



“Obtención de inhibidores peptídicos de proteasas a partir de extractos de Solanum tuberosum variedad andígena subvariedad churqueña”.

***Laboratorio de Procesos Biotecnológicos
Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular.
Mariana Edith Tellechea***

***Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Facultad de
Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata***

***Walter David Obregón
Director***

La Plata, Marzo de 2012

Indice

Introducción	1
<i>Productos Naturales en la Biomedicina</i>	1
<i>Generalidades de inhibidores de proteasas</i>	3
<i>Inhibidores de proteasas en plantas</i>	3
<i>Aplicaciones de los inhibidores de proteasas</i>	4
<i>Carboxipeptidasas e inhibidores de carboxipeptidasas</i>	6
<i>Carboxipeptidasas</i>	7
<i>Inhibidores de Carboxipeptidasas</i>	8
<i>Importancia de la inmovilización de enzimas</i>	12
<i>Inmovilización de proteasas para captura de inhibidores peptídicos</i>	12
<i>Importancia de la Proteómica para el estudio de enzimas e inhibidores</i>	13
<i>Bibliografía Introducción</i>	
Material es y Métodos (M&M)	
<i>Material vegetal</i>	
<i>Preparación de los extractivos crudos</i>	
<i>Cuantificación proteica por el método de Bradford (Bradford 1976):</i>	
<i>Screening o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de diferentes tipos mecanísticos</i>	
<i>Determinación de actividad inhibitoria de tripsina</i>	
<i>Determinación de actividad inhibitoria de papaína</i>	
<i>Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA)</i>	

Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina

Determinación de la $i_{0.5}$

Tratamiento térmico del extracto crudo

Método para concentrar proteínas

Liofilización

Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa

Purificación cromatográfica del extracto crudo:

Electroforesis de Alta Resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE)

Isoelectroenfoque

Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Métodos Proteómicos

Intensity Fading (IF) por MALDI-TOF/MS

Desalado de extractivos

Condiciones experimentales para IF MALDI-TOF MS

Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint)

Digestión triptica

PMF por MALDI-TOF/MS

Resultados

1. Obtención del Extracto Crudo y purificación preliminar

2. Screening de inhibidores: Actividad inhibitoria de la muestra frente a enzimas de distintos tipos mecanísticos

i. Inhibición de Carboxipeptidasa A (CPA)

ii. Inhibición de Papaína

iii. Inhibición de subtilisina

iv. Inhibición de Tripsina

3. Aislamiento y caracterización de inhibidores de Carboxipeptidasa A

i. Curva Dosis-Respuesta del Extracto Crudo frente a CPA

ii. Efecto de tratamientos térmicos

iii. Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.

iv. Perfil electroforético del EC y los tratamientos térmicos de Churqueña

v. Estimación del Punto Isoeléctrico

- vi. Análisis del EC y los tratamientos térmicos mediante espectrometría de masas MALDI/TOF*
- vii. Diseño de matrices empleadas para el desarrollo de cromatografía de afinidad*
- viii. Intensity Fading MALDI TOF*
- ix. Purificación de los inhibidores mediante Cromatografía de Afinidad*
- x. Determinación del Peso Molecular del pico obtenido en la afinidad, mediante espectrometría de masas MALDI TOF/MS.*
- xi. Peptide Mass Fingerprint*

Conclusiones

Perspectivas a futuro

Introducción



1. Productos Naturales en la Biomedicina

El empleo de productos vegetales para la cura de enfermedades tales como el cáncer, el SIDA y la malaria, entre otras, puede ser una de las claves terapéuticas a utilizarse en el futuro. Nuestros antepasados usaban las plantas de forma rudimentaria para sanar, curar o apaciguar ciertas enfermedades, por lo que el conocimiento de las propiedades terapéuticas de los vegetales es de antaño. La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación es lo que nos permite detectar los componentes individuales que contienen las propiedades curativas. Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes de compuestos usados como materia prima para el desarrollo de medicamentos, debido a su diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse en seres vivos (R. García-Fernández, 2009).

Entre esos productos se encuentran las proteasas y los inhibidores de proteasas (IPs) presentes en gran cantidad en familias de plantas autóctonas algunas consideradas medicinales. Las fuentes vegetales de inhibidores de proteasas han sido escasamente exploradas y tienen la ventaja de su extraordinaria riqueza y diversidad. Por otro lado, en muchos casos, no existen patentes que dificulten su explotación, lo cual hace que sea un área viable para ser explotada. Sumado a lo anterior, los avances recientes en Genómica y Proteómica han abierto nuevas perspectivas a la ciencia; en particular, el descubrimiento de proteasas como nuevas dianas terapéuticas, lo que ha convertido a sus inhibidores en moléculas con potencial actividad biomédica en el tratamiento de numerosas enfermedades (Jedinak, 2005). Los IPs tradicionalmente estudiados se han desarrollado a partir de screening en fuentes naturales ya que los procedimientos de obtención por esta vía son en general menos costosos y relativamente sencillos, en comparación con los procedimientos de obtención de inhibidores por la vía de la síntesis química. Además, se ha demostrado que los inhibidores naturales presentan una mayor

diversidad química, inocuidad, elevada potencia, especificidad y menor carácter hidrofóbico.

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.

Estas sustancias inhibitorias se distribuyen en un amplio espectro de biomoléculas, las cuales desarrollan diversas actividades funcionales que forman parte de los mecanismos de defensa del vegetal frente a los depredadores. Por tanto, estas fuentes naturales prometen grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas.

2. Generalidades de inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas (IPs) representan una eficiente vía que tienen los organismos para el control de la actividad de proteasas endógenas y a su vez son herramientas que protegen a los tejidos frente a una proteólisis descontrolada en estados patológicos. Adicionalmente, los IPs pueden controlar la actividad de proteasas exógenas como las de virus, bacterias y parásitos, y de este modo estar involucrados en los mecanismos de defensa del organismo. Este control de la proteólisis por parte de los inhibidores representa uno de los mayores incentivos para la búsqueda de nuevos IPs. La modulación de la actividad proteolítica controlada por IPs nos proporciona una herramienta terapéutica valiosa, habiéndose probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Esto hace que los IPs presenten potencial actividad en el tratamiento de infecciones parasitarias(Becker, 1995), fúngicas(Abad-Zapatero, (1998)) y virales(Clercq 2004; Arribas, 2005), así como en afecciones inflamatorias(Bilfinger, 2002), inmunológicas y respiratorias (Hugli. 1996), cardiovasculares(Ottaviani, 2005), cáncer(Jedinak, 2005) y en desórdenes neurovegetativos(Vassar,. 1999), entre otras.

i. *Inhibidores de proteasas en plantas.*

Los inhibidores de proteasas fabricados por las plantas son pequeñas proteínas que contribuyen a la defensa contra insectos. Al bloquear la síntesis de proteasas intestinales, frenan el crecimiento del mismo y provocan su muerte por ayuno. Estos inhibidores se encuentran principalmente en los granos y tejidos de reserva de las plantas alcanzando concentraciones bastante altas (5-15 % de la proteína total). También se han detectado, en menor proporción, inhibidores de proteasas en tejidos susceptibles (brotes y hojas) al ataque de insectos y microorganismos patógenos (Ryan, 1990; Brzin, 1995).

En respuesta a las señales desencadenadas durante la producción de una herida, los inhibidores de proteasas no sólo se sintetizan localmente, sino también a distancia. Las señales que inducen esta síntesis incluyen algunos oligosacáridos, señales eléctricas, ácido abscísico y sistemina, un pequeño péptido de 18 aminoácidos. La acumulación sistémica de inhibidores de proteasas en las partes no heridas decae con la edad y no se observa en plantas maduras. Por ello, se ha sugerido que la función de estos péptidos en los sistemas de defensa podría estar restringida a una ventana de desarrollo bastante estrecha. Sin embargo, la respuesta local persiste a lo largo de la vida de la planta. Algunos insectos recurren a estrategias diversas para eludir la defensa vegetal: incrementan su actividad proteolítica, inducen enzimas proteolíticas insensibles a los inhibidores de proteasas o expresan proteasas que degradan específicamente a los inhibidores producidos por las plantas y para las cuales no tiene inhibidores. Además, algunas poblaciones de insectos varían genéticamente en su tolerancia a los inhibidores de proteasas. De hecho, los insectos pueden desarrollar con suma celeridad tolerancia a los inhibidores de proteasas, a partir incluso de fuentes nuevas. (Vivanco, 2005)

Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos, destacándose entre éstas, proteasas serínicas (PS), cisteínicas (PC), aspárticas (PA) y metalocarboxipeptidasas (MCP). Los inhibidores contra PS, PC y MCP son ubicuos, es decir, que pueden ser

encontrados en varios órganos de la planta, pero los inhibidores de PA no han sido hasta ahora detectados en semillas, aún cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar.

ii. *Aplicaciones potenciales de los inhibidores de proteasas*

*Las aplicaciones de los inhibidores de proteasas han estado dirigidas fundamentalmente al área de la salud humana, que constituye hasta ahora su “blanco” principal. Existen varios ejemplos de IPs de origen vegetal que se están probando en distintos ensayos biológicos. Podemos mencionar a las cistatinas de plantas (fitocistatinas) que inhiben proteasas cisteínicas, entre ellas las caspasas, enzimas involucradas en el proceso de apoptosis y por ende en el desarrollo de enfermedades degenerativas y autoinmunes(Thornberry, 1998). Se han aislado también inhibidores de metaloproteasas (Hass, 1979; Hass, 1981); los cuales son de mucha importancia ya que la regulación de las metaloproteasas de matriz (MMPs) es fundamental en el tratamiento de enfermedades tales como la artritis, el cáncer y la aterosclerosis(Nagase, 1996). Además, a partir de semillas se ha obtenido un gran número de inhibidores de proteasas serínicas, entre ellos cabe mencionar un inhibidor extraído de semillas de *Leucaena leucocephala* que inhibe plasmina y exhibe propiedades anticoagulantes in vivo (Oliva, 2000) y el inhibidor de tripsina de tipo Bowman-Birk (BBI) presente en soja que ha demostrado actividad anticancerígena en ensayos clínicos y en ensayos in vitro(Kennedy, 2002; Chen, 2005). Un extracto de soja enriquecido en BBI, llamado Bowman-Birk inhibidor concentrado (BBIC), está en estudio en la FDA (Food and Drug Administration) el cual podría administrarse para aumentar o mantener los niveles de moléculas controladoras de proteasas en el cuerpo, especialmente en el tracto digestivo(JN. 2008).*

*Por otro lado se han desarrollado plantas transgénicas que expresan inhibidores de proteasas con la finalidad de adquirir mayor resistencia a plagas y así lograr mayor rendimiento en los cultivos. Se han realizado ensayos en plantas de tabaco para conseguir resistencia a larvas de *Manduca sexta* (gusano cachón*

del tabaco) expresando el inhibidor de proteinasa II. Se observó que las larvas alimentadas con hojas de plantas transgénicas que expresaban el inhibidor de proteinasa II crecían más lentamente que las alimentadas con hojas del control. Esto indica que la inhibición del crecimiento de las larvas de M. sexta alimentadas con las hojas de plantas transgénicas se debe principalmente a la inhibición de tripsina causada por el inhibidor II (Ramírez, 2003).

También podemos citar la inserción de los genes para la expresión de inhibidores de serinproteasas en cultivos de algodón lo cual mejora la resistencia al ataque de larvas de lepidópteros (Dunse, 2010). El estudio en conjunto de proteasas digestivas de este tipo de plagas, es esencial para el desarrollo de métodos de control que actúen a través del tubo digestivo (Terra, 2005), de esta manera, conociendo las proteasas involucradas en el proceso, pueden expresarse los inhibidores específicos para el control de insectos fitófagos.

Por último podemos citar algunos estudios de las últimas décadas en epilepsia, los cuales indican que metaloproteinasas y serinproteasas como tripsina serían factores claves en el desarrollo de la enfermedad, por lo que, al encontrarse en el medio extracelular, resultarían ser un buen target para futuras intervenciones farmacológicas(Lukasiuk, 2011).

3. Carboxipeptidasas e inhibidores de carboxipeptidasas

A diferencia de los numerosos ejemplos de inhibidores de origen vegetal encontrados para tripsina, catepsina, quimotripsina, entre otras, los inhibidores de carboxipeptidasas naturales no han sido reportados y es muy limitado su hallazgo en la naturaleza. Sólo han sido encontrados en plantas pertenecientes a la familia Solanaceae, tanto en tomate como en papa (Ryan, 1974; Hass, 1975; Hass and Hermodson, 1981). El mecanismo de inhibición del inhibidor de carboxipeptidasa A de papa se basa en la interacción de su secuencia aminoacídica carboxilo terminal con la ranura del sitio activo de dicha enzima

imitando la unión del sustrato a este sitio (Vendrell, 2000). Por otra parte, propeptidos de procarboxipeptidasas, que se pliegan como dominios globulares independientes, tienen la posición de su lazo inhibitorio sobre la parte superior de la hendidura del sitio activo de la carboxipeptidasa A, manteniendo la enzima inhibida (Vendrell, 1992; Chen, 1996; Muller, 2002). Sobre la base de las funciones fundamentales de la carboxipeptidasa, sus inhibidores se han convertido en moléculas muy atractivas como fármacos potenciales para su estudio en las diferentes enfermedades sistémicas e infecciosas, destacándose las enfermedades cardiovasculares (Boos C.J. & G.Y. Lip 2004) y la malaria (Ersmark, 2006), entre las más importantes.

i. Carboxipeptidasas

Las carboxipeptidasas son exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en el C-terminal de péptidos y proteínas. Esta acción enzimática puede ser llevada a cabo por lo menos por dos tipos diferentes de enzimas con diferentes mecanismos catalíticos: a) las metalocarboxipeptidasas, que poseen fuertemente unido un átomo de Zn^{++} directamente implicado en la catálisis, y b) las serina-carboxipeptidasas, que contienen un residuo Ser reactivo en el sitio activo que pertenece a la tríada Ser/His/Asp. Entre las metalocarboxipeptidasas, el grupo más estudiado de las enzimas es el de la familia M14 en la clasificación de Barrett-Rawlings-Woessner (Barrett, 1998.).

Una subdivisión alternativa en función de la participación de las enzimas en procesos fisiológicos específicos sería: a) carboxipeptidasas pancreáticas A1, A2 y B, que por lo general sólo funcionan como enzimas digestivas, b) el resto de las carboxipeptidasas de mamíferos, incluida la carboxipeptidasa A de mastocitos y carboxipeptidasa U (o carboxipeptidasa B de plasma), que ejercen su acción en diversos procesos fisiológicos, principalmente en los tejidos no digestivos y en fluidos, han sido llamadas "carboxipeptidasas reguladoras",

debido a su participación en muchas reacciones de procesamiento selectivo. (Skidgel, 1996,)

La Carboxipeptidasa A es el prototipo de zinc-peptidasas (Sträter, 1996). La hidrólisis de enlaces peptídicos en el C-terminal de péptidos y proteínas llevada a cabo por carboxipeptidasas puede ser un paso importante en la degradación de algunas moléculas usadas como sustrato o el resultado de la maduración de otras proteínas. Por lo que, el efecto fisiológico de estas enzimas, como para todo tipo de proteasa, es variado y depende del sitio y el organismo donde suceda la catálisis.

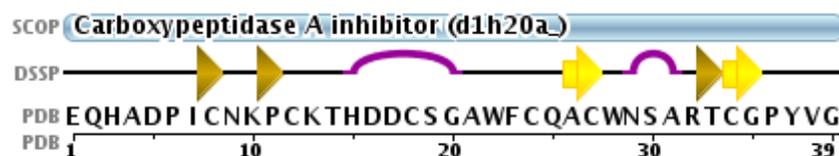
La carboxipeptidasa A de los mastocitos y la carboxipeptidasa U (o carboxipeptidasa B de plasma) son las dos carboxipeptidasas reguladoras que están más cerca en estructura a las carboxipeptidasas de páncreas, con un grado de identidad de secuencia mayor del 40%. Ellas son las únicas proteínas dentro de este grupo que se sintetizan con un pro-péptido de la misma longitud que la forma pancreática. La primera se encuentra en la secreción de los gránulos de los mastocitos, donde forma complejos macromoleculares con proteoglicanos. La carboxipeptidasa A que se encuentra en los gránulos es plenamente activa (Reynolds, 1989; Cole, 1991), y clivará péptidos-sustratos en conjunto con otras proteasas. La función precisa de esta carboxipeptidasa está aún por definir, aunque, obviamente, puede estar relacionada con condiciones patológicas en las que los mastocitos estén implicados, como reacciones alérgicas, inflamación y otros (Eklund, 1993). La carboxipeptidasa U, una carboxipeptidasa B-like de plasma, se encuentra en la sangre como un zimógeno (Eaton, 1991) y ha sido definida como una inhibidora de la fibrinólisis activable con trombina (Bajzar, 1995). Su activación se encuentra modulada por el complejo trombina-trombomodulina, en el que un dominio del factor de crecimiento epidérmico parece jugar un papel esencial (Kokame, 1998). Debido a su afinidad básica de residuos C-terminal, la carboxipeptidasa U puede liberar lisinas en los sitios de unión para el plasminógeno en la superficie de células y de la fibrina, pudiendo modular la activación del plasminógeno y el proceso de fibrinólisis.

