación: El término *sensible* (+) indica que el crecimiento de la cepa para la que se ha determinado su correspondiente halo de inhibición, puede verse afectada en cuanto a su crecimiento en el medio de cultivo utilizado.

El término *resistente* (-) se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones usadas del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

### Lectura de los resultados:

Después de 18-24 horas de incubación se observaron los diámetros de las zonas de completa inhibición. Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Como regla general, no debe considerarse aquellas colonias diminutas que aparecen en el halo de inhibición y que han sido visualizadas mediante luz transmitida o con ayuda de una lupa.

### Control de calidad:

Control del inóculo: Se utiliza un MacFarland 0,5. Para prepararlo se emplea 0,5 mL de 0,048 M de  $\text{BaCl}_2$  (1,175%  $\text{BaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 99,5 mL de 0,18 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v) con agitación constante. La absorción a 625 nm ha de estar entre 0,08 y 0,10 de absorbancia (comprobar cada mes). Alícuotas de 4 a 6 mL se distribuyen en tubos con tapón de rosca y se guardan en la oscuridad a temperatura ambiente.

## **CONCLUSIONES**

La investigación de los inhibidores de proteasas de origen vegetal es cada vez más importante en los últimos años en la industria alimenticia y farmacológica, en virtud de su posible aplicación biotecnológica.

El objetivo general de este trabajo fue el estudio de nuevos inhibidores de proteasas obtenidos a partir de papas andinas. La fuente vegetal utilizada pertenece a una familia ya estudiada, no obstante, en los objetivos de esta tesis se planteó la posibilidad de encontrar nuevas moléculas de naturaleza polipeptídica que tengan alguna diferencia en la estructura primaria con respecto a las ya estudiadas, analizar la expresión de genes que no han sido estudiados para algunos de los inhibidores reportados en literatura y además realizar ensayos preliminares que permitan evaluar las potenciales propiedades antimicrobianas de los IPPs para su empleo en la conservación de alimentos.

Las estrategias de purificación, clonación y expresión recombinante, así como la caracterización de los inhibidores nativos y expresados, complementan la base de este estudio.

La caracterización de los inhibidores estuvo acompañada de técnicas proteómicas y electroforéticas, así como por la inmovilización covalente de proteasas para el diseño de matrices de afinidad para la captura de inhibidores de extractos proteicos.

Además, el trabajo de tesis fue acompañado de la tecnología necesaria, muchas veces no disponible en nuestro laboratorio. Por tal motivo, se contó con colaboraciones de otros laboratorios que brindaron su ayuda, no solo a través de sus servicios y sus recursos económicos, sino también para permitir las estancias científicas que proporcionaron la mayor parte de los resultados obtenidos.

En este sentido, se debe agradecer la enorme colaboración que han brindado el Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de Proteínas de la Universitat Autònoma de Barcelona donde se realizó una estancia de 3 meses; y al Laboratorio Plantech de la Escola Superior de Biotecnologia de la Universidade Católica Portuguesa de Porto donde se pudo realizar una estancia de investigación de 10 meses.

Por otro lado muchos ensayos también fueron realizados en el Laboratorio de Química Biológica perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján.

En este trabajo se encontró que las preparaciones de extractivos crudos presentaron una buena estabilidad en un rango amplio de temperatura, de pH y concentraciones de NaCl. En este sentido, se observó que los IPPs analizados, que fueron extraídos de los tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla Negra, tienen estabilidad frente a: temperaturas de hasta 70°C, valores de pH entre 2 y 10 y concentración salina elevada (2M).

Una de las características más representativas de los inhibidores de proteasa de masa molecular inferior a 30 kDa es la estabilidad estructural a altas temperaturas. Se encontró que los extractos crudos que recibieron tratamientos térmicos a temperaturas iguales o superiores a 70°C (TT70, TT80 y TT90) utilizados como primera etapa de purificación, no sólo perdían otros contaminantes sino que aumentaban su actividad inhibitoria específica frente a la proteasa serínica tripsina. Como siguiente estrategia alternativa para purificar los inhibidores, se decidió inmovilizar tripsina para poder realizar una cromatografía de afinidad. La purificación de la fracción TT70 por esta técnica permitió aislar una fracción activa retenida por la columna. Para la identificación del compuesto peptídico, se emplearon herramientas proteómicas. Se realizó la digestión trípica de la fracción retenida de la columna de afinidad e inmediatamente después la huella peptídica que fue analizada con la herramienta de búsqueda Mascot. El análisis de los espectros y sus respectivas identificaciones muestran que el compuesto aislado no tiene 100% de identidad con alguno de los inhibidores identificados en bases de datos, sugiriendo el aislamiento de un nuevo inhibidor de tripsina de plantas, no reportado aún en bases de datos. Aplicando las técnicas ómicas PMF-MALDI-TOF/MS y secuenciación *de novo* por MALDI-TOF-TOF/MS/MS fue posible identificar al menos un nuevo inhibidor de proteasa de 12 kDa. Podemos afirmar que la incorporación de nuevas tecnologías ómicas es de vital importancia para la identificación y caracterización de nuevos IPPs. Posteriormente el perfil electroforético del pico retenido mostró dos bandas polipeptídicas con masas moleculares aparentes de 8 kDa y 15 kDa aproximadamente. La confirmación de las masas moleculares fue realizada por MALDI-TOF/MS arrojando los valores de masas moleculares de 7,4 kDa y 12,5 kDa para cada uno de los posibles iso-inhibidores de la variedad Imilla Negra.

Se aplicaron técnicas de biología molecular para poner a punto diferentes procedimientos biotecnológicos como extracción de ARN, síntesis de ADNc, diseño de cebadores específicos y las diferentes técnicas de PCR teniendo en cuenta todas las

variables posibles, con sus respectivas confirmaciones en geles de agarosa a distintos porcentajes, etc. Los pasos subsiguientes consistieron en ligar, transformar y clonar fragmentos de ADN que identifiquen con inhibidores de serín proteasas. Se clonaron 2 nuevos inhibidores de serín proteasas de 2 variedades diferentes de papas andinas (Chacarera y Overa), denominados oPTI y chPTI, las cuales no aparecen en base de datos de la especie *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* o *Solanum tuberosum* subsp. *andígena*.

Los siguientes parámetros fisicoquímicos teóricos fueron observados en el oPTI maduro: peso molecular de 7868,17 Da y punto isoeléctrico de 8,01. En lo que respecta a su forma de preproteína (107 aminoácidos, desde la secuencia del péptido señal), su peso molecular es de 11960,93 Da y su pl de 5,63; y en lo que respecta a su forma de proproteína (84 aminoácidos), su peso molecular es de 9349,80 Da y su pl de 5,77.

Los parámetros fisicoquímicos teóricos del chPTI maduro son: peso molecular de 8042,37 Da y punto isoeléctrico de 8,76; para su forma de preproteína (107 aminoácidos, desde la secuencia del péptido señal), su peso molecular es de 12163,19 Da y su pl de 6,58. Y en lo que respecta a su forma de proproteína (84 aminoácidos), su peso molecular es de 9552,05 Da y su pl de 7,99.