Las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de carboxipeptidasas se están estudiando actualmente. En algunos informes significativos se describe el uso de las carboxipeptidasas humanas para producir enzimas con una especificidad reversa (Edge, 1998) o para generar anticuerpos conjugados a enzimas, y de esta manera, debido a la alta especificidad que poseen los paratopes de las inmunoglobulinas, ser utilizadas en la terapia como profármacos dirigidos enzima-anticuerpo (ADEPT) (Smith, 1997; Wolfe, 1999), realizando de esta manera un tratamiento puntual de la patología. Un profundo conocimiento de la estructura de la carboxipeptidasa humana y los efectos de su rediseño son necesarios para generar productos de valor terapéutico.

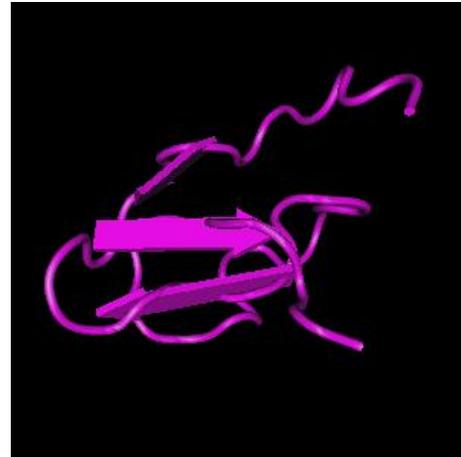
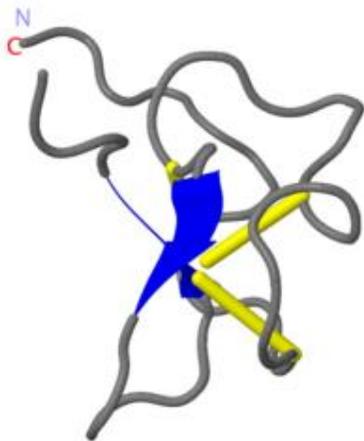
ii. Inhibidores de Carboxipeptidasas

Tal cual expresamos anteriormente, los polipéptidos que inhiben específicamente metalocarboxipeptidasas sólo se han determinado en pocas especies. Hasta el momento fueron hallados en papas, tomates, lombrices, sanguijuelas y en algunos tejidos de mamíferos (Homandberg, 1989; Ryan, 1989; Normant, 1995; Reverter, 1998). El más estudiado de estos inhibidores es el inhibidor de carboxipeptidasa de papa (PCI, siglas en inglés, Potatoe Carboxipeptidase Inhibitor), que fue el primero que se caracterizó por el trabajo pionero de Hass, Neurath, Ryan y colaboradores (Hass and Ryan, 1981; Hass, Neurath, 1976).

El inhibidor de carboxipeptidasa de papa (PCI), una proteína globular de 39 residuos, es una de las más pequeñas que se ha descrito. La estructura 3-D se conoce en solución acuosa (Clare, 1987), y como un complejo cristalizado con carboxipeptidasa A (Rees, 1982).



La estructura en solución y el esqueleto dinámico del inhibidor de carboxipeptidasa de papa recombinante fue caracterizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear “RMN” (Gonzalez, 2003). El pliegue del inhibidor se muestra en las siguientes figuras.



El núcleo globular de 27 residuos del PCI está estabilizado por tres puentes disulfuro y carece de estructura secundaria regular, **a excepción de la hélice de 5 residuos cortos internos. Del mismo sobresalen 7 residuos N-terminal y cinco residuos de la cola C-terminal.**



Las flechas blancas señalan los puentes disulfuro.

No hay papel funcional hasta el momento asignado a la cola N-terminal (residuos 1-6), cuya conformación parece que no está definida. El PCI pertenece a la super familia de proteínas llamadas “cystine-not” o “T-knot”, llamadas así por su particular patrón de puentes disulfuros (Lin, 1995). La proteína se acumula en las vacuolas. La incapacidad de la pro-forma de inhibir carboxipeptidasas, y su estabilidad a la digestión de carboxipeptidasas, sugieren que el dominio C-terminal puede tener, además de una función vacuolar, como ya se sugirió para la isoforma del tomate (Martineau, 1991), un papel en la modulación de la actividad inhibitoria del PCI. (es decir el proinhibidor, no inhibe la enzima y es estable a su digestión). El C-terminal del PCI se acopla penetrando en el sitio activo de la carboxipeptidasa, dando lugar a un mecanismo de inhibición tipo tapón. El inhibidor se comporta como un producto



peptídico estrechamente ligado. Su residuo C-terminal (Gly-39) es escindido por la enzima y el resto del inhibidor se mantiene ligado a la enzima por varios contactos.

La importancia funcional de la cola (residuos 35-39) es debido a que es el sitio de contacto primario de la enzima. De hecho, todos los residuos en la cola C-terminal establecen contactos con CPA, excepto Gly-35 (Rees, 1982).

Por otra parte, un corto tramo de residuos del núcleo central, es conocido como el sitio secundario de unión (residuos 28-31), situados alrededor de Trp-28. Ambos sitios han sido experimentalmente demostrados por estudios de modificación química (Hass, 1976), por lo que dichas regiones se consideran esenciales para la interacción.

La Ingeniería de proteínas está siendo utilizada por varios grupos de investigación para analizar la relación estructura-función del PCI y para una remodelación con fines biotecnológicos. El pequeño tamaño del PCI y el elevado número de restricciones conformacionales que contiene (tres puentes disulfuros en 27 residuos) constituyen un serio desafío para un rediseño. La mutagénesis en el núcleo fácilmente perturba los enlaces disulfuro y la conformación nativa de la proteína. De hecho, el PCI es un buen modelo para estudiar los problemas relacionados con la ingeniería de pequeñas proteínas ricas en puentes disulfuro. Su pequeño tamaño y la rigidez interna facilitan la simulación computacional de rediseño de proteínas por aproximaciones de dinámica molecular (MD).

Como ya se ha mencionado, un hallazgo interesante es que el PCI se comporta como un antagonista del EGF (Epidermal Growth Factor), y se trata del primer antagonista del EGF humano que ha sido registrado, por lo tanto, podría tratarse de un agente antitumoral putativo (Blanco-Aparicio and Avilés, 1998). Se sabe que el EGF y su receptor (EGFR) están involucrados en muchos aspectos del desarrollo de carcinomas, como el crecimiento de células tumorales, la vascularización, la invasión y metástasis. Como el EGFR se ha encontrado sobreexpresado en muchos tumores de origen epitelial, es un objetivo potencial para la terapia antitumoral. Se ha demostrado que el PCI compite con EGF para unirse al EGFR e inhibe la activación del EGFR y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. El PCI suprime el crecimiento de varias líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano, tanto in vitro como en ratones desnudos. Aunque varios inhibidores de proteasas

han sido señalados como posibles agentes antitumorales (Trow, 1993), este es el primer caso en que el efecto no es el resultado de su actividad inhibidora de proteasa, sino que su comportamiento es como un antagonista del EGF.

4. Importancia de la inmovilización de enzimas

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, paralelamente, sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos: presentan una gran actividad catalítica; muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad); son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Inmovilización de proteasas para captura de inhibidores peptídicos

Una de las técnicas que mas frutos ha dado para la obtención de inhibidores peptídicos a partir de muestras biológicas complejas es la inmovilización de enzimas en soportes específicos. Entre ellas podemos citar al polímero modificado denominado glioxil-agarosa. Este compuesto presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico, las cuales son aprovechadas para la confección de rellenos utilizados para el desarrollo de cromatografías de afinidad.

Usando estos soportes, se puede aumentar la rigidez de las moléculas enzimáticas y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparados con las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aún cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Guisán, 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, y dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, este soporte se puede cargar con más grupos reactivos. Este tipo de soporte, debido a sus características físico-químicas, ha sido utilizado para inmovilizar mediante la técnica de unión multipuntual covalente, algunas enzimas como penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (Fernandez-Lafuente, 1990), tripsina (Soler, 1997), α -quimotripsina de páncreas de bovino (Guisan, 1991) y otras proteasas (Yust, 2007). El método de inmovilización multipuntual covalente, es aquel en el que los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática reaccionan con los residuos de un soporte activado, quedando ubicada la enzima en su superficie mediante el establecimiento de varios puntos de unión. El entrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre alteración alguna en su estructura. De todas formas, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1998; Montes,, 2006).

5. Importancia de la Proteómica para el estudio de enzimas e inhibidores

El estudio de las interacciones proteicas entre sí y con sus ligandos, es fundamental y de gran interés para comprender las funciones celulares, así como para la aplicación eficiente de la mayoría de las estrategias biomédicas y

biotecnológicas basadas en ellas. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica analítica adecuada para el rastreo de ligandos debido a su alta resolución y sensibilidad, rápido análisis y fácil automatización, y que además puede facilitar el uso de protocolos a gran escala o high-throughput. Se ha establecido un método denominado 'Intensity Fading MALDI-TOF/MS', herramienta de la Interactómica, adecuado para investigar interacciones no-covalentes entre proteasas e inhibidores. (Yanes, 2006, Obregón, 2011).

La combinación de la inmovilización de proteasas junto a la espectrometría de masas MALDI-TOF permite el rastreo de ligandos (IPs) de forma rápida y precisa, posibilitando su posterior caracterización mediante técnicas convencionales.

Esta variedad de técnicas conforman la base sobre la cual se desarrollará este plan de trabajo, en el que se tendrán en cuenta las siguientes pautas y conceptos importantes:

- La regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, por esto la actividad de muchas proteasas se encuentra bajo estudio intensivo, ya que los inhibidores de proteasas (IP) son un tipo de regulador de las mismas.*
- El empleo de productos vegetales para la cura de enfermedades tales como el cáncer, el SIDA y la malaria, entre otras, puede ser una de las claves terapéuticas a utilizarse en el futuro.*
- La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación es lo que nos permitirá detectar los componentes individuales que contienen las propiedades curativas, soportes de la industria farmacéutica y de la biomedicina.*

Con todo esto y aprovechando la disponibilidad de infraestructura y la experiencia adquirida por nuestro grupo de trabajo, se propone aislar y caracterizar un nuevo inhibidor de proteasas de origen vegetal a partir de tubérculos de papas andinas.

Bibliografía Introducción

Abad-Zapatero, C., R. Goldman, S.W. Muchmore, C. Hutchins, T. Ole, K. Stewart, S.M. Cutfield, J.F. Cutfield, S.I. Founding & T.L. Ray (1998). "Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*- Implications for the design of antifungal agents". *Adv. Med. Biol.* **436**: 297-313.

Alvaro, G., R. Fernandez-Lafuente, et al. (1990). "Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*." *Appl Biochem Biotechnol* **26**(2): 181-95.

Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A (2005). "Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1viral 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.

Arroyo M., J. M. S.-M. a. J. V. S. (1998). "Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports." *Progress in Biotechnology Volume 15*.

Bajzar I., M. R., Nesheim ME. (1995). "Purification and characterization of TAFI, a thrombin activatable fibrinolysis inhibitor." *J Biol Chem* **270**: 14477-14484.

Barrett, N. D. R., J.F. Woessner (London,1998.). "(Eds.), Handbook, of Proteolytic Enzymes Academic Press."

Becker, M. M., S.A. Harrop, J.P. Dalton, B.H. Kalinna, D.P. McManus & P.J. Brindley (1995). "Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation" "*J. Biol. Chem.* **270** 24496-501.

Bilfinger, T. V., & Stefano, G. B. (2002). "The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena." *Curr Pharm Des* **8**: 505-509.

Blanco-Aparicio, C. M., M.A.; Fernández-Salas, E.; Frazier, M.L.; Mas, J.M.; Querol, E.; and F. X. d. L. Avilés, R. (1998). "Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth." *J. Biol. Chem.* **273**: 12370-12377.

Boos C.J. & G.Y. Lip (2004). "Novel therapies for the prevention of stroke"." *Expert Opin Investig Drugs* **13**: 1615-30.

Brzin, J. K., M. (1995). "Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions". *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**: 420- 67.

Chen, C. C., S. S. Wang, et al. (1996). "Serum procarboxypeptidase B, amylase and lipase in chronic renal failure." *J Gastroenterol Hepatol* **11**(5): 496-9.

Chen, Y. W., Huang, S. C., Lin-Shiau, S. Y., & Lin, J. K. (2005). "Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. ." *Carcinogenesis* **26**: 1296–1306.

Clercq, E. D. (2004). " "Antiviral drugs in current clinical use"." *J Clin Virol.* **30**: 115-33.

Clore G.M., A. M. G., M. Nilges, C.A. Ryan (1987). *Biochemistry* **26**: 8012-8023.

Cole K R, S. K., H L Trong, R G Woodbury, K A Walsh, H Neurath (1991). "Rat mast cell carboxypeptidase: amino acid sequence and evidence of enzyme activity within mast cell granules." *Biochemistry* **30**(3): 648-655.

Dunse KM, S. J., Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA (2010). "Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. ." *PNAS*.

Eaton, B. M., SP Tsai, W Henzel and D Drayna (1991). "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma." *J. Biol. Chem.* **266**(32): 21833-21838.

Edge M, C. F., J Hennam, I Lee, D Tonge, I Hardern, J Fitton, K Eckersley, S East, A Shufflebotham, D Blakey, A Slater (1998). "Engineered human carboxypeptidase B enzymes that hydrolyse hippuryl-L-glutamic acid: reversed-polarity mutants." *Protein Eng* **11**(12): 1229-1234.

Eklund K.K., R. L. S., in: F.X. Avilés Hooper (Ed.) (1993). "Innovations in Proteases and their Inhibitors." 241-258.

Ersmark, K., Samuelsson, B., & Hallberg, A. (2006). "Plasmepsins as potencial targets for new antimalarial therapy." *Med Res Rev* **26** 626–666.

Hass G.M., H. A., D.G. Grahn, H. Neurath (1976). "Carboxypeptidase Inhibitor from potatoes. The effects of chemical modification on inhibitory activity." *Biochemistry* **15**: 93-100.

García-Fernández R., E. S., A. del Monte, M. Alonso del Rivero, Y. Guerra, M. A. Chávez. (2009). "Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico." *Revista Cubana de Física* **26**: 76-82.

Gary K. Smith, S. B., Todd A. Blumenkopf, Michael Cory, Joan Humphreys, Ronald M. Laethem, John Miller, Cary P. Moxham, Robert Mullin, Paul H. Ray, Leslie M. Walton, and Lawrence A. Wolfe III (1997). "Toward Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy with the T268G Mutant of Human Carboxypeptidase A1 and Novel in VivoStable Prodrugs of Methotrexate." *J. Biol. Chem.* **272**: 15804-15816.

Gonzalez, C., Neira, J.L., Ventura, S., Bronsoms, S., Rico, M., Aviles, F.X., Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by 1H and 15N NMR. *Journal: (410) Proteins: Struct.,Funct., Ge V.: 50-2003*

Guisan, J. M., A. Bastida, et al. (1991). "Immobilization-stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels." *Biotechnol Bioeng* **38**(10): 1144-52.

Hass, G. M. and M. A. Hermodson (1981). "Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit." *Biochemistry* **20**(8): 2256-60.

Hass, G. M., H. Nau, et al. (1975). "The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." *Biochemistry* **14**(6): 1334-42.

Hass, G. M. a. D., J.E. (1979). "Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes." *Plant Physiol* **64**: 1022-1028

Hass, G. M. and Ryan, C.A. (1981). "Carboxypeptidase inhibitor from potatoes." *Methods in Enzymology* **80**: 778-91.

Homandberg GA, L. R., Peanasky RJ (1989). "Carboxypeptidase inhibitors from *Ascaris suum*: the primary structure. ." *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 153-161.

Hopkins, A. L. a. C. R. G. (2002). ""The druggable genome."." *Nat Rev Drug Discov* **1**(9): 727-30.

Hugli, T.E.. (1996). ""Protease inhibitors: novel therapeutic application and development"." *Trends Biotechnol* **14**: 409-12.

Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). "Inhibitors of proteases as anticancer drugs." *Neoplasma* **52**: 185-192.

JN., L. (2008). "The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor." *Crit Rev Food Sci Nutr.* **48**(1): 94-118.

Jorge M. Vivanco, E. C., Víctor M. Loyola-Vargas y Héctor E. Flores (2005). "Mecanismos químicos de defensa en las plantas."

Kokame K., X. Z., and J. E. Sadler (1998). "Activation of Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor Requires Epidermal Growth Factor-like Domain 3 of Thrombomodulin and Is Inhibited Competitively by Protein C." *J. Biol. Chem.* **273**(20): 12135 - 12139.

Kennedy, A. R., & Wan, X. S. (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.

Lin S.L., R. N. (1995). *Nat. Struct. Biol.* **2**: 835-837.

Lukasiuk K, W. G., Kaczmarek L. (2011). "Extracellular proteases in epilepsy." *Epilepsy Res.* **96**(3): 191-206.

Martineau B, M. K., Houck CM: (1991). "Regulation of metallocarboxypeptidase inhibitor gene expression in to- mato. ." Mol Gen Genet **228**: 281-286.

Montes, T., V. Grazu, et al. (2006). "Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers." Biomacromolecules **7**(11): 3052-8.

Muller, C. A., S. Appelros, et al. (2002). "Serum levels of procarboxypeptidase B and its activation peptide in patients with acute pancreatitis and non-pancreatic diseases." Gut **51**(2): 229-35.

Nagase., H. (1996). "In Zinc Metalloproteinases in Health and Disease. Hooper NM, ed." Taylor and Francis.

Normant, E., Gros, C. and Schwartz, J.C. . (1995). "Carboxypeptidase A isoforms produced by distinct genes or alternative splicing in brain and other extrapancreatic tissues." J. Biol. Chem. **270**: 20543-20549.

Oliva, M. L., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F., Araujo, M. S., Silveira, V. F., Auerswald, E. A. (2000). "Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. ." Biochim Biophys Acta **1477**: 64-74.

Ottaviani, J. I., Actis-Goretta, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2005). "Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition." Biochimie **88**: 359-365.

Ramírez, H. (2003). "TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS PARA RESISTENCIA A INSECTOS."

Rees, W. N. L. (1982). "Refined crystal structure of carboxypeptidase a at 1.54 Å resolution " J. Mol. Biol. **160** 475-498.

Reverter, J. V., F. Canals, J. Horstmann, F. X. Aviles, H. Fritz, and C. P. Sommerhoff (1998). "A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech *Hirudo medicinalis*. ISOLATION, SEQUENCE ANALYSIS, cDNA CLONING, RECOMBINANT EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION" J. Biol. Chem. **273**(49): 32927 - 32933.

Reynolds, R. L. S., D.S. Gurley, W.S. Lane, K.F. Austen, W.E. Serafin, J. (1989). "Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase A. A novel member of the carboxypeptidase gene family." Biological Chemistry **264**: 20094^20099.

Ryan, C. A. (1989). "Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores." BioEssays **10**: 20-24.

Ryan, C. A. (1990). "'Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens" " Annu.Rev.Phytopath. **28**: 425-49.

Ryan, C. A., G. M. Hass, et al. (1974). "Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." J Biol Chem **249**(17): 5495-9.

Skidgel, R. A. (London, 1996). "Structure and function of mamalian zinc carboxypeptidases" in *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* N.M. Hooper, " Taylor & Francis: pp. 241-283.

Soler, G., A. Bastida, et al. (1997). "Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents." Biochim Biophys Acta **1339**(1): 167-75.

Sträter, W. N. L. a. N. (1996). "Recent advances in zinc enzymology" Chem. Rev. **96**: 2375-2433.

Terra, W. R. y. F., C. (2005). Biochemical of digestion. Comprehensive Molecular Insect Science.

Thornberry, N. A. a. L., Y. (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**: 1312-6.

Trow, W. K., A. R. eds. (1993). ""Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents"." Plenum Publishing Corp.

Vassar R., B. D. B., S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz , P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers & M. Citron (1999). ""Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE"." Sciencet **22**: 735-41.

Vendrell, J., A. Guasch, et al. (1992). "Pancreatic procarboxypeptidases: their activation processes related to the structural features of the zymogens and activation segments." Biol Chem Hoppe Seyler **373**(7): 387-92.

Vendrell, J., E. Querol, et al. (2000). "Metalloprocarboxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 284-98.

Wolfe LA, M. R., Laethem R, Blumenkopf TA, Cory M, Miller JF, Keith BR, Humphreys J, Smith GK. (1999). "Antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1: in vitro and in vivo studies with prodrugs of methotrexate and the thymidylate synthase inhibitors GW1031 and GW1843." Bioconjug Chem. **10**(1): 38-48.

Yust Mdel, M., J. Pedroche, et al. (2007). "Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from flavourzyme." J Agric Food Chem **55**(16): 6503-8.

MATERIALES & MÉTODOS



1. Material vegetal

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Churqueña, provenientes de la provincia de Jujuy, sobre la quebrada de humahuaca, Cordillera de los Andes, Argentina. El nombre común de estas especies es de “papas andinas”, y es muy común su cultivo en estas zonas



geográficas. *S. 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; “Biología de Cultivos Anuales, Papa. Sistema caulinar” 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 parenquimáticas y la pérdida de la polaridad de las mismas. Durante la formación del tubérculo, el crecimiento longitudinal del estolón se detiene y las

células parenquimáticas 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 cámbium 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; "Biología de Cultivos Anuales, Papa. Tubérculo" 1988.).

2. Preparación de los extractivos crudos:

*Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie andígena variedad Churqueña. Se pelaron alrededor de 60,5 g de los mismos, habiendo estado congelados a -80°C.*

Los pasos que prosiguen fueron realizados con distintas variantes:

- i. Las papas fueron trituradas en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,2 con multiprocesadora manteniendo la baja temperatura. Se procedió permitiendo que el almidón sedimente, incubando en heladera durante 40 min. Se recibió el sobrenadante en tubos de muestra (50 ml.) y se centrifugó a 5000 rpm durante 60 min. a una temperatura de 4 °C.*

Nuevamente se centrifugó el sobrenadante, pero ahora a una velocidad de 10000 rpm por 60 min. a 4 °C. El sobrenadante obtenido se transvasó a tubos eppendorf y se centrifugó a 11000 rpm. Por 60 min. a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -80°C.

- ii. Las papas se pusieron en contacto con ácido ascórbico a razón de 4 gr por Kg de papa para prevenir la oxidación de polifenoles, en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,2 bien frío. Luego se procedió a la sedimentación del almidón mediante incubación por 40 min en heladera, el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf y se procedió a centrifugar a 11000 rpm durante 60 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en tubos eppendorf para su almacenamiento a -80 °C.
- iii. Los tubérculos fueron triturados en 170 ml. de agua fría en presencia de ditiotreitól (DTT) a una concentración de 1mM. para prevenir la oxidación de polifenoles, manteniendo baja la temperatura sumergiendo el recipiente contenedor en hielo. Luego se transvasó el homogenato obtenido a tubos de muestra y se incubó en la heladera durante 40 min. permitiendo que sedimente el almidón. Una vez descartado el sedimento, el sobrenadante fue filtrado con papel de filtro y centrifugado en tubos de muestra a 5000 rpm por 60 min. a una temperatura de 4 °C. El nuevo sobrenadante se centrifugó a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. El sobrenadante fue almacenado a -80°C.
- iv. Se trituraron los tubérculos en 170 ml. de agua destilada fría manteniendo baja la temperatura sumergiendo el recipiente contenedor en hielo. Luego se transvasó el homogenato obtenido a tubos de muestra y se incubó en la heladera durante 40 min. permitiendo que sedimente el almidón. El sobrenadante resultante se transvasó a tubos de muestra y se centrifugó a 5000 rpm durante 60 min. a una temperatura de 4 °C. Nuevamente se centrifugó el sobrenadante, pero ahora a una velocidad de

10000 rpm por 60 min. a 4 °C. El sobrenadante obtenido se incorporó a tubos eppendorf y se centrifugó a 11000 rpm. Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado a través de filtro de Orange Sci PES de 0,2 µm con jeringa BD Plastipak de 1 ml; obteniéndose de este modo el extracto crudo (EC), el cual fue almacenado a -80 °C.

3. Cuantificación proteica por el método de Bradford (Bradford 1976):

El método se basa en la unión de Coomassie Blue G-250 a la proteína. Dicha unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el tradicional método de Lowry.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 25-200 µg/ml para el micrométodo:

Macrométodo:

Reactivo de Bradford	2500 µl
Muestra	50 µl.

Micrométodo:

Reactivo de Bradford	2000 µl
Muestra	150 µl.

Se realizó el blanco correspondiente utilizando el reactivo de Bradford.

4. Screening o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de diferentes tipos mecanísticos

A los EC se les realizaron determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas empleando las siguientes proteasas blanco:

i. *Determinación de actividad inhibitoria de tripsina*

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37 °C. Se siguieron dos procesos para poner en evidencia la inhibición, sin preincubación y con una preincubación a 37 °C durante 15 minutos de la muestra y de la enzima.

Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1 M; CaCl₂.2H₂O 50 mM; pH 7,2.

Solución de enzima: Tipo I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima: $2,8 \times 10^{-7}$ M

Solución de sustrato: BAPNA (N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) 10 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor) 200 µl

Solución de enzima 100 µl

Buffer de reacción 750 µl

Solución de sustrato 50 µl

ii. *Determinación de actividad inhibitoria de papaína*

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 seg a 37 °C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la papaína.

Buffer de reacción: Buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,5; KCl 0,3 M; EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM.

Solución de enzima: Papaína de Carica papaya (Roche).

Concentración de enzima: $4,5 \times 10^{-8}$ M

Solución de sustrato: L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA) 4 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

<i>Muestra (inhibidor)</i>	<i>200 µl</i>
<i>Solución de enzima</i>	<i>100 µl</i>
<i>Buffer de reacción</i>	<i>750 µl</i>
<i>Solución de sustrato</i>	<i>50 µl</i>

iii. Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA)

La actividad fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm mediante medidas continuas durante 120 seg a 37 °C. La inhibición causó disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de la señal registrada.

Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,2 M; pH: 7,5.

Solución de enzima: CPA de páncreas bovino (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima: $7,0 \times 10^{-9}$ M

Solución de sustrato: N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH 10 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

<i>Muestra (inhibidor)</i>	<i>200 µl</i>
<i>Solución de enzima</i>	<i>100 µl</i>
<i>Buffer de reacción</i>	<i>750 µl</i>
<i>Solución de sustrato</i>	<i>50 µl</i>

iv. Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37 °C. Se siguieron dos procesos

para poner en evidencia la inhibición, sin preincubación y con una preincubación de 15 minutos de la muestra y de la enzima.

Buffer de reacción: Tris-HCl 50 mM de pH 8,6 con 10 % de DMSO.

Solución de enzima: Subtilisina de Bacillus Licheniformis (Sigma-Aldrich).

Concentración de enzima: $2,0 \times 10^{-7}$ M

Solución de sustrato: Benzylocarbonyl-glycyl-glycyl-L-leucine4-nitroanilide (GLPNA) Bachem.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor) 200 μ l

Solución de enzima 100 μ l

Buffer de reacción 750 μ l

Solución de sustrato 50 μ l

v. Determinación de la $i_{0.5}$

Los estudios de inhibición se han convertido en componentes esenciales en la investigación del mecanismo de acción de drogas. Estos fármacos exponen sus efectos de inhibición enzimática modulando o modificando las distintas vías metabólicas.

En general, los bioquímicos y farmacéuticos utilizan distintos parámetros para caracterizar un fármaco. Por un lado los bioquímicos expresan los resultados de los estudios de inhibición en términos de ecuaciones de velocidad y por lo tanto en términos de constantes de inhibición; mientras que los farmacéuticos normalmente usan la concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición bajo condiciones estándar, simbolizándola como $i_{0.5}$ (CORTES, 2001).

En este trabajo determinamos la $i_{0.5}$ ya que hemos visto, que en general estos inhibidores son utilizados para ensayos farmacológicos y biomédicos. Para ello se utilizaron distintas concentraciones de extracto crudo en presencia de una concentración de enzima y sustrato constante, obteniendo la velocidad de

reacción en cada caso, tal como se describió en los incisos i, ii, iii y iv de este apartado.

5. Tratamiento térmico del extracto crudo:

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas (Bartová, 2008). En base a esta premisa, las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 70 °C, 85 °C, y 100 °C durante 60 minutos en baño de María. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11000 rpm durante 90 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

6. Método para concentrar proteínas

Liofilización

Proceso que consiste en deshidratar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es decir que, el el hielo (sólido) pasó directamente a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene un producto seco, esponjoso mejorando su estabilidad y fácilmente de ser re-disuelto en agua.

Se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debe estar congelado a temperaturas entre 10 y 15°C por debajo de su temperatura eutéctica (temperatura más baja a la cual es posible encontrar una fase líquida) para evitar la formación de cristales de H₂O. Se coloca el producto en un contenedor o cámara hermética y se procede a realizar vacío en la misma hasta alcanzar una presión por debajo de la presión de vapor correspondiente al hielo a la temperatura de congelamiento. Manteniendo siempre el producto por debajo de la temperatura eutéctica, se produce la sublimación del hielo. Los vapores producidos en la sublimación son retenidos en un condensador que se encuentra a una temperatura inferior a la del producto congelado. Cuando todo el hielo es eliminado, se dice que el secado primario ha sido terminado. El secado secundario o desorción se realiza para eliminar las últimas trazas de agua

ligada al producto, esta etapa requiere de un alto vacío y de calefacción a la temperatura máxima que admitía el mismo sin desnaturalizarse. Finalizado el proceso el producto debe almacenarse en un contenedor hermético ya que por su estado es ávido de captar humedad ambiente.

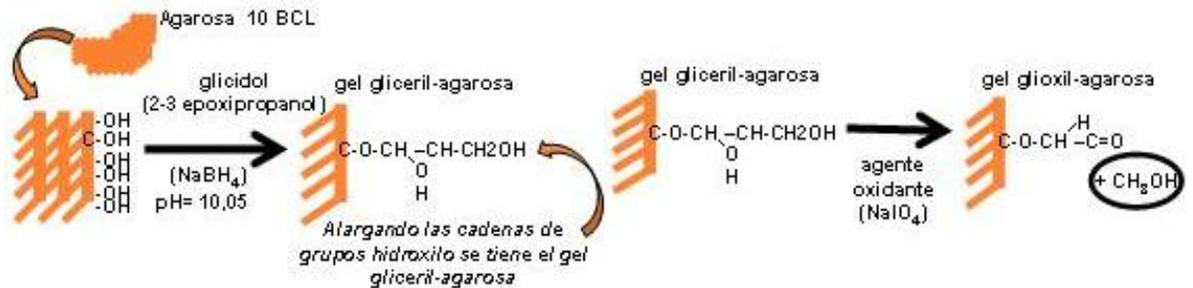
Ventajas de la técnica de liofilización:

- La temperatura a la que es sometido el producto, se encuentra por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.*
- Debido a la baja temperatura a la que se opera, la pérdida de los constituyentes volátiles es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.*
- Se eliminan los fenómenos de oxidación, dado que se opera y envasa a alto vacío.*
- La gran porosidad del producto facilita la reconstitución con rapidez por la adición de agua o del solvente adecuado.*
- Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad.*

7. Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa

El soporte utilizado para la inmovilización de Carboxipeptidasa A fue agarosa 10 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoácidos de la enzima, utilizando el protocolo de activación de (Soler, 1997). Se preparó una solución de agarosa de 180 ml (conteniendo 105 ml de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución conteniendo 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH₄ y luego se agregaron gota a gota 36 ml de glicidol. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 horas aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Luego se lavó el gel varias veces con abundante agua destilada, operación que se realizó filtrando bajo vacío (en un filtro con fritas para no dañar la agarosa). De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1.410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO₄ en 240 ml de agua

destilada (100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel glioxil-agarosa con abundante agua destilada de igual forma a la descrita previamente.



La inmovilización se realizó a 25° C, pH 10, empleando:

- 250 ml de una solución conteniendo: bicarbonato de sodio 100 mM, la cual provee el pH óptimo para la unión de la enzima al soporte, y glicerina al 25% (v/v) que protege la enzima favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre proteínas, previniendo su desplegado,

- una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml.

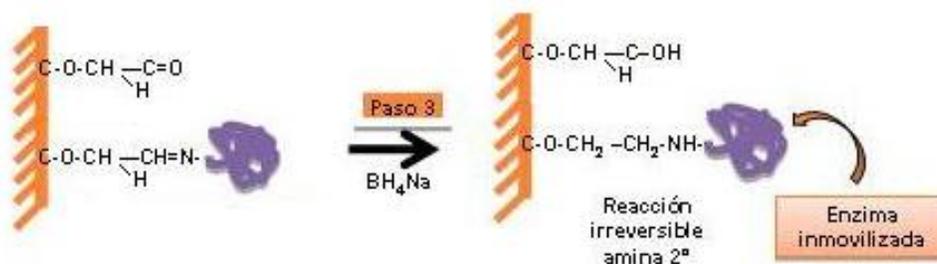
Esta mezcla se mantiene en agitación durante 3 horas. A lo largo de este período de tiempo se obtienen muestras a cada hora, y se mide actividad enzimática.

La reacción entre el CHO de la glioxil agarosa y el NH_2 de la enzima (Lys), se producirá cuando el amino se encuentre en forma no ionizada. Por esta razón es que la reacción debe realizarse a pH 10. El pKa de la Lys es 10,8 con lo cual a pH 10 existe una alta población de moléculas en forma no ionizada (a pH > pKa existen forma no ionizada).



El enlace tipo Base de Schiff es un enlace reversible (en el que se encuentran en equilibrio la forma glioxil agarosa, con la forma unida por doble enlace a la enzima). Por eso sería conveniente que la unión entre el soporte y la enzima se produzca al menos en 2 sitios, para procurar que incluso en el equilibrio tengamos un punto unido. Sin embargo, desde el punto de vista dinámico-estructural es conveniente que la enzima se encuentre unida al soporte en un único enlace, así posee la movilidad necesaria para accionar correctamente.

Luego del transcurso de las 3 horas, se incorpora borohidruro de sodio manteniendo la agitación durante 30 min. con el recipiente destapado para permitir la salida del H_2 desprendido de la reacción.



El $NaBH_4$ reduce el doble enlace reversible de la base de Schiff, obteniendo un enlace amina, esta reacción desprende hidrógeno en cuanto se le pone en contacto con el agua. Los grupos glioxil que no han reaccionado con la enzima son reducidos a alcohol.

Luego se lava con abundante agua destilada en embudo de vidrio fritado. Por último se lava con buffer adecuado para mantener la enzima en condiciones óptimas.