Las secuencias de los inhibidores cuentan además con un solo puente disulfuro conformado por 2 cisteínas (41 y 87), presentando características similares a los inhibidores de proteasas serínicas de tipo I (Cleveland, 1987), y muy cercanos estructuralmente a los inhibidores de tipo Kunitz.

Luego de la clonación se transformaron *E.coli* de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido recombinante pHTP1 en forma exitosa, y luego se indujo la expresión del oPTI cultivando las colonias transformadas en presencia de IPTG. Además, se probó sobreexpresar el oPTI en casi las mismas condiciones de cultivo, sólo haciendo una pequeña modificación; que fue cambiar la temperatura a 25°C luego del agregado de IPTG al cultivo. Esto fue útil para darse cuenta que la sobreexpresión es mucho más efectiva a 37°C. En ambos casos, el oPTI presentó buena actividad inhibitoria frente a tripsina.

Se pudo evaluar de manera cuantitativa la expresión diferencial de genes de IPPs bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Se encontró que bajo estrés generado mediante el agregado de MeJA, incrementaba notablemente la expresión de los genes de resistencia correspondientes a inhibidores de proteasas, pasadas las 48 horas de aplicación.

En los ensayos microbiológicos realizados con los extractos crudos por técnicas turbidimétricas, se encontró que aquellos que recibieron tratamiento térmico a 60°C presentaron un efecto inhibitorio del 20 al 30% de las cepas estudiadas, sin embargo los que recibieron tratamiento térmico a mayores temperaturas presentaban menor efecto inhibitorio en las cepas de *Staphylococcus aureus* (15% en TT70 y TT80) y *Pseudomona aeruginosa* (5% en TT80). En los ensayos realizados por recuento en placa, los extractos de papas andinas con tratamiento térmico a 60°C correspondientes a las variedades Churqueña y Sacampaya Roja produjeron inhibición moderada sobre cepas de *Escherichia coli* y el mayor efecto inhibitorio lo produjo la variedad Malcacha. Al evaluar la inhibición producida sobre cepas de *Salmonella enteritidis* se encontró que la variedad Churqueña no presentaba actividad inhibitoria pero los extractos de las otras variedades mostraban un moderado efecto. En forma similar, no se observó inhibición del crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* por la variedad Malcacha pero las variedades Churqueña y Sacampaya Roja mostraron una actividad antimicrobiana significativa. Finalmente, el efecto de inhibición más significativo fue producido por los extractos de las tres variedades sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se realizaron también ensayos de inhibición sobre el oomicete *Phytophthora capsici* por ser este un fitopatógeno que produce pérdidas económicas muy importantes en cultivos de nuestra región, en particular en berenjenas, pimientos rojos y zapallitos verdes. Se encontró que los ECs de IPPs de papas andinas tratadas térmicamente a 60°C, producía *inhibición completa del micelio* fúngico en los bioensayos de confrontación dual.

Por último, se realizaron ensayos de inhibición de microorganismos mediante el método de halos de inhibición, utilizando como muestra el sobrenadante obtenido de la expresión del IPP maduro de la variedad Overa de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum*. En los ensayos propuestos, se obtuvieron halos de inhibición en los siguientes microorganismos: *Salmonella braenderup*, *Salmonella enteritidis* (aquí el halo fue muy pequeño), *Salmonella tiphymurium*, *E.coli* ATCC, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Yersinia enterocolitica* de referencia, *Acinetobacter baumannii* (sensible), *Acinetobacter calcoaceticus* (resistente), *Acinetobacter calcoaceticus* (sensible) y *Acinetobacter baumannii* (sensible). Los resultados indicados en este estudio sugieren que los IPPs pueden ser excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

Con esta propuesta se pretende profundizar en las investigaciones iniciadas y ampliar el espectro de aplicaciones de los IPPs ya estudiados, así como buscar nuevos IPPs que tengan propiedades antimicrobianas. A pesar de que tradicionalmente los inhibidores de proteasas han sido catalogados como agentes antinutritivos, existe la posibilidad de utilizar estas moléculas en concentraciones adecuadas, como parte aditiva de alimentos, sin provocar un efecto negativo en la acción de las proteasas pancreáticas. En nuestros estudios se han encontrado una buena proporción de IPPs en la papa, el tomate, la berenjena y el morrón; todos pertenecientes a la familia *Solanaceae*. En cuanto a papa se refiere, cabe recordar que los inhibidores de proteasas son un 25% de las proteínas constituyentes de dichos tubérculos. Estos datos, sumados a sus notables estabilidades térmicas, sugieren que es muy probable que se estén ingiriendo los IPPs en muchas comidas que utilizan como base dichos alimentos. Muy recientes estudios de nuestro laboratorio han descubierto que muchos inhibidores de proteasas llegarían en buena proporción al colon y con sus estructuras estables, recorriendo todo el tracto digestivo sin pérdida apreciable de actividad. Por lo que un análisis a futuro podría ser investigar su biodisponibilidad a través del sistema digestivo y evaluar sus potenciales acciones biológicas, no sólo para su uso en personas sanas, sino también en personas con infecciones bacterianas y parasitarias (Cotabarren *et al.*, 2016).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah HB y Bauer P (2016). "Quantitative Reverse Transcription-qPCR-Based Gene Expression Analysis in Plants". *Methods Mol. Biol.*, 1363: 9-24.
- Acebo-González D y Hernández-García AT (2013). "Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida". *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Adams DJBE, Causier KJ, Mellor V, Keer R, Milling J, Dada (1993). "Regulation of chitin synthase and chitinase in fungi". In Muzzarelli R A A (ed.), *Chitin Enzy.*, 15-25.
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007). "ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*". *Plant Cell*, 19: 1665–1681.
- Agusti C, Takeyama K, Cardell LO, Ueki I, Lausier J, Lou Y, Nadel JA (1998). "Goblet Cell Degranulation after Antigen Challenge in Sensitized Guinea Pigs: Role of Neutrophils". *AJRCCM*, 158(4).
- Ahmad S, Van Hulten M, Martin J, Pieterse CM, Van Wees SC, Ton J (2011). "Genetic dissection of basal defence responsiveness in accessions of *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell Environ.*, 34: 1191–1206.
- Aissaoui N, Landoulsi J, Bergaoui L, Boujday S, Lambert JF (2013). "Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: Influence of the crosslinking agent". *Enzyme Microb. Technol.*, 52(6): 336-343.
- Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodríguez de la Vega M, González Y, Bronsoms S, Canals F, Delfín J, Diaz J, Aviles FX, Chávez MA (2009). "A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases." *FEBS J.*, 276(17): 4875-90.
- Alonso Nore LX y Poveda Sánchez JA (2008). "Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™3M™ para el análisis de alimentos". Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.
- Anderson JW (1968) "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues". *Phytochemistry*; 7 (11): 1973-1988.