8. Purificación cromatográfica

Se realizó una cromatografía de afinidad con CPA inmovilizada en glioxil-agarosa. El extracto crudo y los tratamientos térmicos fueron clarificados por centrifugación durante 60 minutos a 13000 rpm y a $4^\circ C$. Se sembraron 50 ml del EC en la columna cromatográfica y fueron eluidos a una velocidad de 1ml/min, luego se lavó la misma con buffer de reacción de CPA (Tris-HCl 0,1M, ClNa 0,2

M, pH 7,2) recolectando la fracción no retenida y midiendo la absorbancia a 280 nm. hasta llegar a 0. Finalmentel la fracción retenida fue eluida con un descenso progresivo del pH, cambiando el buffer de elución primero por ácido acético a pH 5 y luego ácido acético a pH 3 para lograr la desestabilización del complejo CPA-inhibidor. Para conservar la columna, la misma fue lavada con Tris-HCl 0,1M, ClNa 0,2 M, pH 7,2, también pudo haber sido empleado etanol al %20.

A cada una de las fracciones eluidas se les determinó actividad inhibitoria y concentración de proteínas.

Este soporte conteniendo a la enzima inmovilizada, atrapada mediante uniones covalentes (base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa), puede ser reutilizado en muchas aplicaciones ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa.

9. Electroforesis 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 que en el caso del clásico buffer Tris-glicina. Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T¹ y 3% C²), un gel espaciador (10% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C).

$^1\%T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) \times 100 / \text{volumen total}$

$^2\%C = g \text{ bis-acrilamida} \times 100 / (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida})$

Preparación de las muestras

El extracto crudo sin tratar y los extractos crudos tratados térmicamente y liofilizados se redisolvieron en buffer de muestra 6x para electroforesis y se llevaron a ebullición durante 5 min.

Buffer de muestra 6x:

Tris

9,42 gr

SDS	12,00 gr
Mercaptoetanol	30,00 ml
Glicerol	48,00 ml
Azul de bromofenol	12,00 mgr
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:

Buffer del gel:

Tris	36,3 gr
SDS	0,3 gr
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,45
AD, c.s.p.	100 ml

Gel de apilamiento (4%T, 3%C):

Acril-Bis (49,5:3)	0,400 ml
Buffer del gel	1,250 ml
AD	3,400 ml
PSA 10 %	0,040 ml
TEMED	0,007 ml

Gel de resolución (16,5%T, 3%C):

Acril-Bis (49,5:3)	3,300 ml
Buffer del gel	3,300 ml
AD	3,400 ml
PSA 10 %	0,040 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.

Buffer Anódico 2 M:

<i>Tris</i>	<i>24,2 gr</i>
<i>HCl 1 M, c.s.p.</i>	<i>pH = 8,9</i>
<i>AD, c.s.p.</i>	<i>1000 ml</i>

Buffer Catódico 1 M:

<i>Tris</i>	<i>12,1 gr</i>
<i>Tricina 0,1 M</i>	<i>17,9 gr</i>
<i>SDS 0,1 %</i>	<i>1,0 gr</i>
<i>AD, c.s.p.</i>	<i>1000 ml</i>

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 105 V al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Fijación y Tinción:

Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Solución fijadora:

<i>Acido acético glacial</i>	<i>100 ml</i>
<i>Metanol</i>	<i>400 ml</i>
<i>AD, c.s.p</i>	<i>1000 ml</i>

Solución colorante:

Acido acético glacial	100 ml
Coomassie brilliant blue R-250	250 mgr
AD, c.s.p.	1000 ml

Solución decolorante:

Acido acético glacial	100 ml
AD, c.s.p.	1000 ml

Tinción con Coomassie Coloidal

La tinción de proteínas por este método (Neuhoff, 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng. Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metanólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (background) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel. Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo.

Solución colorante:

Sulfato de amonio	17,0 gr
Acido acético glacial	0,5 ml
Metanol	34,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 gr
AD, c.s.p.	100 ml

Patrón de Peso Molecular

GE Healthcare

Protein	Mr(Da)
Phophorylase b	97 000
Albumin	66 000
Ovalbumin	45 000

Carbonic	
anhydrase	30 000
Trypsin inhibitor	20 100
α -Lactalbumin	14 400

10. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) (Westergaard, 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). Esta técnica 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a liofilizar las mismas (con excepción del extracto crudo) y luego a redissolver 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 fue necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Solución de poliacrilamida al 5%:

<i>Acrilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C)</i>	<i>2,0 ml</i>
<i>Agua MQ</i>	<i>5,5 ml</i>
<i>Anfolitos (Bio-Lyte 3/10)</i>	<i>0,5 ml</i>
<i>Glicerol (25% p/v)</i>	<i>2,0 ml</i>

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:

<i>Riboflavina (sol. saturada)</i>	<i>100 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>5 µl</i>
<i>PSA al 10 %</i>	<i>70 µl</i>

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 µl realizando 9 siembras por placa como máximo), permitiendo que las mismas difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con agua destilada) 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 durante los siguientes 15 min y 450 V durante 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:

<i>Acido sulfosalicílico</i>	<i>4 gr</i>
<i>Metanol</i>	<i>30 ml</i>
<i>TCA</i>	<i>12,5 gr</i>
<i>AD, c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

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

Solución colorante:

<i>CuSO₄ (se disolvió primero en agua)</i>	<i>500 mgr</i>
<i>Acido acético glacial</i>	<i>10 ml</i>
<i>Etanol</i>	<i>27 ml</i>
<i>Coomassie brilliant blue R-250</i>	<i>40 mgr</i>
<i>AD, c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

Solución decolorante I:

<i>Acido acético glacial</i>	<i>7 ml</i>
<i>Etanol</i>	<i>2 ml</i>
<i>CuSO₄</i>	<i>500 mgr</i>
<i>AD, c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

Solución decolorante II:

<i>Acido acético glacial</i>	<i>7 ml</i>
------------------------------	-------------

Etanol	12 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Estimación de los *pI*

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (*pI*) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar los siguientes patrones:

Componentes de los kit de calibración de *pI* GE Healthcare

Kit	Proteína	<i>pI</i> (Native)
Broad <i>pI</i> Kit (<i>pI</i> 3.5-9.3)	Amylglucosidase	3.50
	Methyl red (dye)	3.75
	Trypsin inhibitor	4.55
	α-Lactoglobulin A	5.20
	Carbonic anhydrase B (bovine)	5.85
	Carbonic anhydrase B (human)	6.55
	Myoglobin, acidic band	6.85
	Myoglobin, basic band	7.35
	Lentil lectin, acidic	8.15
	Lentil lectin, middle	8.45
	Lentil lectin, basic	8.65
	Trypsinogen	9.30
	Low <i>pI</i> Kit (<i>pI</i> 2.8-6.5)	Pepsinogen
Amylglucosidase		3.50
Methyl red (dye)		3.75
Glucose oxidase		4.25
Trypsin inhibitor		4.55
α-Lactoglobulin A		5.20
Carbonic anhydrase B (bovine)		5.85
Carbonic anhydrase B (human)	6.55	
High <i>pI</i> Kit (<i>pI</i> 5.2-10.3)	α-Lactoglobulin A	5.20
	Carbonic anhydrase B (bovine)	5.85

<i>Carbonic anhydrase B (human)</i>	6.55
<i>Myoglobin, acidic</i>	6.85
<i>Myoglobin, basic</i>	7.35
<i>Lentil lectin, acidic</i>	8.15
<i>Lentil lectin, middle</i>	8.45
<i>Lentil lectin, basic</i>	8.65
<i>Trypsinogen</i>	9.30
<i>Cytochrome c</i>	10.25

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.

11. Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas MALDI-TOF descrita inicialmente por Hillenkamp (Hillenkamp and Karas, 1990) es una técnica precisa y muy sensible para la determinación de masas moleculares de hasta 200000 Da. 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 a (tiempo de vuelo)

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. 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 and Chait, 1989).

12. Métodos Proteómicos

i. Intensity Fading (IF) por MALDI-TOF/MS

Es un procedimiento muy versátil que se utiliza para la de detección, el seguimiento, la identificación o el análisis estructural de los analitos; ya que se manejan muchas variables operativas según las muestras y reactivos que se utilicen.

El método fue desarrollado para identificar inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación total o parcial de la intensidad iónica molecular de una proteína, después de adicionar su contraparte molecular, cuando se compara con un espectro de masas control de la muestra inicial. Una variante desarrollada posteriormente, incluye una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la

micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

- Desalado de extractivos

Los extractos biológicos fueron desalados y concentrados como fue descrito por Villanueva, 2003. La matriz de C18 fue activada con acetonitrilo, luego se eliminó y 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 vinculados 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.

- Condiciones experimentales para IF MALDI-TOF MS

Los experimentos de Intensity Fading MALDI-TOF MS fueron llevados a cabo utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Para el análisis, la muestra biológica (1µl) fue mezclada con una solución de ácido sinapínico en TFA 0,1% (2 µl) como matriz y luego fue depositada sobre una placa de siembra (polished steel) y se dejó secar a T° ambiente (Hillenkamp and Karas, 1990; Alonso-del-Rivero, 2009).

La técnica abarca actualmente dos tipos de métodos de análisis:

Método directo: En el cual el complejo proteína-ligando es directamente desorbido e ionizado por espectrometría de masas MALDI (Yanes and Aviles, 2007)

Método indirecto: La muestra fue sometida (previamente al análisis por MALDI-TOF/MS) a una cromatografía de afinidad usando enzimas inmovilizadas en resinas tales como agarosa 10 BCL activada con glicidol (Guisán, 1991) y Sepharose® 4B activada con CNBr (Yanes and Villanueva, 2007). El procedimiento adecuado indica en primera instancia, analizar los extractos desalados por MALDI-TOF/MS a fin de obtener un espectro de masas control. Luego, los extractos fueron sometidos a una cromatografía de afinidad con proteasas inmovilizadas, el material proveniente del lavado fue sometido a un nuevo análisis de MALDI-TOF y las fracciones que tenían señales diferentes o desaparición de señales fueron consideradas para los posteriores experimentos. Luego se eluyó con ácido fórmico 1% y esas muestras fueron analizadas también por MALDI-TOF para verificar la presencia del inhibidor que se había unido a la matriz (Yanes and Villanueva, 2005).

ii. Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint)

La huella peptídica o Peptide mass fingerprint (PMF) es una técnica analítica para la identificación de proteínas. Un aspecto clave para el PMF es que el genoma del organismo debe ser conocido y estar disponible. Brevemente, la proteína de interés desconocida es cortada en péptidos por una enzima (una de las mas usadas es la tripsina) que no genera muchos péptidos. 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.

- **Digestión triptica**

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 NH_4HCO_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 NH_4HCO_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 triptica fue lograda usando buffer NH_4HCO_3 100 mM pH: 8,5 conteniendo tripsina (4ng/ μl) 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).

- **PMF por MALDI-TOF/MS**

Los péptidos, productos de la digestión triptica, fueron sembrados en una placa ground steel MP 384 utilizando como matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-HCCA) y fueron analizados por MALDI-TOF/MS. La identificación del mapa triptico se intentó obtener usando el programa Mascot tool (<http://www.matrixscience.com>) según los siguientes parámetros de búsqueda: (1) Tipo de búsqueda, Peptide mass Fingerprint; (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, \pm 1000 ppm; (9) Carga de la proteína, +1. Valor de probabilístico de MOwse: El valor de la proteína es $-10 \cdot \text{Log}(P)$, 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, 2011; Obregon, 2009a; Obregon, 2009b).

Referencias Materiales y métodos

Alonso-del-Rivero, M., S. A. Trejo, et al. (2009). "A novel metalloprotease-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases." *FEBS J* 276(17): 4875-90.

Bartová V., J. B. (2008). "Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice."

Beavis, R. C. and B. T. Chait (1989). "Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins." *Rapid Commun Mass Spectrom* 3(7): 233-7.

Bradford, M. 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.

CORTES Antoni, M. C., Maria Luz CARDENAS and Athel CORNISH-BOWDEN (2001). "Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition : new ways of analysing data" *Biochem. J.* 357: 263±268.

Faigenbaum M, H., Zunino, P. «[Biología de Cultivos Anuales, Papa. Sistema caular](#)». Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Faigenbaum M, H., Zunino, P. «[Biología de Cultivos Anuales, Papa. Tubérculo](#)». Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Guisan, J. M., A. Bastida, et al. (1991). "Immobilization-stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels." *Biotechnol Bioeng* 38(10): 1144-52.

Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." *Methods Enzymol* 193: 280-95.

Milan, Dimitri (1987). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas.* ACME S.A.C.I, Buenos Aires.

Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* 9(6): 255-62.

Obregon, W. D., C. S. Liggieri, et al. (2009a). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases." *Protein Pept Lett* 16(11): 1323-33.

Obregon, W. D., C. S. Liggieri, et al. (2009b). "Characterization of papain-like isoenzymes from latex of *Asclepias curassavica* by molecular biology validated by proteomic approach." *Biochimie* 91(11-12): 1457-64.

Obregon, W. D., D. Lufrano, et al (2011). "Biochemical characterization, cDNA cloning, and molecular modeling of araujain all, a papain-like cysteine protease from *Araujia angustifolia* latex." *Planta*.

Soler, G., A. Bastida, et al. (1997). "Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents." *Biochim Biophys Acta* 1339(1): 167-75.

Villanueva, J., O. Yanes, et al. (2003). "Identification of protein ligands in complex biological samples using intensity-fading MALDI-TOF mass spectrometry." *Anal Chem* 75(14): 3385-95.

Westergaard, J. L., C. Hackbarth, et al. (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures." *J Immunol Methods* 34(2): 167-75.

Xin, E., D. Vreugdenhil y A. M. Lammeren (1998). «Cell division and cell enlargement during potatoes tuber formation». *Journal of Experimental Botany* (49). 573-582.

Yanes, O., F. X. Aviles, et al. (2007). "Exploring the "intensity fading" phenomenon in the study of noncovalent interactions by MALDI-TOF mass spectrometry." *J Am Soc Mass Spectrom* 18(2): 359-67.

Yanes and Villanueva, et al. (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.

Yanes, O. and Villanueva, et al. (2007). "Detection of non-covalent protein interactions by 'intensity fading' MALDI-TOF mass spectrometry: applications to proteases and protease inhibitors." *Nat Protoc* 2(1): 119-30.

Resultados

1. Obtención del Extracto Crudo y purificación preliminar

A partir de los tubérculos de Solanum Tuberosum variedad Andigenum subvariedad Churqueña se obtuvieron una serie de Extractos Crudos mediante la metodología descrita en el apartado 2 de M&M.

El Extracto Crudo (EC) más adecuado resultó ser el obtenido a través de la opción IV, en el cual solamente se utilizó agua destilada fría y, luego de las series de centrifugaciones se filtró a través de filtro de 0,2 μ m.

Este extractivo mantuvo la homogeneidad y la transparencia luego de ser congelado y descongelado varias veces, proceso requerido para usar las muestras en estado líquido en los distintos procesos de purificación y caracterización.

Además de la transparencia del extracto, el hecho de no poseer sales, evitó interferencias en las distintas determinaciones experimentales tales como, medidas espectrofotométricas, SDS-PAGE, IEF, técnicas proteómicas, etc.

Los demás extractivos fueron descartados por aumento de turbidez y pardeamiento a medida que descongelamos y congelamos las muestras. Por otra parte, el alto contenido salino interfirió en los ensayos de determinación de actividad, seguimiento de la purificación, observándose una notoria disminución en la recuperación de actividad biológica.

La concentración de proteínas del EC final elegido para continuar con los ensayos posteriores de caracterización fue de 789,412 μ g/ml.

2. Screening de inhibidores: Actividad inhibitoria de la muestra frente a enzimas de distintos tipos mecanísticos

Al extractivo se le determinó la actividad inhibitoria de enzimas con diversos mecanismos de reacción, como ser, carboxipeptidasa A (metaloproteasa), Papaína, (cisteínproteínasa), Subtilisina y Tripsina (serinproteasas), con el fin de evaluar ante qué tipo de enzima el EC posee mayor actividad inhibitoria. Dicha actividad inhibitoria

se manifiesta, a través de la disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato, la cual puede ser determinada espectrofotométricamente, según la metodología descrita en el ítem 4 de M&M.

i. Inhibición de Carboxipeptidasa A (CPA)

La actividad de carboxipeptidasa (metalo-carboxipeptidasa) se manifiesta por un aumento en la velocidad de desaparición del color naranja que posee el sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH (AFP), detectado a una longitud de onda de 350 nm., y se corresponde con un aumento en la velocidad de hidrólisis del sustrato. Al incorporar el extractivo se determinó la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa que se manifiesta por una disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción correspondiente con la disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato.