- Annapurna SS, Ramadoss CS, Prasad DS (1991). "Characterization of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds". J. Sci. Food Agric., 54:605-618.
- Aslanidis C y de Jong PJ (1990). "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)". Nucleic Acids Res., 18(20): 6069-74.
- Arribas JR, Pulido F, Delgado R, Lorenzo A, Miralles P, Arranz A (2005). "Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study)". J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 40: 280–287.
- Asenjo JA y Merchuk JC (1995). "Bioreactor System Design". 1a Edición. New York-Basel-Hong Kong. Marcel Dekker, 479-509.
- Ather A (2009). "Identification, Cloning and Expression of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*". Master thesis in structural biology. Faculty of Science University of Tromsø.
- Ayensa MG, Montero MP, Borderías AJ, Hurtado JL (2002). "Influence of Some Protease Inhibitors on Gelation of Squid Muscle" JFS, 67(5).
- Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robotjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N (2007). "Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*". Process Biochemistry, 42:112-117.
- Ballows A (1976). "Automatización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, In Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos". Técnicas actualizadas por Ed. Médica Panamericana, 125-135.
- Baltimore D, Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD (1998). "HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes". Nature, 391:397-401.
- Barão S, Moechars D, Lichtenthaler SF, De Strooper B (2016). "BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease". Trends. Neurosci., 39(3): 158-69.
- Batista IF, Oliva ML, Araujo MS, Sampaio MU, Richardson M, Fritz H, Sampaio CA (1996). "Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds". Phytochemistry, 41(4): 1017-22.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method". Amer. J. Clin. Path., 45: 493-496.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bendtsen JD, Kierner L, Fausbøll A, Brunak S (2005). "Non-classical protein secretion in bacteria". *BMC Microbiol.*, 5: 58.
- Binford SL, Maldonado F, Brothers MA, Weady PT, Zalman LS, Meador JW (2005). "Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 619–626.
- Bobbarala V, Vadlapudi VR, Naidu CK (2009). "Antimicrobial potentialities of mangrove plant *Avicennia marina*". *J. Pharm. Res.*, 2(6): 1019.
- Bode W, Huber R (1992). "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases". *Eur. J. Biochem.*, 204(2): 433-51.
- Bodenhausen N y Reymond P (2007). "Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in *Arabidopsis*". *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20: 1406–1420.
- Bolivar JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, Mateo C (2006). "Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose". *J. Biotechnol.*, 125(1): 85-94.
- Botella MA, Xu Y, Prabha TN, Zhao Y, Narasimhan ML, Wilson KA, Nielsen SS, Bressan RA, Hasegawa PM (1996). "Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate". *Plant Physiol.*, 112(3): 1201-10.
- Boughton AJ, Hoover K, Felton GW (2006). "Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the Green peach aphid, *Myzus persicae*". *Entomol. Exp. Appl.*, 120: 175–188.
- Bradford M (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, 72: 248-54.
- Browse J (2009). "Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone". *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 183–205.
- Browse J y Howe GA (2008). "New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.*, 146: 832–838.
- Buzi A, Chilosi G, De Sillo D, Magro P (2004a). "Induction of resistance in Melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-

- S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid". *J. Phytopathol.*, 152: 34-42.
- Buzi A, Chilosi G, Magro P (2004b). "Induction of resistance in melon seedlings against soil-borne fungal pathogens by gaseous treatments with methyl jasmonate and ethylene". *J. Phytopathol.*, 152: 491–497.
  - Chanjirakul K, Wang SY, Wang CY, Siriphanich J (2006). "Effect of natural volatile compounds on antioxidant capacity and antioxidant enzymes in raspberries". *Postharvest Biol. Technol.*, 40: 106–115.
  - Chen Y, Song J, Sui S, Wang D (2003). "DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorS overexpressed in *Escherichia coli*". *Protein Expr. Purif.*, 32(2): 221-231.
  - Chen ZY, Brown RL, Russin JS, Lax AR, Cleveland TE (1999). "A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* alpha-amylase". *Phytopathology*; 89: 902–7.
  - Cheong JJ y Do Choi Y (2003). "Methyl jasmonate as a vital substance in plants". *Trends Genet.*, 19: 409–413.
  - Chibata I, Tosa T, Sato T (1986). "Biocatalysis: Immobilized cells and enzymes". *Journal of Molecular Catalysis*, 37(1): 1–24.
  - Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R (2007). "The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling". *Nature*, 448: 666–671.
  - Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006). "Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*". *CES*, 61: 876-885.
  - Chung IM, Park MR, Chun JC, Yun SJ (2003). "Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stress and hormones in peanut plants". *Plant Sci.*, 164: 103–109.
  - Chye MI, Sin SF, Xu ZF, Yeung EC (2005). "Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions". *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42: 100-108.
  - Cisneros JS, Tellechea M, Trejo SA, Avilés FX, Priolo NS, Obregón WD (2010). "Identificación por técnicas proteómicas de inhibidores de proteasas con potencial aplicación biomédica". *Bioeconomía e Innovación: un nuevo desafío*, IX Feria Congreso Latinoamericano de Biotecnología, IV Congreso Argentino de Biotecnología Organizado por el Foro Argentino de Biotecnología (FAB) y la

Federación Latinoamericana de Asociaciones de Empresas Biotecnológicas (FELAEB).

- Cisneros JS, Román MC, Rocha GF, Parisi M, Obregón WD (2013). “Caracterización de inhibidores de proteasas aislados de papas andinas (*Solanum tuberosum* subespecie *andigenum*) como potenciales moléculas nutraceuticas”. Dominguezia, 29: 127-128.
- Clemente A, Moreno FJ, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Domoney C (2010). “The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases”. Mol. Nutr. Food. Res., 54: 396-405.
- Clemente A, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Arques MC, Domoney C (2012). “The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition”. British Journal of Nutrition, 108: 135-144.
- Cleveland TE, Thornburg RW, Ryan CA (1987). “Molecular characterization of a wound-inducible inhibitor I gene from potato and the processing of its mRNA and protein”. Plant Mol. Biol., 8(3): 199-207.
- Cohen Y, Gisi U, Niderman T (1993). “Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester”. Phytopathology, 83: 1054–1062.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006). “Priming: getting ready for battle”. Mol. Plant Microbe Int., 19: 1062–1071.
- Cotabarren J, Tellechea ME, Rosso C, Bakás LS, Obregón WD (2016). “Nuevos inhibidores de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Capsicum annuum* L (Morrón Amarillo)”. CICYTAC 2016.
- Dahlgren A, Kvarnströma I, Vrangb L, Hamelinkb E, Hallbergc A, Rosenquist A, Samuelsson B (2003). "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmepsin I and II." Bioorg. Med. Chem., 11(16): 3423-37.
- Damle MS, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS (2005). "Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for

- differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree)". *Phytochemistry*, 66(22): 2659-67.
- Dar TA, Uddin M, Khan MMA, Hakeem KR, Jaleel H (2015). "Jasmonates counter plant stress: A Review". *EEB*, 115: 49–57.
  - Dash C, Kulkarni A, Dunn B, Rao M (2003). "Aspartic peptidase inhibitors implications in drug development". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 38: 89-119.
  - Davail S (1994). "Purification, characterization, and sequence of the heat-labile subtilisin from the Antarctic psychrophile *Bacillus ta41*". *J. Biol. Chem.*, 269(26): 17448-17453.
  - Davies DR (1990). "The structure and function of the aspartic proteinases". *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19: 189-215.
  - de las Rivas B, Curiel JA, Mancheño JM, Muñoz R. (2007). "Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins". *Biotechnol. Prog.*, 23(3): 680-6.
  - De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002). "PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes". *Nucleic Acids Res.*, 30(1): 347-8.
  - Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballare CL (2010). "Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense". *Plant Physiol.*, 152: 1084–1095.
  - Deshaies RJ (1999). "SCF and cullin/ring H<sub>2</sub>-based ubiquitin ligases". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15: 435–467.
  - Diaz ME; Rocha G, Torres Nágera MA, Guevara MG, Parisi M (2014). "Cytotoxic activity of an aspartic proteinase isolated from *Salpichroa organifolia* fruits". *Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)*.
  - Diaz ME, Carvajal C, Rocha G, Rosso A, Parisi M, Hernandez De La Torre M (2015). "Actividad antifúngica de proteasas de plantas". *Memorias del X Congreso de Biotecnología Vegetal, Bioveg 2015*. ISBN: 978-959-16-2045-3.
  - Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA (1995). "Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway". *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 92: 4095–4098.
  - Dombrowski JE (2003). "Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants". *Plant Physiol.*, 132: 2098–2107.

- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR (1996). "Optimizing inducer and cultura conditions for expression of foreign proteins under control of lac promoter". J. Ind. Microbiol., 16:145-154.
- Durrant WE y Dong X (2004). "Systemic acquired resistance". Annu. Rev. Phytopathol., 42: 185–209.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools". Nat. Protoc., 2(4): 953-71.
- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004). "Airborne signals prime plants against insect herbivore attack". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 101: 1781–1785.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008). "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability". PLoS ONE, 3(11): e3647.
- F.A.O. (2011). FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM (2003). "*Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4". Plant J., 35: 193–205.
- Ferreira L, Ramos MA, Gil MH, Dordick JS (2002). "Exquisite regioselectivity and increased transesterification activity of an immobilized *Bacillus subtilis* protease". Biotechnol. Prog., 18(5): 986-93.
- Figueiredo Neto M y Figueiredo ML (2016). "Skeletal muscle signal peptide optimization for enhancing propeptide or cytokine secretion". J. Theor. Biol., 409: 11-17.
- Fischer M, Kuckenberger M, Kastilan R, Muth J, Gebhardt C (2015). "Novel in vitro inhibitory functions of potato tuber proteinaceous inhibitors". Mol. Genet. Genomics, 290(1): 387-98.
- Frank K y Sippl MJ (2008). "High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques". Bioinformatics, 24: 2172–2176.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988). "Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002.

- Frost CJ, Mescher MC, Dervinis C, Davis JM, Carlson JE, De Moraes CM (2008). "Priming defense genes and metabolites in hybrid poplar by the green leaf volatile *cis*-3-hexenyl acetate". *New Phytol.*, 180: 722–734.
- Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC (2011). "Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance". *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16): 2885-2904.
- Gfeller A, Liechti R, Farmer EE (2010). "*Arabidopsis* jasmonate signaling pathway". *Sci. Signal.*, 3 doi:<http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.3109cm4>.
- Ghasemnezhad M y Javaherdashti M (2008). "Effect of methyl jasmonate treatment on antioxidant capacity: internal quality and postharvest life of raspberry fruit". *Caspian J. Env. Sci.*, 6: 73-78.
- Gidda KS, Miersch O, Schmidt J, Wasternack C, Varin L (2003). "Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*". *J. Biol. Chem.*, 278: 17895–17900.
- Gill SS y Tuteja N (2010). "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants". *Plant Physiol. Bioch.*, 48: 909–930.
- Gille G y Singler K (1995). "Oxidative stress in living cells". *Folia Microbiol.*, 2: 131-152.
- Giorno L y Drioli E (2000). "Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives". *Trends. Biotechnol.*, 18(8): 339-49.
- Gladysheva IP, Sharafutdinov TZ, Larionova NI (1994). "[High molecular weight soy isoinhibitors of the Bowman-Birk type. Isolation, characteristics, and kinetics of interaction with proteinases]". *Bioorg. Khim.*, 20(3): 281-9.
- Glazebrook J (2005). "Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens". *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 205–227.
- Godbole SA, Krishna TG, Bhatia CR (1994). "Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds". *J. Sci. Food Agric.*, 64:87-93.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1". *Nature*, 389(6646): 77-81.

- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research". *Biochemistry*, 5: 467–477.
- Goodwin SB (1997). "The populations' genetics of *Phytophthora*". *Phytopathology*, 87:462-473.
- Gordon E, Horsefield R, Swars H, De Pont J, Neutze R, Snijder A (2008). "Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*". *Protein Expr.Purif.*, 62: 1-8.
- Greenblatt HM, Ryan CA, James MN (1989). "Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution". *J. Mol. Biol.*, 205(1): 201-28.
- Grosse-Holz FM y van der Hoorn RA (2016). "Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants". *New Phytol.*, 210(3): 794-807.
- Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera E, Galán-Wong LJ, Viajen-Salvadó JM (2004). "Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura". VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Guisán JM, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, García-Junceda E (1997). "Immobilization of Enzymes on glyoxyl agarose". *Immobilization of Enzymes and Cells of the series Methods in Biotechnology*, 1: 277-287.
- Habib H, Fazili KM, Zargar MA, Ganie BA (2016). "Protease Inhibitor Associated Antimicrobial Activity of Pea *Pisum sativum*". *Arkel. Int. J. Pure App. Biosci.*, 4: 172-79.
- Halitschke R y Baldwin IT (2004). "Jasmonates and related compounds in plantinsect interactions". *J. Plant Growth Regul.*, 23: 238–245.
- Hanefeld U, Gardossi L, Magner E (2009). "Understanding enzyme immobilisation". *Chem. Soc. Rev.*, 38(2): 453-468.
- Hansen LH, Knudsen S, Sorensen SJ (1998). "The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*". *Curr. Microbiol.*, 36(6): 341-347.
- Hause B y Schaarschmidt S (2009). "The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms". *Phytochemistry*, 70: 1589–1599.
- Heering HA, Wiertz FG, Dekker C, de Vries S (2004). "Direct immobilization of native yeast Iso-1 cytochrome c on bare gold: Fast electron relay to redox enzymes and zeptomole protein-film voltammetry". *J. Am. Chem. Soc.*, 126(35): 11103-11112.

- Helfon S, Baird TT, Craick CS (2004). "Trypsin". Handbook of proteolytic enzymes, 452:1483-1488.
- Herveg, JP (2006). "Las bacterias y *Escherichia coli* (*E. coli*)". <http://genemol.org/biomolespa/bacterias/E-coli-01.html>.
- Hillenkamp F y Karas M (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization" Methods Enzymol., 193: 280-95.
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Munch R, Jahn D (2004). "PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions". Nucleic Acids Res., 32:W375–379
- Horn M, Patankar AG, Zavala JA, Wu J, Dolečková-Marešová L, Vůjtěchová M, Mareš M, Baldwin IT (2005). "Differential elicitation of two processing proteases controls the processing pattern of the trypsin proteinase inhibitor precursor in *Nicotiana attenuata*". Plant Physiol., 139(1): 375-88.
- Howe GA (2004). "Jasmonates as signals in the wound response". J. Plant Growth Regul., 23: 223–237.
- Huber A, Kainz C, Witzmann A, Beran H, Fischer J (1993). "Peri-operative elastase-alpha-1 proteinase inhibitor in patients with postoperative intervertebral discitis". Acta Neurochir., 120(3-4): 150-4.
- Huntington JA, Read RJ, Carrell RW (2000). "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation". Nature, 407(6806): 923-6.
- InfoStat. (2008). "Manual del Usuario". Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba (2nd ed.). Argentina: Editorial Brujas.
- Isenberg HD (1984). "Automated methods of bacterial testing". Annals of the New York Academy Sciences. 428(1): 236-242.
- Ivanov D, Ivanov D, Emonet C, Foata F, Affolter M, Delley M, Fisseha M, Blum-Sperisen S, Kochhar S, Arigoni F (2006). "A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases". J. Biol. Chem. 281(25): 17246-52.
- Iwanaga S, Yamasaki N, Kimura M (2005). "Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants." Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(1): 220-3.
- James DG (2005). "Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects". J. Chem. Ecol., 31: 481–495.

- Jensen PR, Westerhoff HV, Michelsen O (1993). "The use of *lac*-type promoters in control analysis". *Eur. J. Biochem.*, 211: 181-191.
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Stahl S (2002). "Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35: 91-105.
- Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL (2007). "Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server". *Nucleic Acids Res.*, 35: W429–W432.
- Kansal R, Kumar M, Kuhar K, Gupta RN, Subrahmanyam B, Koundal KR; Gupta VK (2008). "Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*". *Braz. J. Plant Physiol.*, 20(4): 313-322.
- Kapur R, Tan-Wilson AL, Wilson KA (1989). "Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the Mung Bean (*Vigna radiata*)". *Plant Physiol.*, 91(1): 106-12.
- Katz Y, Lebas FX, Medley HV, Robson R (1998). "Fluticasone propionate 50 µg BID versus 100 µg BID in the treatment of children with persistent asthma". *Clinical Therapeutics*, 20(3): 424-437.
- Khan MIR, Iqbal N, Masood A, Per TS, Khan NA (2013). "Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation". *Plant Signal. Behav.*, 8: 263–274.
- Kennedy AR, Wan XS (2002). "Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells". *Prostate*, 50: 125-133.
- Kim JY, Park SC, Kim MH, Lim HT, Park Y, Hahm KS (2005). "Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330: 921–927.
- Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, Park Y (2009). "Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity". *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 2860-2872.
- Koch T, Bandemer K, Boland W (1997). "Biosynthesis of *cis*-Jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase". *Helv. Chim. Acta*, 80: 838–850.

- Kramell R, Atzorn R, Schneider G, Miersch O, Bruckner C, Schmidt J, Sembdner G, Parthier B (1995). "Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue". *J. Plant Growth Reg.*, 14: 29–36.
- Kumar P, Ortiz EV, Garrido E, Poveda K, Jander G (2016). "Potato tuber herbivory increases resistance to aboveground lepidopteran herbivores". *Oecologia*, 182(1): 177-87.
- Kunitz M (1945). "Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean". *Science*, 101: 668-669.
- Kurland CG y Dong HJ (1996). "Bacterial growth inhibition by overproduction of protein". *Mol. Microb.*, 21: 1-4.
- Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P (2003). "An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus". *Nature*, 426: 186–189.
- Lane TS, Rempe CS, Davitt J, Staton ME, Peng Y, Soltis DE, Melkonian M, Deyholos M, Leebens-Mack JH, Chase M, Rothfels CJ, Stevenson D, Graham SW, Yu J, Liu T, Pires JC, Edger PP, Zhang Y, Xie Y, Zhu Y, Carpenter E, Wong GK, Stewart CN Jr (2016). "Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology". *BMC Biotechnol.*, 16(1): 47.
- Larsen MW, Bornscheuer UT, Hult K (2008). "Expression of *Candida antartica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems". *Prot. Expr. Purif.*, 62: 90-97.
- Laskowski M, Qasim MA (2000). "What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?". *Biochim. Biophys.*, 1477(1-2): 324-37.
- Ledoigt G, Griffaut B, Debiton E, Vian C, Mustel A, Evray G, Maurizisb JC, Madelmont JC (2006). "Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers". *Int. J. Biol. Macromols.*, 38: 268-71.
- Lee SK y Keasling JD (2008). "Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate inducible pPro system by conventional and auto-induction methods". *Prot. Expr. Purif.*, 61:197-203.
- Lin JY, Chu SC, Wu HC, Hsieh YS (1991). "Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*". *J. Biochem.*, 110(6): 879-83

- Macedo ML, Ribeiro SF, Taveira GB, Gomes VM, de Barros KM, Maria-Neto S (2016). "Antimicrobial Activity of ILTI, Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.)". *Curr. Microbiol.*, 72:538–44.
- Maccionia RB, Muñoz JP, Barbeitob L (2001). "The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders". *Arch. Med. Res.*, 32 (5): 367–381.
- Malcolm BA, Liu R, Lahser F, Agrawal S, Belanger B, Butkiewicz N (2006). "SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells". *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 1013–1020.
- Malmström E, Mörgelin M, Malmsten M, Johansson L, Norrby-Teglund A, Shannon O, Schmidtchen A, Meijers JCM, Herwald H (2009). "Protein C Inhibitor-A Novel Antimicrobial Agent". *PLoS Phathog.*, 5(12): e1000698.
- Mandaokar A, Thines B, Shin B, Lange BM, Choi G, Koo YJ, Yoo YJ, Choi YD, Choi G, Browse J (2006). "Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling". *Plant J.*, 46: 984–1008.
- Mares M, Meloun B, Pavlik M, Kostka V, Baudys M (1989). "Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family". *FEBS Lett.*, 251(1-2): 94-8.
- Marsischky G y LaBaer J (2004). "Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods". *Genome Res.*, 14(10B): 2020-8.
- Martínez Agustin O, Martínez de Victoria Muñoz E (2006). "Proteínas y péptidos en nutrición enteral". *Nutr. Hosp.* 21(2): 1-14.
- Martínez-Luaces V, Guineo-Cobs G, Velásquez B (2006). "Bifactorial Design Applied to Recombinant Protein Expression". *JDS*, 4: 247-255.
- Masood A, Iqbal N, Khan NA (2012). "Role of ethylene in alleviation of cadmium induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard". *Plant Cell Environ*, 35: 524–533.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". *Enz. Microb. Technol.*, 40(6): 1451-1463.
- Matthews BW (2005). "The structure of *E. coli* beta-galactosidase". *C. R. Biol.*, 328(6):549-56.