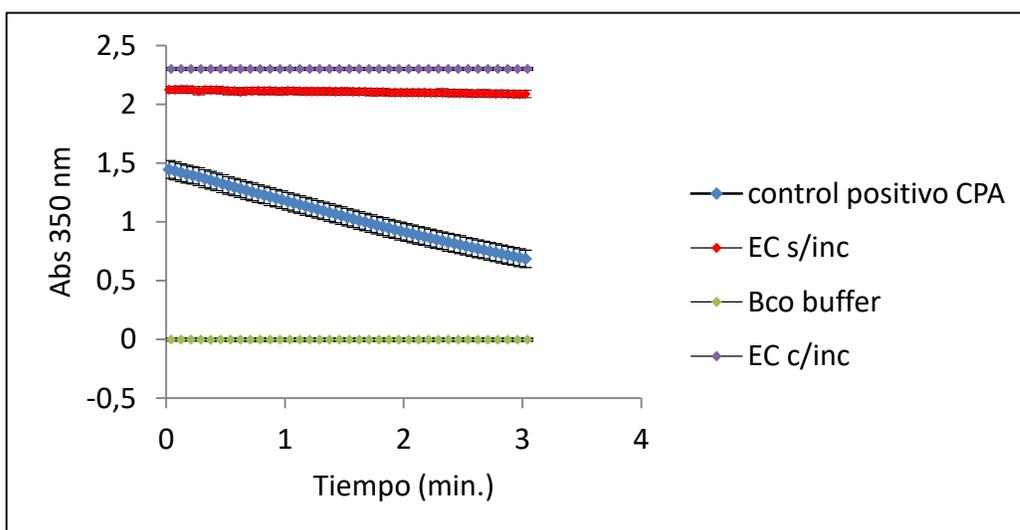


Figura 1: Control positivo CPA: buffer de reacción + enzima + sustrato; EC s/inc: buffer de reacción + enzima + sustrato+ Extracto Crudo, sin incubación previa.; Bco buffer: buffer de reacción; EC c/inc: buffer de reacción + enzima + sustrato+ Extracto Crudo incubado durante 15 min a 37°C.

En la figura 1 se observa que la actividad de la enzima Carboxipeptidasa A cayó instantáneamente en presencia de 200 μ L de EC (789,412 μ g/ml). Asimismo,

observamos que la actividad inhibitoria se mantiene al 100% cuando la muestra está incubada y también sin incubar, por lo que se podría tratar de una reacción irreversible de rápido equilibrio.

ii. Inhibición de Papaína

La actividad hidrolítica de la papaína (proteasa cisteínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37 °C. Este aumento en la absorbancia se manifestó debido a la hidrólisis del sustrato específico PFLNA. Uno de los productos de esta reacción es el paranitrofenol (PNF) el cual es el responsable del incremento del color amarillo a medida que se produce la reacción de hidrólisis. El grado de inhibición pudo ser determinado por la constancia en la absorbancia debida a la no hidrólisis del sustrato sintético por parte de la papaína.

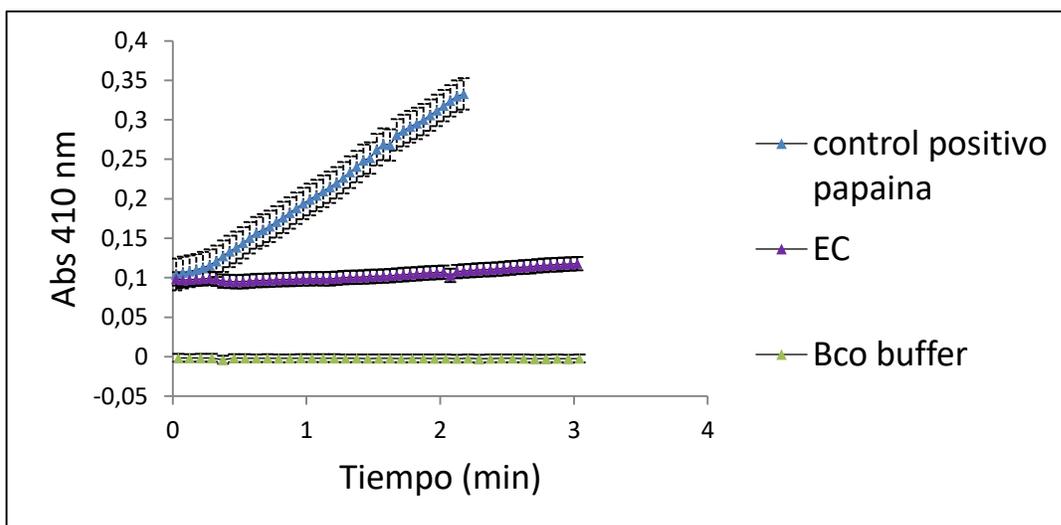


Figura 2: Control positivo papaina: buffer de reacción + enzima + sustrato; EC : buffer de reacción + enzima + sustrato+ Extracto Crudo.; Bco buffer: buffer de reacción

La figura 2 nos muestra la actividad de papaína en presencia y en ausencia de EC. Como puede observarse, la actividad de dicha enzima cae un 90% luego del agregado de 200 μ l de EC (789,412 μ g/ml.).

iii. Inhibición de subtilisina

La actividad de esta enzima (proteasa serínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm. ya que el compuesto derivado de la hidrólisis del sustrato GLPNA posee la capacidad de emitir radiación, detectada a dicha longitud de onda.

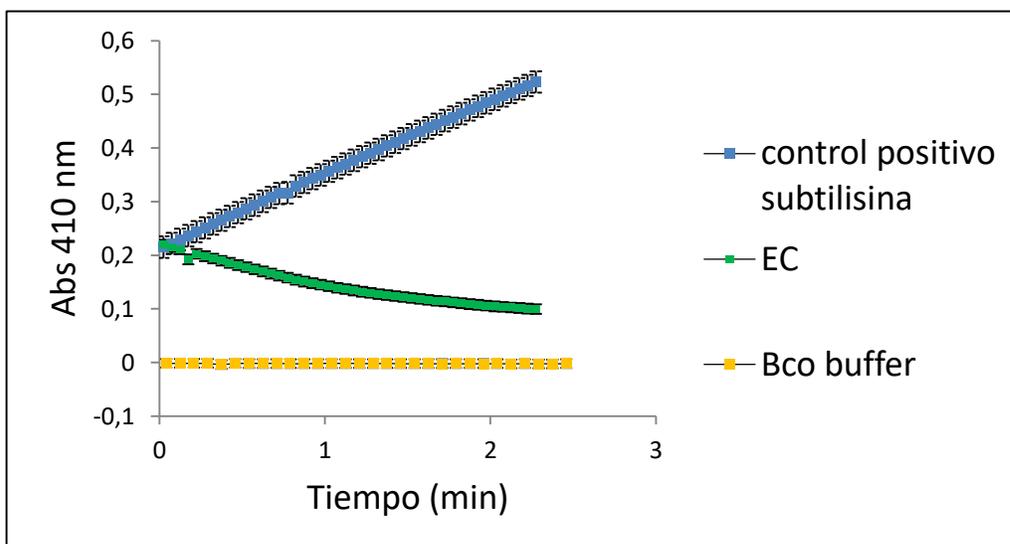


Figura 3: Control positivo subtilisina: buffer de reacción + enzima + sustrato; EC: buffer de reacción + enzima + sustrato+ Extracto Crudo.; Bco buffer: buffer de reacción

Al cabo de 2,3 minutos de incorporar 200 μ l de EC se puede observar que la actividad de Subtilisina cae al 100%, lo que indica una disminución de la velocidad de hidrólisis.

iv. Inhibición de Tripsina

La actividad de la tripsina (proteasa serínica) fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm debido a la hidrólisis del sustrato BAPNA, mediante medidas continuas durante 180 seg. a 37 °C.

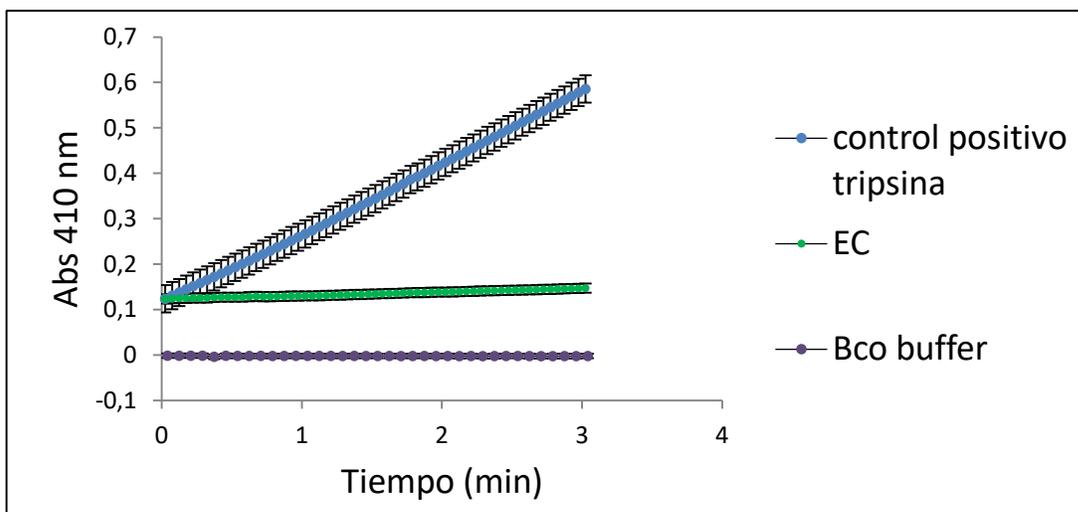


Figura 4: Control positivo tripsina: buffer de reacción + enzima + sustrato; EC : buffer de reacción + enzima + sustrato+ Extracto Crudo.; Bco buffer: buffer de reacción.

Aquí se puede observar que la actividad enzimática de Tripsina disminuye un 95 %. Al igual que en los casos anteriores, la inhibición de la enzima es notable; lo cual también representa un interesante resultado para la búsqueda de moléculas inhibitoras específicas de esta enzima.

En cada caso se realizaron dos tipos de controles negativos. El primero se realizó preincubando el sustrato con el buffer de reacción y el segundo ensayo preincubando la enzima con el mismo buffer. Esto permitió corroborar que el sustrato y los demás reactivos son estables durante la preincubación.

Con los resultados obtenidos, podemos decir que el Extracto Crudo de Churqueña presenta una intensa actividad inhibitoria al ser expuesto frente a proteasas como Carboxipeptidasa A, Papaína, Subtilisina y Tripsina, lo cual puede observarse en la Figura 5.

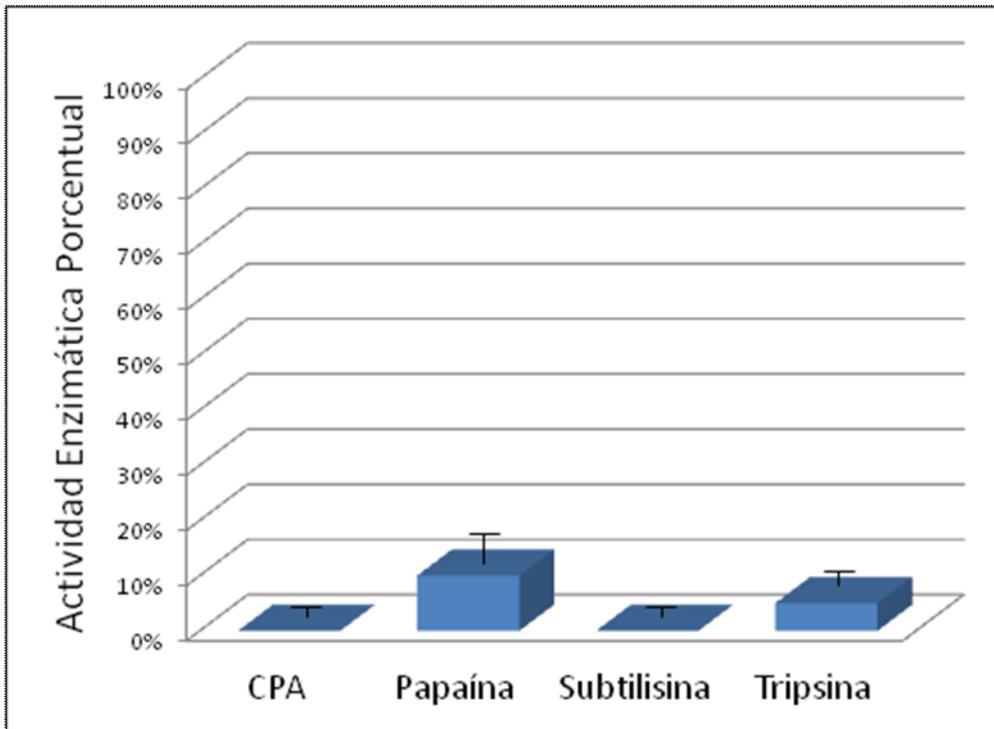


Figura 5: Actividad Enzimática Residual Porcentual.

La inhibición observada en las distintas enzimas en principio, podría indicar, que nos encontramos en presencia de moléculas inhibidoras específicas para cada tipo de proteasa. A la hora de la elección del tipo de inhibidor a estudiar no solamente se tuvieron en cuenta las destacadas actividades inhibitorias, sino también, los datos bibliográficos, la disponibilidad de enzima control, sustratos cromogénicos para seguimiento, factibilidad de obtención de resultados y posibilidad de aplicación biológica. En base a lo anterior se decidió aislar, purificar y caracterizar inhibidores de Carboxipeptidasas.

3. Aislamiento y caracterización de inhibidores de Carboxipeptidasa A

A partir de lo expuesto anteriormente los ensayos continuaron centrados en la purificación y caracterización de inhibidores correspondientes a la enzima Carboxipeptidasa A

i. Curva Dosis-Respuesta del Extracto Crudo frente a CPA

Se realizó una curva dosis-respuesta del extracto con el fin de determinar la cantidad de muestra que posee la concentración adecuada de inhibidor para lograr la máxima inhibición de CPA. Se observó que a medida que aumenta la cantidad de extracto en el medio de reacción, disminuye asintóticamente la actividad de la enzima. A partir de una concentración de extracto igual o mayor a 160 $\mu\text{g/ml}$, observamos que la curva de inhibición se mantiene en una meseta constante con muy baja actividad enzimática. Podemos considerar a este punto como la concentración de extracto que inhibe casi en un 100% la actividad enzimática presente en el tubo de reacción, en las condiciones de ensayo establecidas previamente. Esta curva también nos permitirá obtener la $i_{0.5}$ el cual, como fue expresado anteriormente, es un parámetro utilizado por varios autores en estudios farmacológicos y biomédicos para describir la cantidad de un inhibidor presente en un extracto.

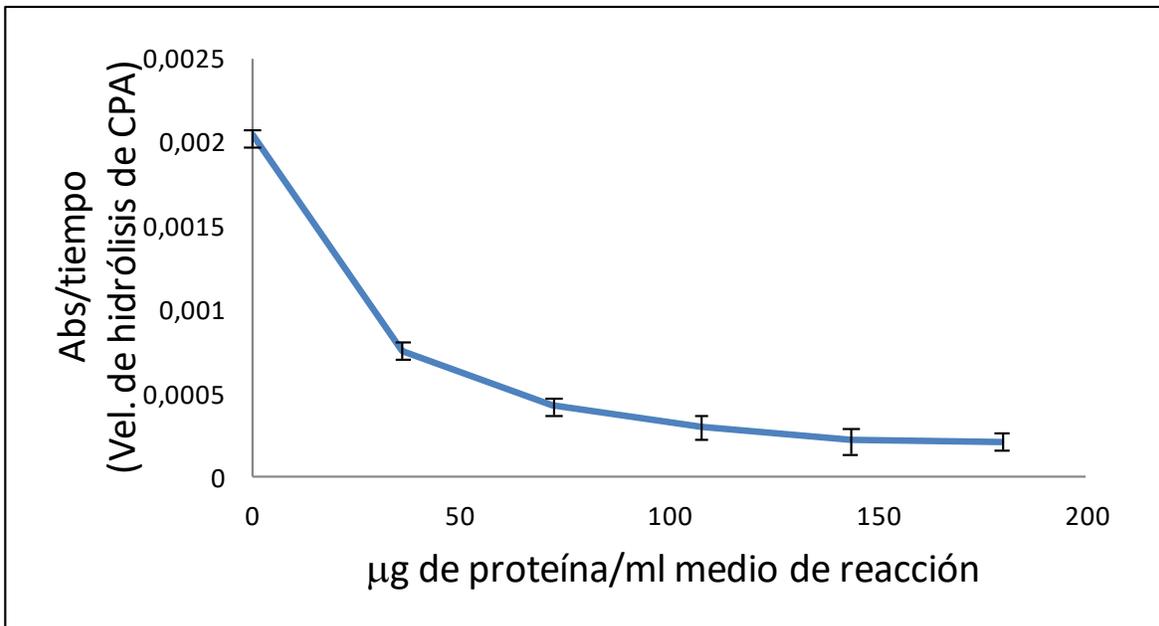


Figura 6: Curva dosis-respuesta del EC

La $i_{0.5}$ determinada luego de realizar la curva Dosis-Respuesta presentada en la Figura 6 es de 22,17 μg . de proteína/ml medio reacción.

$i_{0.5}$: es la concentración de inhibidor que disminuye la actividad enzimática a un 50 % de la actividad inicial.

ii. Efecto de tratamientos térmicos

Teniendo en cuenta que el inhibidor de CPA es un péptido termorresistente, el EC fue sometido a tratamientos térmicos a 60°C, 70°C, 85°C y 100 °C durante 60 min., en cada caso. Luego se procedió a centrifugar cada muestra a una velocidad de 11000 rpm durante 90 min a 4 °C. Se recibió el sobrenadante en tubos eppendorf limpios y se continuó con el ensayo de determinación de la concentración proteica.

A cada una de las muestras se le estimó mediante el reactivo de Bradford la concentración proteica. Se puede observar de esta manera el efecto que el calor ejerce sobre las proteínas solubles contenidas en la muestra (Tabla 1).

Muestra	concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)
EC	789,412
TT 60	112,588
TT 70	87,882
TT 85	92,588
TT 100	82,588

Tabla 1: Concentración proteica de cada tratamiento térmico. EC: Extracto Crudo; TT60: Tratamiento Térmico a 60°C; TT70: Tratamiento Térmico a 70°C; TT85: Tratamiento Térmico a 85°C; TT100: Tratamiento Térmico a 100°C.

Como puede apreciarse, la gran pérdida de proteínas que se obtuvo se debe a la desnaturalización térmica de las mismas. Se destaca que los tratamientos a 70°C, 85°C y 100°C prácticamente no presentan diferencias en la concentración final de proteínas obtenidas. Luego se procedió determinando la actividad inhibitoria de dichos tratamientos verificando la hipótesis de la estabilidad térmica que poseen dichos inhibidores.

iii. Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.

En el siguiente ensayo se procedió a verificar que los inhibidores de carboxipeptidasa poseen estabilidad térmica incluso incubándolos a una temperatura de 100°C. De esta manera a cada tratamiento térmico se le determinó la actividad inhibitoria sobre Carboxipeptidasa A.

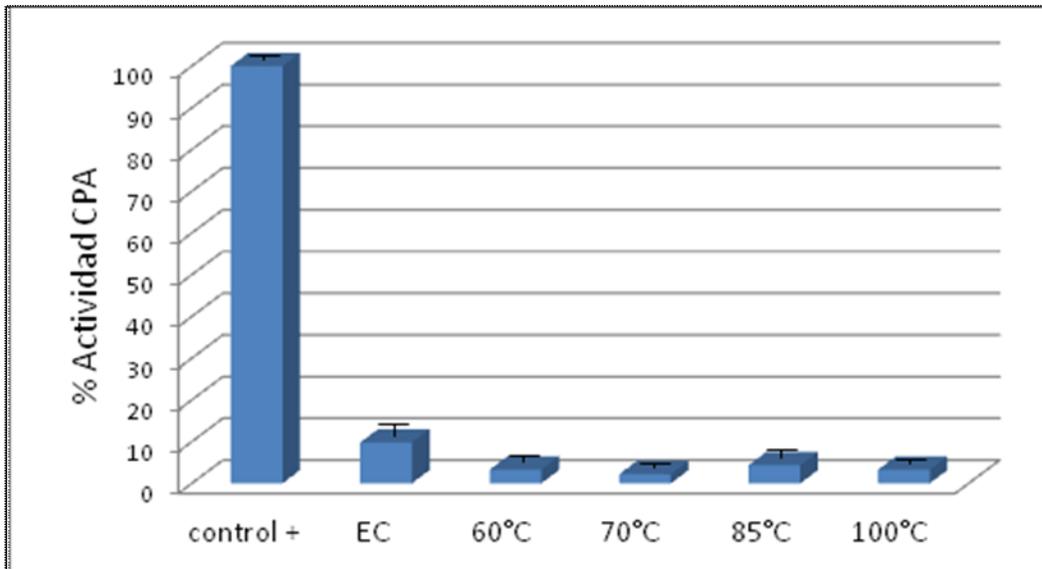


Figura 7 : Actividad enzimática de Carboxipeptidasa A en presencia de la muestra tratada a distintas temperaturas.

Se observa que la actividad inhibitoria de CPA se conserva con los diferentes tratamientos térmicos, a pesar de la gran pérdida de proteínas que se obtuvo debido a la desnaturalización de las mismas.

Por lo tanto se puede observar que la disminución del contenido proteico se contrasta con la actividad inhibitoria obtenida, es decir, que el tratamiento térmico afecta a las demás proteínas que constituyen el EC excepto a los inhibidores, generando un tratamiento preliminar de muy alto rendimiento de purificación.

iv. **Perfil electroforético del EC y los tratamientos térmicos de Churqueña**
Electroforesis SDS-PAGE.

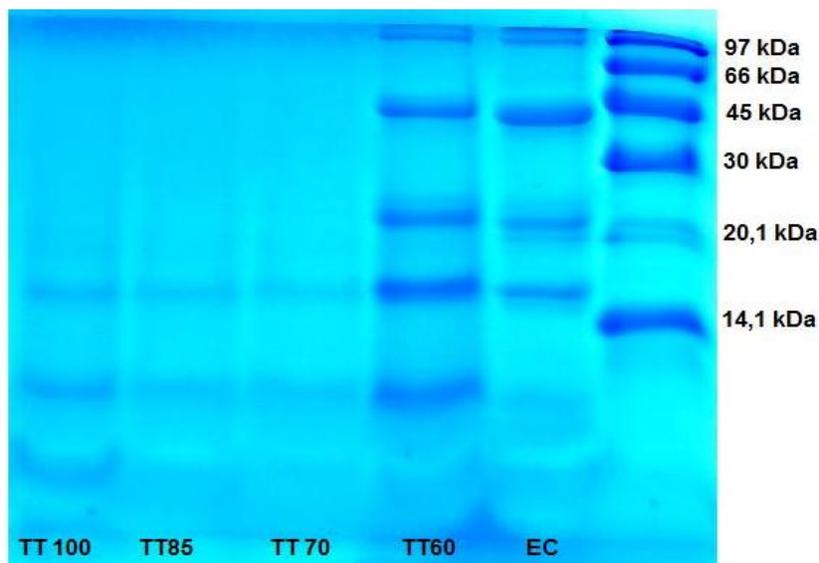


Figura 8: Electroforesis SDS-PAGE, TT100: EC tratado a 100 °C; TT85: EC tratado a 85 °C; TT70: EC tratado a 70 °C; TT60: EC tratado a 60 °C, EC: Extracto Crudo.

La figura 8 muestra la distribución de masas moleculares de las proteínas constituyentes del EC y de los Tratamientos Térmicos a 60, 70, 85 y 100 °C. Se observan bandas intensas de alrededor de 45 KDa., 20 KDa. y menores de 10 KDa. Entre las bandas menores a 10 KDa. se encuentran los inhibidores de CPA, se puede observar que se conservan con los tratamientos térmicos, lo cual ya fue demostrado en las curvas de actividad inhibitoria anteriores.

v. **Estimación del Punto Isoeléctrico**

Para estimar el punto isoeléctrico de las proteínas contenidas en el EC y los tratamientos térmicos, se realizó un isoelectroenfoque empleando en el gel de desarrollo anfolitos de pI de 3 a 10 (apartado 9 de M&M). Se usaron patrones de pI de amplio rango (3,5-9,3)

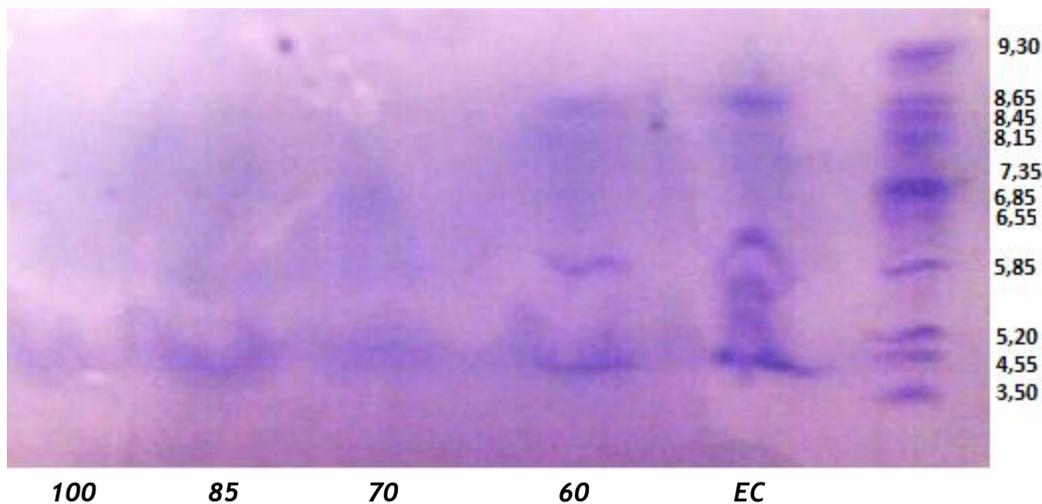


Figura 9: Isoelectroenfoque (con anfolitos de pI de 3 a 10), Tratamientos Térmicos a $100^{\circ}C$ (100), $85^{\circ}C$ (85), $70^{\circ}C$ (70) y $60^{\circ}C$ (60); Extracto Crudo (EC).

Como se puede observar en la Fig. 9 las proteínas de interés que se encontrarían en los tratamientos térmicos de $100^{\circ}C$ enfocan a pI s ácidos, por lo que decidimos realizar otro ensayo de IEF utilizando anfolitos de ese rango de pI . Por otro lado, se puede notar, que las muestras no se observan nítidamente, por lo tanto fueron concentradas mediante liofilización para poder visualizarlas.

En base a los resultados obtenidos se realizó un nuevo IEF con anfólitos de pl de 3 a 7.

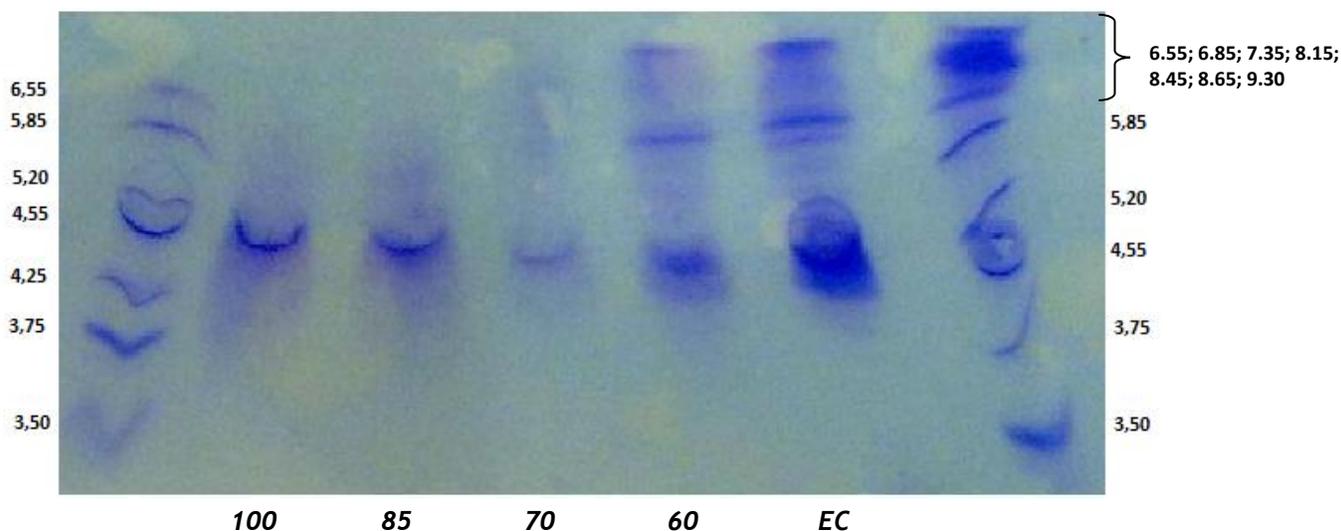


Figura 10: Isoelectroenfoque (con anfólitos de pl de 3 a 7), Tratamientos Térmicos a 100°C(100), 85°C(85), 70°C(70) y 60°C(60); Extracto Crudo (EC). Arriba a la derecha se observan los patrones de pl apilados entre los pl de 6,55 a 9,30.

Se visualizan proteínas, en los tratamientos térmicos de 70, 85 y 100°C, que enfocan en su mayoría en pls de alrededor de 4,5. A su vez, podemos apreciar en este ensayo, al igual que en el SDS-page, la disminución de las proteínas presentes en el EC en cada Tratamientos Térmico.

vi. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI/TOF del EC y las muestras tratadas térmicamente

Los tratamientos térmicos y el extracto crudo fueron analizados en el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) como parte de un intercambio realizado en el Proyecto de Cooperación Bilateral: Genómica y Proteómica de Biomoléculas de Origen Vegetal otorgado por el MinCyT de Argentina y el MICINN de España.

El objetivo de este análisis es la reconfirmación de la disminución del contenido proteico en las muestras tratadas térmicamente, ya que en la electroforesis SDS-PAGE no es posible visualizar las moléculas de menor peso molecular. La aplicación de una técnica versátil de mayor resolución tal como lo es la espectrometría de masas nos permite realizar este análisis.

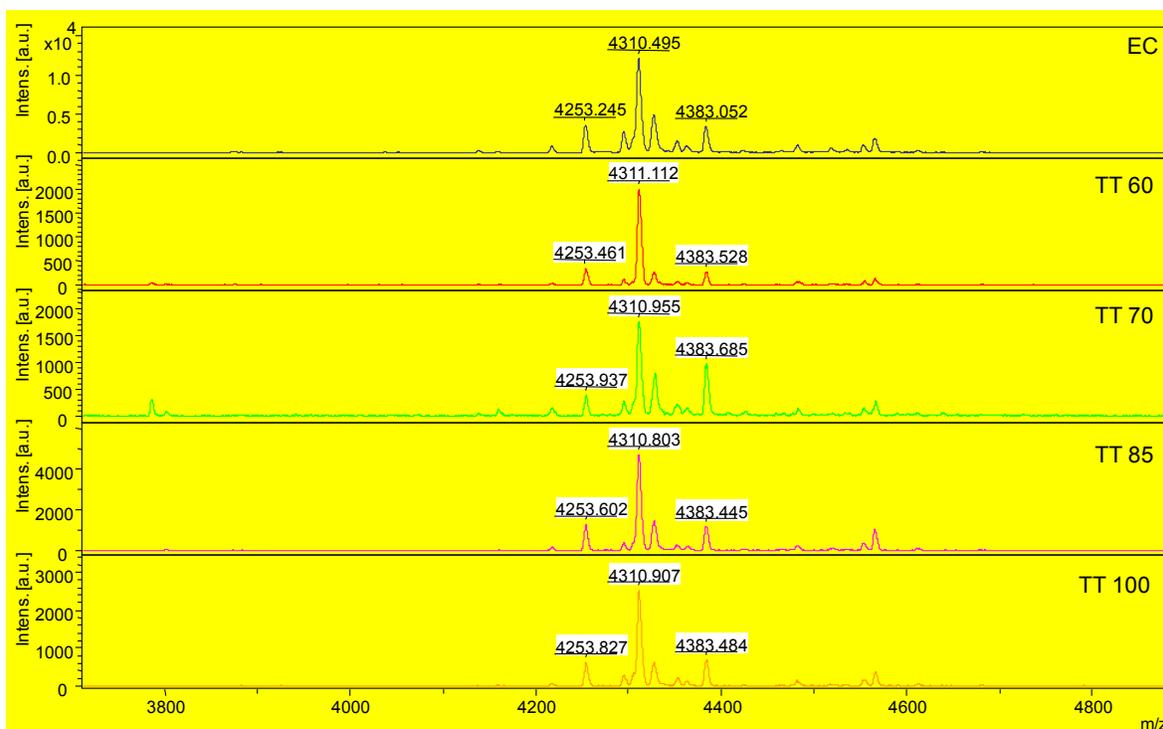


Figura 11: Espectros de masas de Extracto Crudo(EC), Tratamiento Térmico a 60°C (TT60), Tratamiento Térmico a 70°C (TT70), Tratamiento Térmico a 85°C(TT85) y Tratamiento Térmico a 100°C(TT100), en el rango de peso molecular que va desde 3800 hasta 4800 Da. aprox.

Como podemos apreciar en la figura 11, en este rango de peso molecular (3800-4800) no se observan prácticamente diferencias entre las proteínas que existen en el EC y en los Tratamiento Térmicos, por lo tanto, podemos decir que las moléculas de este rango de peso molecular, entre las cuales se encuentra el inhibidor de interés, son estables a los tratamientos con calor. Este dato es muy importante ya que nos proporciona una herramienta sencilla, como ser el tratamiento con calor, para la purificación de estas moléculas a partir de extractos complejos.

Por otro lado se decidió realizar un tratamiento térmico a 65°C ya que, en el SDS-page pudimos observar que la mayor disminución del contenido proteico se produce entre 60 y 70°C. El objetivo fue observar el comportamiento de los demás componentes proteicos en este punto de inflexión. Para ello las muestras tratadas fueron analizadas mediante espectrometría de masas y se obtuvo el siguiente resultado.