- Meenu Krishnan VG y Murugan K (2016). “*Solanum* protease inhibitors and their therapeutic potentialities: a review”. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8(12):14-21.
- Memelink J (2009). “Regulation of gene expression by jasmonate hormones”. *Phytochemistry*, 70: 1560–1570.
- Mendieta JR, Pagano MR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG (2006). “Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization”. *Microbiology*, 152(7): 2039-47.
- Mendieta JR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG (2007). “StAPs (*Solanum tuberosum* aspartic proteases) cytotoxic activity on human pathogens microorganisms”. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*, 6(5).
- Mignogna G, Pascarella S, Wechselberger C, Hinterleitner C, Mollay C, Amiconi G, Barra D, Kreil G (1996). “BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes”. *Protein Sci.*, 5: 357.
- Milstone AM, Harrison LM, Bungiro RD, Kuzmic P, Cappello M (2000). “A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*”. *J. Biol. Chem.*, 275(38): 29391-9.
- Miyajia T, Kouzumaa Y, Yaguchia J, Matsumotoa R, Kanostb MR, Kramerc KJ, Yonekura M (2007). "Purification of a cysteine protease inhibitor from larval hemolymph of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) and functional expression of the recombinant protein" *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(9): 960-8.
- Munjal N y Sawhney S (2002). "Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels". *Enz.Microb. Technol.*, 30(5): 613-619.
- Nisha S, Arun Karthick S, Gobi N (2012). “A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme”. *Che. Sci. Rev. Lett.*, 1(3): 148-155.
- Nissen MS, Kumar GN, Youn B, Knowles DB, Lam KS, Ballinger WJ, Knowles NR, Kang C (2009). "Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins". *Plant Cell*, 21(3): 861-75.
- Negreiros AN, Carvalho MM, Xavier Filho J, Blanco-Labra A, Shewry PR, Richardson M (1991). "The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*". *Phytochemistry*, 30(9): 2829-33.

- Obregón WD, Quiroga E, Barberis S, Priolo N (2008). "Aplicación de araujaína, libre e inmovilizada, a la síntesis enzimática de péptidos en medios bifásicos" Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones San Luis, Argentina.
- Obregón WD, Liggieri CS, Morcelle SR, Trejo SA, Avilés FX, Priolo NS (2009a). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases". *Protein Pept. Lett.*, 16(11): 1323-33.
- Obregón WD, Liggieri CS, Trejo SA, Avilés FX, Vairo-Cavalli SE, Priolo NS (2009b). "Characterization of papain-like isoenzymes from latex of *Asclepias curassavica* by molecular biology validated by proteomic approach". *Biochimie.*, 91(11-12): 1457-64.
- Obregón WD, Cisneros S, Tellechea M, Trejo S, Avilés FX, Priolo N (2010). "Nuevos inhibidores de proteasas aislados de distintas variedades de papas andinas". X Simposio Argentino y XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica.
- Obregón WD, Lufrano D, Liggieri CS, Trejo SA, Vairo-Cavalli SE, Avilés FX, Priolo NS (2011). "Biochemical characterization, cDNA cloning, and molecular modeling of araujain all, a papain-like cysteine protease from *Araujia angustifolia* latex". *Planta*, 34(2):293-304.
- Obregón WD, Ghiano N, Tellechea M, Cisneros JS, Lazza CM, López LMI, Avilés FX. (2012) "Detection and characterisation of a new metallocarboxypeptidase inhibitor from *Solanum tuberosum* cv. Desirée using proteomic techniques." *Food Chem.*, 133 (4): 1091-1672.
- Obregon WD, Cisneros JS, Ceccacci F, Quiroga E (2015). "A highly stable biocatalyst obtained from covalent immobilization of a non-commercial cysteine phytoprotease". *OMICS; J. Bioprocess. Biotech.*, 5(3): 1000211-1000211.
- Oliva ML, Souza-Pinto JC, Batista IF, Araujo MS, Silveira VF, Auerswald EA, Mentele R, Eckerskorn C, Sampaio MU, Sampaio CA (2000). "*Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema". *Biochim. Biophys.* 1477(1-2): 64-74.
- Oliveira MDL, Andrade CAS, Santos-Magalhaes NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS (2008). "Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity". *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(3): 371-6.

- Ottaviani JI, Actis-Goretta L, Villordo JJ, Fraga CG (2005). "Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition". *Biochimie*, 88: 359–365.
- Ou J, Huang Z, Zhao Y, Huang L (2013). "Genome-wide identification, functional analysis and expression profiling of pleiotropic drug resistance (PDR) sub-family in potato". *AJB*, 12(30): 4722-4729.
- Pagano MR, Mendieta JR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG (2007). "Roles of glycosylation on the antifungal activity and apoplast accumulation of StAPs (*Solanum tuberosum* aspartic proteases)". *Int. J. Biol. Macromol.*, 41:512-520.
- Paik D, Das P, Naskar K, Pramanik PK, Chakraborti T (2016). "Protective inflammatory response against visceral leishmaniasis with potato tuber extract: A new approach of successful therapy". *Biomed. Pharmacother.*, 83: 1295-1302.
- Palavalli MH, Natarajan SS, Wang TT, Krishnan HB (2012). "Imbibition of soybean seeds in warm water results in the release of copious amounts of Bowman-Birk protease inhibitor, a putative anticarcinogenic agent". *J. Agric. Food Chem.*, 60: 3135-3143.
- Panda SK, Chaudhury I, Khan MH (2003a). "Heavy metal induced lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves". *Biol. Plant.*, 46: 289–294.
- Park Y, Choi BH, Kwak JS, Kang CW, Lim HT, Cheong HS, Hahm KS (2005). "Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung)". *J. Agric. Food Chem.*, 53: 6491-6.
- Pastor V, Luna E, Mauch-Mani B, Ton J, Flors V (2013). "Primed plants do not forget". *Environ. Exp. Bot.*, 94: 46–56.
- Pastori GM y Foyer CH (2002). "Common components networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of Redox and abscisic acid-mediated controls". *Plant Physiol.*, 129: 460–468.
- Pearl LH (1987). "The catalytic mechanism of aspartic proteinases." *FEBS Lett.*, 214(1): 8-12.
- Pedranzani H, Racagni G, Alemano S, Miersch O, Ramirez I, Pena-Cortes H, Taleisnik E, Machado-Domenech E, Abdala G (2003). "Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid". *Plant Growth Reg.*, 41: 149–158.
- Pedro PM (1964). "Stabilization of enzymes". Google Patents.

- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions". *Nat. Methods*, 8: 785–786.
- Pieterse CMJ, Schaller A, Mauch-Mani B, Conrath U (2006). "Signaling in plant resistance responses: divergence and cross-talk of defense pathways". *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*, 166–196.
- Pouvreau L, Gruppen H, Piersma SR, van den Brock LAM, van Koningsveld GM, Voragen AGJ (2001). "Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana". *J. Agric. Food Chem.* 49: 2864–2874.
- Prakash B, Selvaraj S, Murthy MR, Sreerama YN, Rao DR, Gowda LR (1996). "Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors". *J. Mol. Evol.*, 42(5): 560-9.
- Purushottam, Singh SK, Chaudhary RG, Kumar R, Praharaj CS, Bal Krishna (2012). "Assessment of technological inputs for major pulses in Bundelkhand region". *Journal of Food Legumes*, 25(1): 61-65.
- Qi RF, Song ZW, Chi CW (2005). "Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application". *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 37(5): 283-92.
- Quiroga E, Camí G, Marchesec J, Barberis S (2007). "Organic solvents effect on the secondary structure of araujain HI, in different media". *Biochemical engineering journal*, 35(2): 198-202.
- Quiroga E, Illanes CO, Ochoa NA, Barberis S (2011). "Performance improvement of araujain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads". *Process Biochemistry*, 46(4): 1029-1034.
- Quiroga Campano AL (2010). "Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes". Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico. Universidad de Chile.
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR (2000). "Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death". *Plant Cell*, 12: 1633–1646.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). "Evolutionary families of peptidase inhibitors". *Biochem. J.*, 378(3): 705-16.
- Rawlings ND (2010) "Peptidase inhibitors in the MEROPS database." *Biochimie*, 92(11): 1463-83.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Reinbothe C, Springer A, Samol I, Reinbothe S (2009). "Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence". *FEBS J.*, 276: 4666–4681.
- Reyes Tena A, Rincón Eníquez G, López Pérez L, Evangelista Martínez Z, Quiñones Aguilar E (2015). "Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas". *Revista Digital Universitaria*, 16(11).
- Rice M, Hatherill M, Murdoch I (1998). "Rapid response to isoflurane in refractory status asthmaticus". *Arch. Dis. Child.*, 78(4): 395–396.
- Ritonja A, Krizaj I, Mesko P, Kopitar M, Lucovnik P, Strukelj B, Pungercar J, Buttler DJ, Barrett AJ, Turk V (1990). "The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato". *FEBS Lett.*, 267(1): 13-5.
- Roberts SB (2002). "γ-Secretase inhibitors and Alzheimer's disease". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(12): 1579–1588.
- Rocha G, Cecacci F, Quiroga E, Obregón D, Tellechea M, Ochoa A, Rosso A, Parisi M (2012). "Capacidad antimicrobiana de fitoproteasas autóctonas sobre cepas bacterianas patógenas de importancia clínica y alimentaria". Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas.
- Rocha GF, Obregón WD, Muñoz F, Guevara G, Fernandez G, Rosso AM, Parisi MG (2015). "Isolation and characterization of an Aspartic Protease from *Salpichroa organifolia* Fruits". *Prot. Pept. Lett.*, 22(4): 379-390.
- Rocha GF, Díaz ME, Rosso AM, Parisi MG (2016). "Citotoxicidad de una aspartil peptidasa de *Salpichroa organifolia* frente a la infección causada por *Phytophthora capsici* en zapallitos verdes (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito)". *Cultivos Tropicales*, 37: 109-115.
- Rodrigues RC Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R (2013). "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization." *Chem. Soc. Rev.*, 42(15): 6290-307.
- Rodriguez-Saona C, Crafts-Brandner SJ, Pare PW, Henneberry TJ (2001). "Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants". *J. Chem. Ecol.*, 27: 679–695.
- Rosenthal PJ (1998). "Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy". *Emerg. Infect. Dis.*, 4(1): 49–57.

- Ruseler-van Embden JGH, van Lieshout LMC, Smits SA, van Kessel I, Laman JD (2004). "Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of peri-anal dermatitis". *Eur. J. Clin. Invest.*, 34: 303–311.
- Sabotič J y Kos J (2012). "Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93: 1351–1375.
- Sałaga M1, Sobczak M, Fichna J (2013). "Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract". *Drug Discov. Today*, 18(15-16): 708-15.
- Salazar O, Molitor J, Lienqueo ME, Asenjo JA (2001). "Overproduction, purification, and characterization of  $\beta$ -1,3-Glucanase type II in *Escherichia coli*". *Prot. Expr. Purif.*, 23: 219-225.
- Sambrook JF y Maniatis T (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Saw S y Arora N (2016). "PI3K and ERK1/2 kinase inhibition potentiate protease inhibitor to attenuate allergen induced Th2 immune response in mouse". *Eur. J. Pharmacol.* 776: 176-84.
- Saw S y Arora N (2015). "Protease inhibitor reduces airway response and underlying inflammation in cockroach allergen-induced murine model". *Inflammation*. 38(2): 672-82.
- Schägger H (2006). "Tricine-SDS-PAGE". *Nature Protocols*, 1(1):16-22.
- Schmelz EA, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Bowers WS (2002). "Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids". *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 51: 204–221.
- Sembdner G y Parthier B (1993). "The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 569–589.
- Seo HS, Song, JT, Cheong J, Lee Y, Lee Y, Hwang I, Lee JS, Cho YD (2001). "Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate regulated plant responses". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 84788–84793.
- Shamsi TN, Parveen R, Fatima S (2016). "Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review". *Int. J. Biol. Macromol.*, 91: 1120-33.

- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010). "Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor". *Nature*, 468: 400–406.
- Sheldon RA y van Pelt S (2013). "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how". *Chem. Soc. Rev.*, 42(15): 6223-6235.
- Shen HB, Chou KC (2007). "Signal-3L: a 3-layer approach for predicting signal peptides". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:297–303.
- Shilpa Satheesh L, Murugan K (2010). "Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt". *Indian J. Exp. Biol.*, 49:366-374.
- Shitu JO, Woodley JM (2009). "Induction studies with *Escherichia coli* expressing recombinant interleukin-13 using multi-parameter flow cytometry". *Biotechnol. Lett.*, 31(4): 577-584.
- Silva de Brito M, Brandão Melo M, Perdigão de Andrade Alves J, Oliveira dos Santos Fontenelle R, Feliciano Mata M, Betânia da Silva Andrade L (2016). "Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions". *Hoehnea*, 43(1): 11-18.
- Sin SF, Chye ML (2004). "Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanu*". *Planta*, 219(6): 1010-22.
- Singhal R (2004). "Isolation and characterization of protease inhibitors from various indigenous legumes". Department of Biochemistry, Kurukshetra University, Kurukshetra, India, PhD Thesis.
- Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F (2002). "A surgacane cystatin: Recombinant expression, purification, and antifungal activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296(5): 1194-9.
- Song, S, Choi Y, Moon YH, Kim S, Choi YD, Lee JS (2000). "Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding jasmonic acid, and abscisic acid". *Plant Mol. Biol.*, 43: 439–450.
- Sprent JI (2001). "Nodulation in Legumes". Kew Royal Botanical Gardens, Kew.
- Staswick PE y Tiryaki I (2004). "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*". *Plant Cell*, 16: 2117–2127.
- Stein PE, Carrell RW (1995). "What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?". *Nat. Struct. Biol.*, 2(2): 96-113.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM (2006). "Crosstalk between jasmonic acid: ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation". *Plant J.*, 46: 961–970.
- Swiątek A, Van Dongen W, Esmans EL, Van Onckelen H (2004). "Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells". *Plant Physiol.*, 135: 161–172.
- Tachibana A, Tohiguchi K, Ueno T, Setogawa Y, Harada A, Tanabe T (2009). "Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: Sequential T4 DNA polymerase treatments". *J. Biosci. Bioeng.*, 107(6): 668-9.
- Takahashi H, Kanayama Y, Zheng MS, Kusano T, Hase S, Ikegami M, Shah J (2004). "Antagonistic Interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus". *Plant Cell Physiol.*, 45: 803–809.
- Tanji KK (2002). "Salinity in the soil environment". *Salinity: Environment–Plants–Molecules*. Kluwer Academic Publishers, 21–51.
- Thaler JS, Fidantsef AL, Duffey SS, Bostock RM (1999). "Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance". *J. Chem. Ecol.*, 25: 1597–1609.
- Thaler JS, Stout MJ, Karban R, Duffey SS (2001). "Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores". *Ecol. Entomol.*, 26: 312–324.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007). "JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signaling". *Nature*, 448: 661–665.
- Thomma BPHJ, Neilssen I, Eggermont K, Broekaert WF (1999). "Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*". *Plant J.*, 19: 163–171.
- Tiller J, Berlin P, Klemm D (1999). "A novel efficient enzyme-immobilization reaction on NH<sub>2</sub> polymers by means of L-ascorbic acid". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 30(2): 155-162.
- Torres-Salas P, del Monte-Martinez A, Cutiño-Avila B, Rodriguez-Colinas B, Alcalde M, Ballesteros AO, Plou FJ (2011). "Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports". *Adv. Mater.*, 23(44): 5275-5282.
- Trenholme KR, Brown CL, Skinner-Adams TS, Stack C, Lowther J, To J, Robinson MW, Donnelly SM, Dalton JP, Gardiner DL (2010). "Aminopeptidases of malaria

- parasites: new targets for chemotherapy". *Infect. Disord. Drug Targets*, 10(3): 217–225.
- Turk B, Turk V, Turk D (1997). "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors". *Biol. Chem.*, 378(3-4): 141-50.
  - Turk V, Bode W (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases". *FEBS Lett.*, 285(2): 213-9.
  - Turk V, Kos J, Turk B (2004). "Cysteine cathepsins (proteases): On the main stage of cancer?". *Cancer Cell*, 5: 409-410 (review). *Cancer Cell*, 5: 409-20.
  - Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002). "The jasmonate signal pathway". *Plant Cell*, 14: 153–164.
  - Van Reenen C, Dicks LMT, Chikindas ML (1998). "Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*". *J. Appl. Microbiol.*, 84: 1131–1137.
  - Vergnolle N (2016). "Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases". *Gut*. 65(7): 1215-24.
  - Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S, Vidal M. (2000). "GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes". *Methods Enzymol.*, 328: 575-92.
  - Viklund H, Elofsson A (2008). "OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar". *Bioinformatics*, 24: 1662–1668.
  - Walsh TA y Twitchell WP (1991). "Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment". *J. Biol. Chem.* 266: 23422–23427.
  - Wang SY, Wu JH, Ng TB, Ye XY, Rao PF (2004). "A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean". *Peptides*, 25: 1235–42.
  - Wang Y y Caruso F (2004). "Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres". *Chem. Commun. (Camb.)*, (13): 1528-1529.
  - Ward O, Rao M, Kulkarni A (2009). *Encyclopedia of Microbiology*; Moselio Schaechter., Eds., 495-511.

- Wardle DA (2002). "Communities and Ecosystems: Linking the Aboveground and Belowground Components". Princeton University Press.
- Wasternack C (2007). "Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development". *Ann. Bot.*, 100: 681–697.
- Wasternack C (2014). "Action of jasmonates in plant stress responses and development – applied aspects". *Biotechnol. Adv.*, 32: 31–39.
- Wasternack C y Hause B (2002) "Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development". *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 72:165–221.
- Westergaard JL, Hackbarth C, Treuhaft MW, Roberts RC (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures". *J. Immunol. Methods*, 34(2): 167-75.
- Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grutter MG, Cohen NC, Rasetti V (2003). "Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308: 698–705.
- Xie D, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, John G, Turner JG (1998). "COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility". *Science*, 280: 1091–1094.
- Xu ZF, Qi WQ, Ouyang XZ, Yeung E, Chye ML (2001). "A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem". *Plant Mol. Biol.*, 47(6): 727-38.
- Xu X, Pan S, Cheng S, Zhang B, Mu D, Ni P, Zhang G, Yang S, Li R, Wang J (2011). "Genome sequence and analysis of the tuber crop potato". *Nature*, 475: 189-195.
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, Wang Z, Xie D (2009). "The *Arabidopsis* coronatine insensitive1 protein is a jasmonate receptor". *Plant Cell*, 21: 2220–2236.
- Yanes O, Villanueva J, Querol E, Aviles FX (2005). "Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS". *Mol. Cell Proteomics*, 4(10): 1602-13.
- Yang X, Li J, Wang X, Fang W, Bidochka MJ, She R, Xiao Y, Pei Y (2006). "Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* sedes". *Peptides*, 27:1726–1731.

- Zdyb A, Demchenko K, Heumann J, Mrosk C, Grzeganeck P, Gobel C (2011). “Jasmonate biosynthesis in legume and actinorhizal nodules”. *New Phytol.*, 189: 568–579.
- Zhao J, Fujita K, Yamada J, Sakai K (2001). “Improved  $\beta$ -thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitors and methyl jasmonate”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 301–305.
- Zhao J, Zheng SH, Fujita K, Sakai K (2004). “Jasmonate and ethylene signaling and their interaction are integral parts of the elicitor signaling pathway leading to  $\beta$ -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures”. *J. Exp. Bot.*, 55: 1003–1012.
- Zhao YR, Xu YH, Jiang HS, Xu S, Zhao XF, Wang JX (2014). “Antibacterial activity of serine protease inhibitor 1 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*”. *Dev. Comp. Immunol.*, 44: 261–269.
- Zhang Y, Kouzuma Y, Miyaji T, Yonekura M (2008). “Purification, characterization, and cDNA cloning of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from *Apios Americana medikus* tubers”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 171.
- Zhong C, Cai QF, Liu GM, Sun LC, Hara K, Su WJ, Cao MJ (2012). “Purification and characterisation of cathepsin L from the skeletal muscle of blue scud (*Decapтерus maruadsi*) and comparison of its role with myofibril-bound serine proteinase in the degradation of myofibrillar proteins”. *Food Chem.*, 133:1560–1568.
- Zimmerli L, Jakab G, Mettraux JP, Mauch-Mani B (2000). “Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta aminobutyric acid”. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 12920–12925.