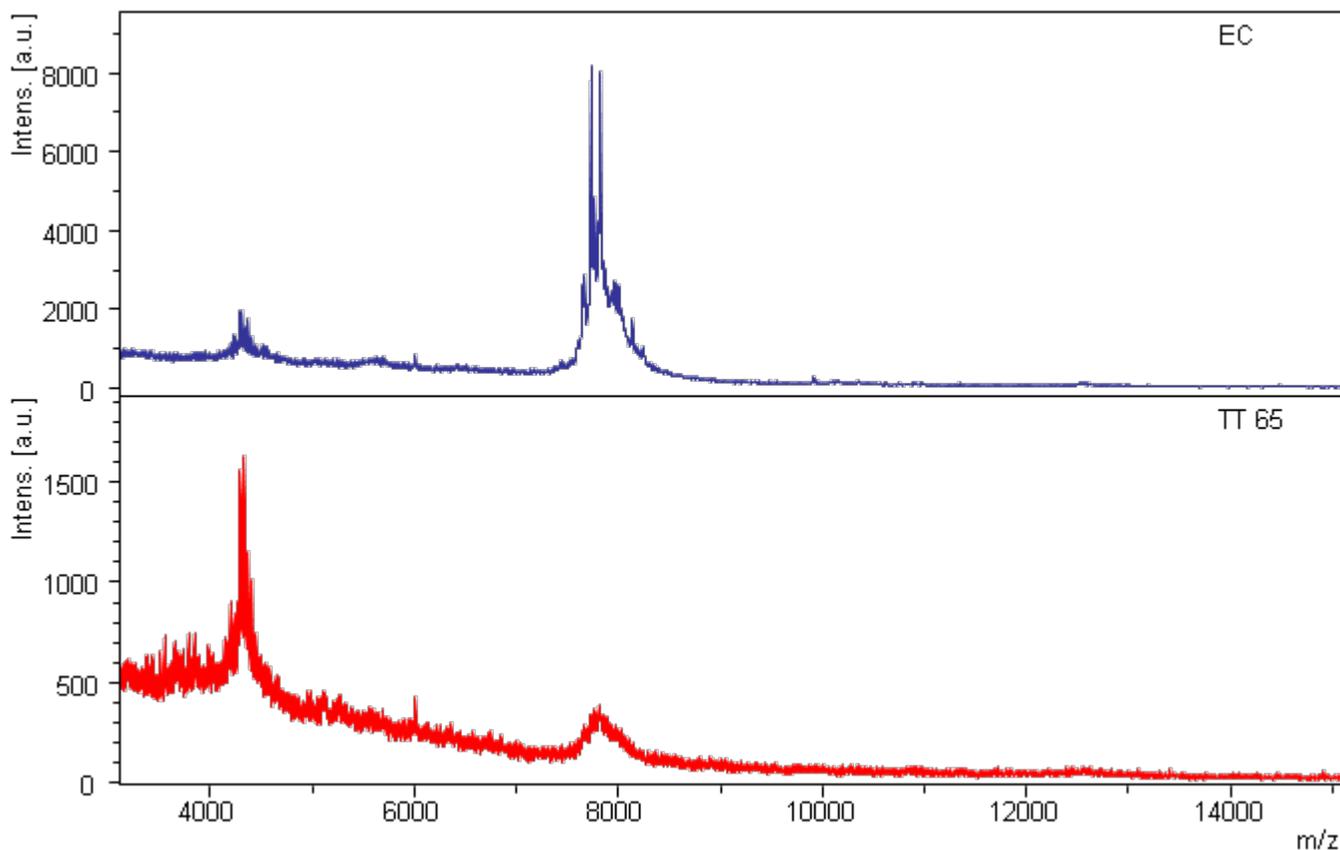


Figura 12: Espectros de masas del Extracto Crudo (EC) y Tratamiento Térmico a 65°C (TT65) en el rango de peso molecular de 4000 a 15000 Da.

La figura 12 muestra el espectro de masas del perfil de proteínas adquirido en un rango entre 4000 Da y 15000 Da.

Se puede observar que el tratamiento de 65°C del EC produjo una disminución de la población de las proteínas que pesan cerca de 8000 Da.

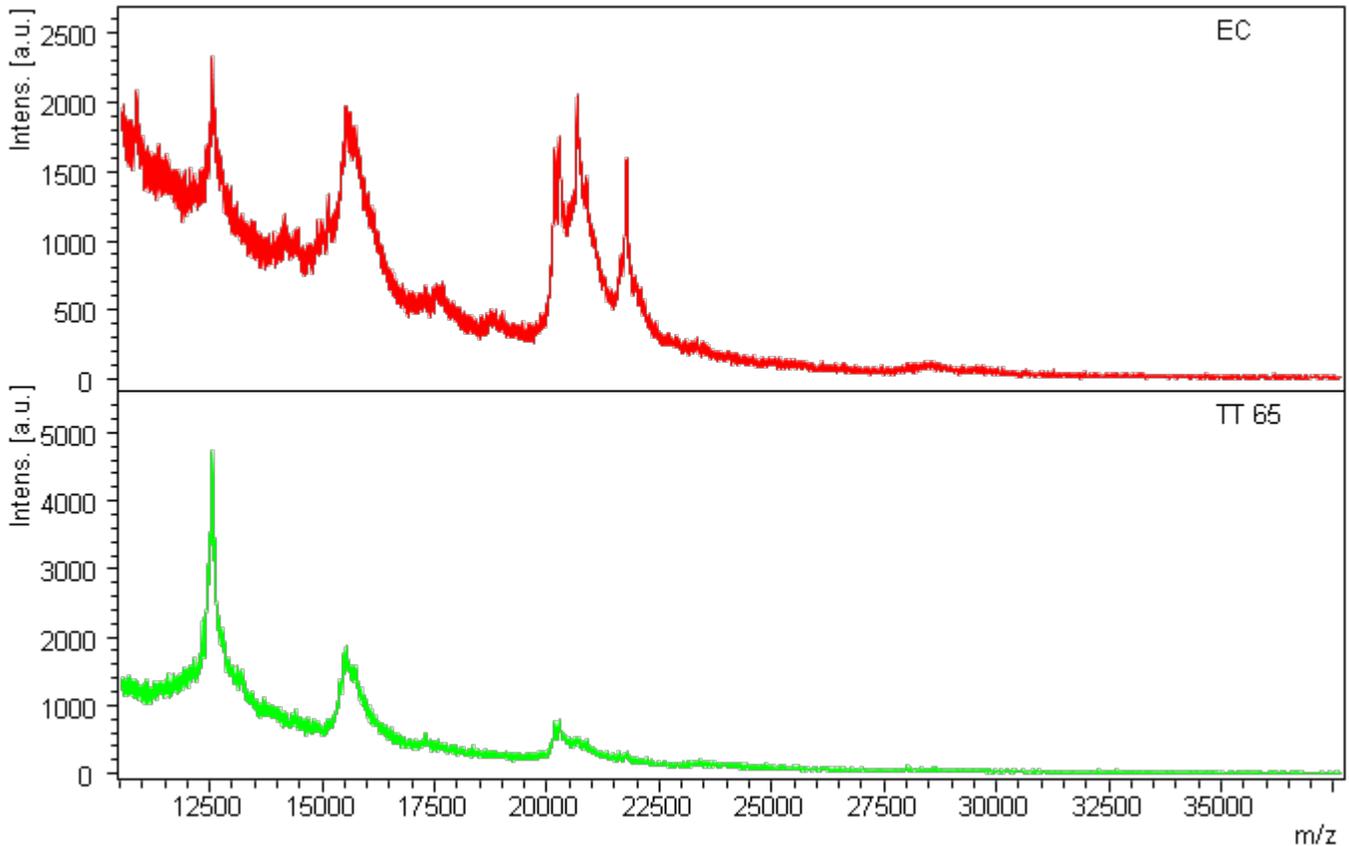


Figura 13: Espectros de masas del Extracto Crudo (EC) y Tratamiento Térmico a 65°C (TT65) en el rango de peso molecular de 12000 a 30000 Da.

El espectro de masas de la Figura 13 muestra el perfil proteico antes y después del tratamiento térmico a 65°C en el rango de peso molecular de 12000 a 35000 Da. Se puede observar una disminución notable de moléculas proteicas de alrededor de 20 kDa. y en menor medida de moléculas de aproximadamente 13 kDa.

La búsqueda de pesos moleculares se realizó en un rango entre 1000 Da y 35000 Da. Para ello se utilizaron tres métodos de adquisición de señales, los cuales se caracterizan por obtener mejores señales a distintos rangos de pesos moleculares. El primer método usado fue en el rango de 1000 a 5000 Da (Fig. 11) y es donde observamos el inhibidor de interés. El segundo rango utilizado fue desde 4000 hasta 15000 Da, donde se destacan picos de 4000 Da y 7500 Da

aproximadamente. El último rango usado abarcó desde los 10000 Da hasta los 35000 Da. en el cual se destacan picos de 12000, 15000 y 21000 Da aproximadamente. Se utilizó un cuarto método de adquisición de señales, que cubrió desde los 20000 Da hasta los 100000 Da., pero en este caso no fue posible encontrar señal en el espectro. Esto se debe a que las proteínas más grandes y pesadas son difíciles de ver en un MALDI-TOF/MS debido a su dificultad de ionizarse y posteriormente realizar su vuelo (“time of flight”) hacia el detector de señales, lo cual no implica que las proteínas no se encuentren en la muestra. Por este motivo la combinación de la electroforesis junto con la espectrometría de masas nos posibilita de una herramienta de control y seguimiento de composición de muestras proteicas, acoplando la buena señal y sensibilidad que nos da el espectrómetro de masas a bajos pesos moleculares junto a la que nos brinda el SDS PAGE con las proteínas de mayor tamaño molecular.

Como conclusión se puede decir que los tratamientos térmicos en general afectan a las proteínas de mayor tamaño pero no afectan a gran medida a las de menor tamaño molecular.

vii. *Diseño de matrices empleadas para el desarrollo de cromatografía de afinidad*

En esta etapa del trabajo, fue confeccionada la matriz por medio de la cual pudimos aislar las proteínas deseadas (inhibidores) del Extracto Crudo inicial.

Se inmovilizó la enzima CPA en el soporte glioxil agarosa, y luego se comprobó la estabilidad de la misma. Para verificar que la enzima inmovilizada mantiene su función correctamente, se realizó un seguimiento de actividad enzimática mediante espectrofotometría, similar al descrito en M&M para la enzima libre. En este caso, debió adicionarse al método, un agitador magnético para mantener la enzima inmovilizada en suspensión, de esta manera se facilita el acceso del sustrato a la enzima y la salida del producto para su lectura espectral.

Los resultados obtenidos indicaron que la enzima inmovilizada mantuvo la actividad inicial en un 95% respecto de la enzima libre. Por lo tanto, se puede decir que, la unión covalente entre la enzima y el soporte no afecta la cinética, y la difusión no es un factor limitante en la reacción.

Para determinar la estabilidad térmica de la proteína, el inmovilizado se incubó a 37, 45 y 55 °C durante una hora. Finalizado el período de incubación, se midió la actividad enzimática como se mencionó anteriormente. La enzima inmovilizada mantuvo en todos los casos la misma actividad residual, por lo que el inmovilizado no se ve afectado por los tratamientos térmicos.

Por último se verificó si el EC inhibe a la CPA inmovilizada. Para ello se puso en contacto el EC y el inmovilizado, y se determinó la actividad residual de la CPA inmovilizada tal como se describió anteriormente. A su vez se realizaron ensayos para verificar que el inhibidor actúe sobre la enzima inmovilizada. Para dichos ensayos se utilizó PCI recombinante, (expresado y purificado a partir de *E. Coli*) y se determinó la actividad enzimática residual. En ambos casos, tal cual lo suponíamos, la actividad de Carboxipeptidasa A cayó prácticamente en un 100% con respecto a la actividad inicial. Con estos resultados, podemos decir que la CPA inmovilizada en glioxil agarosa puede ser empleada para realizar ensayos de cromatografía y purificar inhibidores.

viii. Intensity-Fading MALDI-TOF-MS

Se confirmó la presencia de un inhibidor de Carboxipeptidasa A (Potato Carboxipeptidase Inhibitor, PCI) mediante la técnica proteómica de alta eficiencia denominada Intensity Fading-MALDI-TOF/MS. Los inhibidores aislados se analizaron en el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB), como ya fue expuesto anteriormente.

En esta técnica el extracto crudo fue sometido a una micro-cromatografía de afinidad (siembra, lavados, elución del no retenido, lavados intermedios, elución del inhibidor y lavados finales) utilizando CPA inmovilizada, y cada paso de la misma fue analizado por MALDI-TOF/MS.

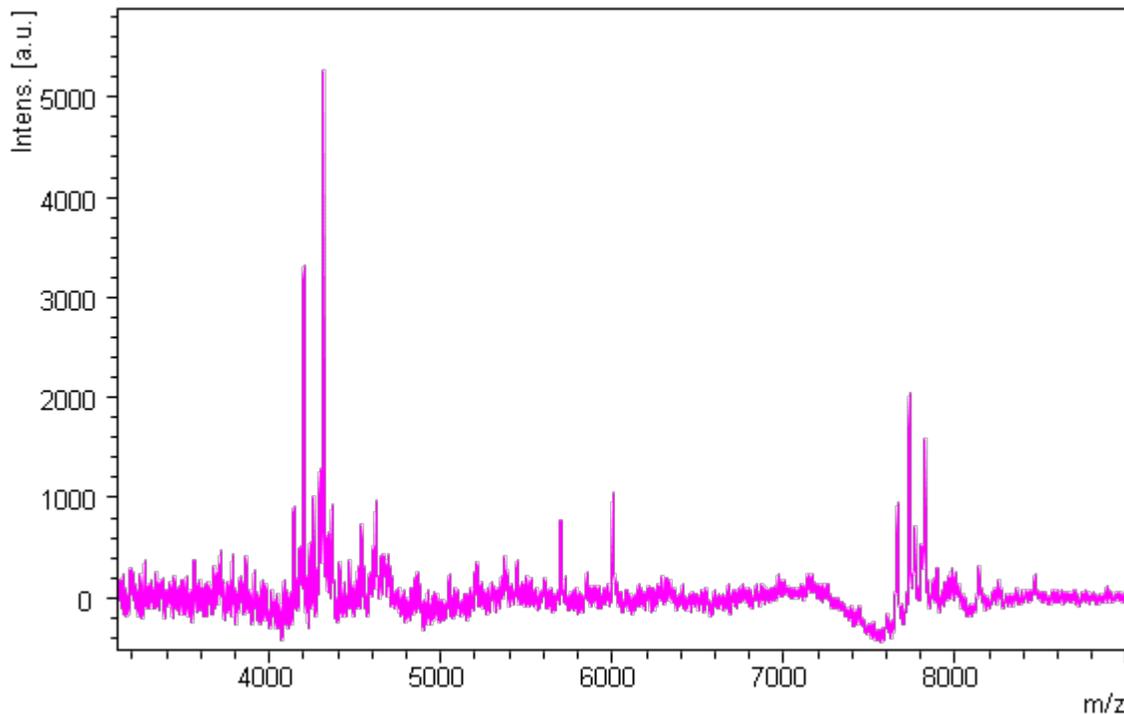


Figura 14: Espectro de Masas del Extracto crudo de Churqueña.

La figura 14 nos muestra el espectro de masas del extracto crudo sin tratamiento térmico (en el rango de 3000 a 9000 Da) el cual fue utilizado para sembrar en la microcolumna de afinidad. Puede observarse en el mismo el pico de alrededor de 4000 Da. correspondiente al inhibidor de CPA, y también pueden distinguirse otros constituyentes proteicos cerca de 6000 y 8000 Da. Como ya se mencionó anteriormente la muestra contiene proteínas de alrededor de 8000, 10000, 13500 y 21000 Da. las cuales en este caso no son observadas ya que deseamos realizar un seguimiento de las moléculas de interés de alrededor de 4000 Da.

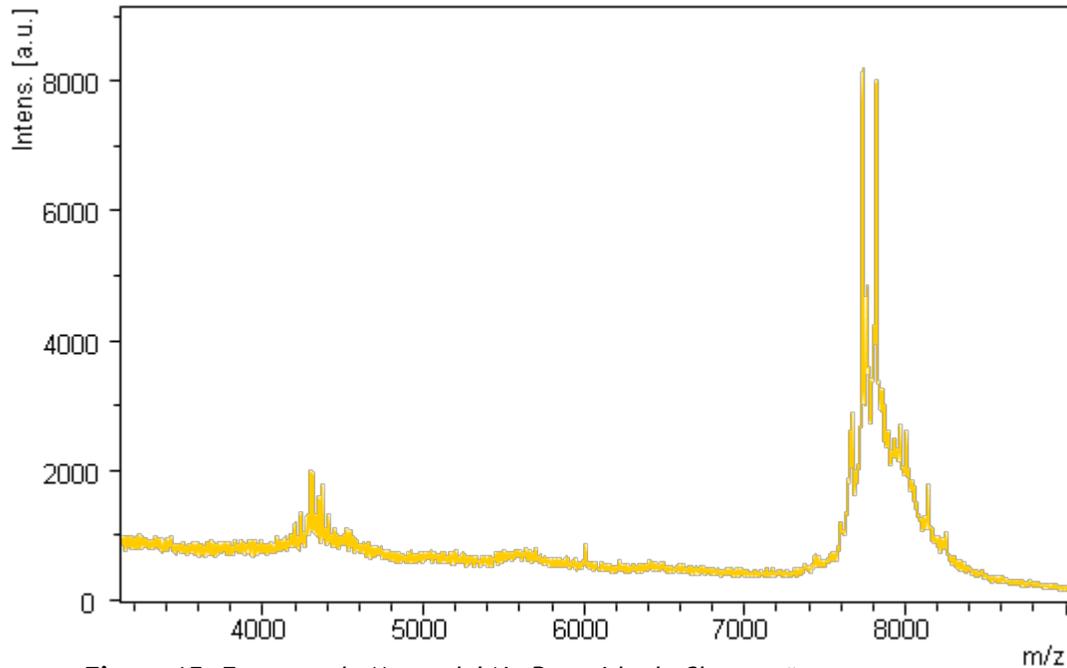


Figura 15: Espectro de Masas del No Retenido de Churqueña

La figura 15 nos muestra el espectro de masas obtenido luego de la siembra del extracto crudo. Los componentes proteicos observados son los correspondientes a los que eluyen en la fracción no retenida. Se ve una notable disminución del pico de moléculas de alrededor de 4000 KDa. el cual fue retenido en la columna de afinidad.

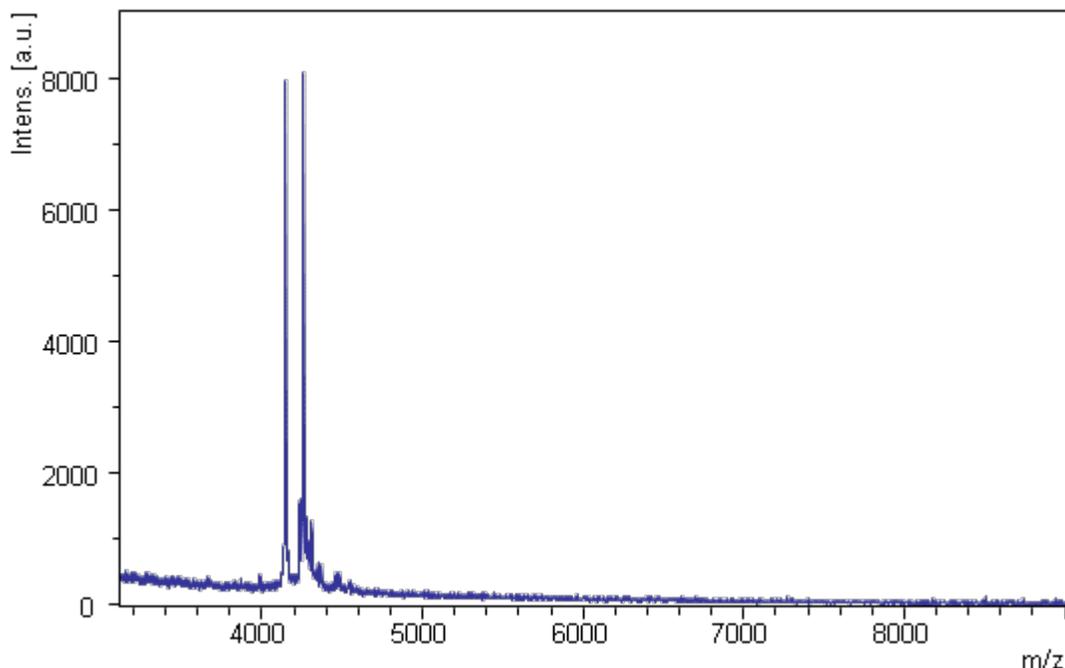


Figura 16: Espectro de masas de la fracción Retenida en la columna de afinidad.

En la figura 16 se observa el espectro de masas obtenido luego de la elución final de las moléculas retenidas en la cromatografía de afinidad. En la misma se ven claramente dos picos cercanos entre los 4000 y los 5000 Da. de peso molecular.

La elución del inhibidor retenido se realiza mediante un cambio de pH lo cual modifica la interacción CPA-inhibidor. El inhibidor detectado fue un inhibidor de CPA, ya que el mismo interactuó con la enzima inmovilizada y se verificó posteriormente su actividad inhibitoria luego de la elución. Observando más precisamente en el gráfico se pudieron ver que estos dos picos poseen una masa de alrededor de 4300 Da. El hecho de que aparezcan dos picos luego de la elución se puede deber a la presencia de isoinhibidores con pesos moleculares muy parecidos que generalmente no se detectan por electroforesis.

Una vez efectuado este ensayo a baja escala, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad a mayor escala. El objetivo del aumento de escala es incrementar la cantidad de inhibidor obtenido para continuar con los ensayos de caracterización.

ix. Purificación de inhibidores mediante Cromatografía de Afinidad

El extracto crudo y los tratamientos térmicos (TTs) de 70, 85 y 100°C fueron sometidos a cromatografía de afinidad. Se observó que los TTs permiten una mejora en la obtención de moléculas más puras cuando son sometidos a cromatografía de afinidad, esto es debido a que la muestra es menos compleja y hay menos posibilidad de interacciones inespecíficas con el soporte de glioxil-agarosa.

Como primer ensayo de pruebas se realizó una cromatografía de afinidad CPA-agarosa en Batch como control del proceso. Posteriormente el relleno de afinidad fue colocado en una columna para automatizar la purificación. En la figura 17 se observa uno de los cromatogramas obtenidos por el proceso de purificación, en este caso el de un extracto crudo proveniente de Churqueña, sin previo tratamiento térmico, para mostrar la relación entre la fracción no retenida (NR) y la fracción retenida.

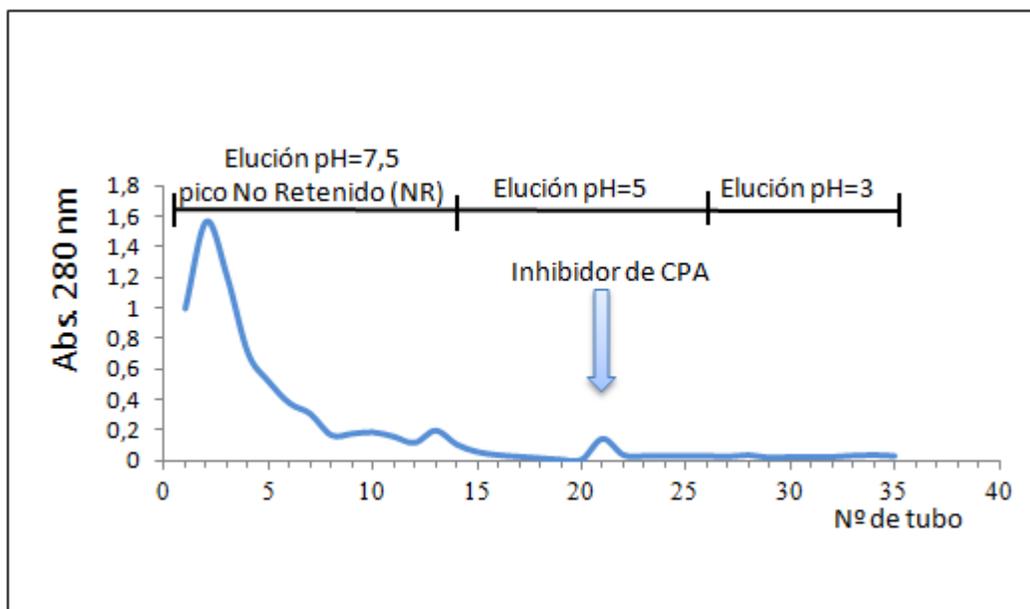


Figura 17: Cromatografía de afinidad de Churqueña en CPA-Agarosa

Se pudo observar que el pool del no retenido (NR: Tubos 1-14) no presenta actividad inhibitoria, mientras que hay un pico eluido a pH 5 (tubo 21 y 22) que muestra una fuerte inhibición, del 87% con respecto al control positivo.

x. **Determinación del Peso Molecular del pico obtenido en la afinidad, mediante espectrometría de masas MALDI TOF/MS.**

Por espectrometría de masas se verificó que en el eluyente obtenido a pH=5 existe una molécula inhibidora con una masa molecular de alrededor de 4309,8 Da.

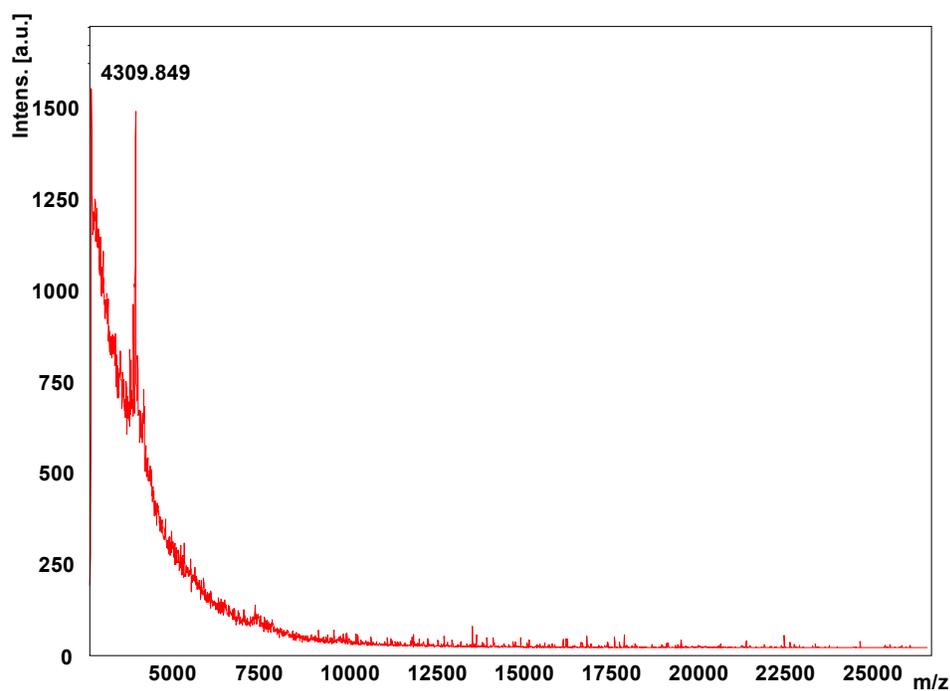


Figura 18: Espectro de masas de la fracción eluída a pH=5

xi. Peptide Mass Fingerprint

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE del eluido a pH 5, obteniéndose una banda de bajo peso molecular. Como puede observarse en la Figura 19 esta banda se encuentra muy por debajo de los 14,1 kDa., lo cual es coherente con el bajo peso molecular del inhibidor estudiado.

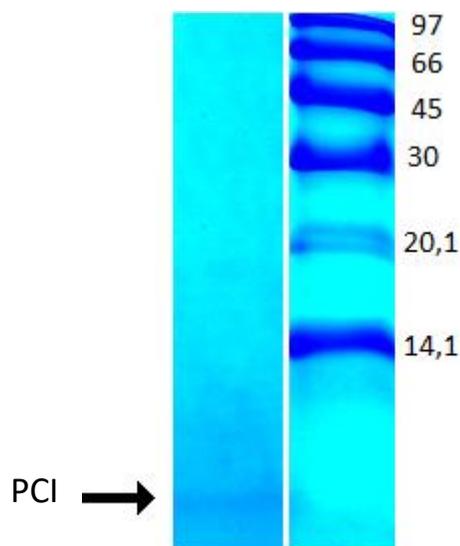


Figura 19: Electroforesis SDS-PAGE, la flecha señal la banda que se observó luego de la corrida. PCI (Potatoe Carboxipeptidase Inhibitor), a la derecha se observan los patrones de peso molecular en unidades de kDa.

Para realizar un estudio de identificación, la banda fue cortada y sometida a digestión triptica. Luego de la digestión se procedió a analizar los péptidos generados mediante espectrometría de masas y obtener la huella peptídica para compararla con la base de datos.

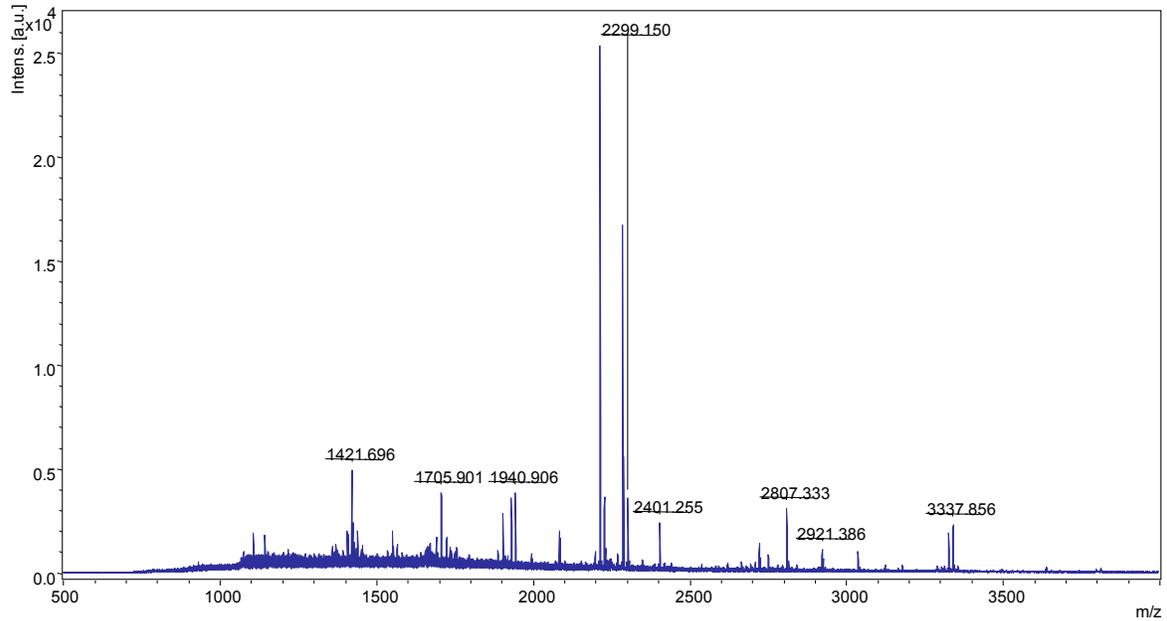


Figura 20: Espectro de masas obtenido luego de la digestión triptica.

El análisis de la huella peptídica utilizando la base de datos **Swiss prot, EMBL, non redundant** no pudo determinar la identidad del inhibidor encontrado, por lo cual se confirmaría que se trata de un inhibidor nuevo, no estudiado hasta el momento.

Conclusiones

Las conclusiones de éste trabajo pueden dividirse en dos partes:

La primera parte son los objetivos de entrenamiento propuestos antes de empezar este trabajo, los cuales se concretaron satisfactoriamente. Entre ellos podemos nombrar:

- *Aprender a realizar una búsqueda bibliográfica profunda sobre un tema específico de investigación,*
- *Manejo de los materiales y equipos utilizados en un laboratorio*
- *Integración y adaptación a un grupo de trabajo*
- *Formación de un criterio experimental que permita poner a punto distintos tipos de ensayos y modificarlos según la situación lo requiera*
- *Resolver los problemas que se presenten (ya sean teóricos o experimentales)*

Esta capacitación para interpretar los resultados que arrojaron cada una de las técnicas dentro de un esquema general de trabajo me permitió elegir el camino más adecuado ante todas las alternativas que se presentaban a medida que transcurría el estudio. Es por ello que, adicionalmente, más allá de los objetivos concretos de la tesina he sido entrenada en las siguientes técnicas:

- *Screening de inhibidores en distintas especies vegetales*
- *Obtención de homogenatos de extractos vegetales*
- *Utilización de diferentes técnicas electroforéticas*
- *Seguimiento de cinéticas enzimáticas mediante espectrofotometría*
- *Desarrollo de técnicas cromatográficas utilizando distintos equipamientos.*
- *Inmovilización de enzimas utilizando distintos soportes*

- *Inmovilización de inhibidores*
- *Extracción de RNA, reacciones de PCR*
- *Ensayos de actividad antimicrobiana*

La segunda parte de las conclusiones, son referidas al trabajo en sí y se describen a continuación:

El extracto crudo de Churqueña contiene moléculas que producen la inhibición de enzimas de distintos tipos mecanísticos tales como cisteín y serín proteasas y metaloproteasas.

Mediante los porcentajes de actividad de CPA se deduce que, en el caso del empleo de los tratamientos térmicos a 70, 85 y 100 °C de Churqueña, la actividad de la enzima es muy baja, lo cual demuestra la muy buena estabilidad térmica del inhibidor. Los espectros de masas permitieron observar el alto grado de purificación logrado luego de realizar los tratamientos térmicos.

La inmovilización de enzimas junto con el tratamiento térmico demostraron ser herramientas claves para la purificación y el aislamiento de los inhibidores con alto grado de pureza. La cromatografía de afinidad, aísla y conserva en un gran porcentaje la actividad inhibitoria sobre CPA con respecto al extracto crudo.

La espectrometría de masas es un método analítico con alto grado de precisión, lo cual permitió en este trabajo la identificación concreta de las moléculas presentes en las muestras. Mediante una primera aproximación, combinando una microafinidad con la técnica proteómica “Intensity Fading MALDI-TOF/MS” se pudo encontrar un inhibidor de CPA de 4309,8 Da. El mismo fue posteriormente purificado a mayor escala y se procedió a su caracterización bioquímica. La confirmación de estar frente a un nuevo inhibidor fue corroborada mediante el análisis de la Huella Peptídica y su búsqueda en base de datos.

Perspectivas a futuro

Las conclusiones anteriores abren las puertas para saber que puede continuarse con la investigación de estas moléculas.

En líneas generales resulta de sumo interés implementar y refinar estrategias de búsqueda masiva de moduladores/inhibidores de proteasas en extractos vegetales. Con este fin se pretende aislar y caracterizar nuevos inhibidores de proteasas que pueden ser analizados frente a proteasas blanco de patologías específicas para su posterior aplicabilidad en el área del desarrollo de nuevos fármacos, contribuyendo significativamente al conocimiento bioquímico y biológico de las especies estudiadas.

En particular en lo que respecta a este inhibidor, podría planearse la obtención en cantidad mediante clonación y expresión heteróloga en hongos o bacterias. También existen resultados preliminares de su actividad como agente antimicrobiano, lo cual podría continuar siendo investigado y ensayado en otros agentes patógenos. La inmovilización podría ser aplicada a inhibidores para usarlos como medio para la purificación de proteasas a las cuales modulan.

Uno de los retos de la nanobiotecnología es el desarrollo de terapias dirigidas específicamente a los tejidos y órganos enfermos sin dañar a las células sanas. Entre las biomoléculas utilizadas con este objetivo se encuentran también los inhibidores de proteasas, lo que abre un camino potencial a la obtención de sistemas de liberación sustentada y protección de este tipo de biomoléculas.