



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

“Estudio de inhibidores peptídicos de proteasas aislados de alimentos de origen vegetal: potenciales aplicaciones como agentes anticoagulantes, anti-infectivos naturales y capacidad protectora del Factor de Crecimiento Epidérmico”

Trabajo de Tesis Doctoral

***Tesista: Lic. Juliana Cotabarren
Director: Dr. Walter David Obregón
Co-directora: Dra. Julia Lorenzo
Año: 2019***

Marzo 2019 – La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe-CICPBA-UNLP) perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Walter David Obregón y la codirección de la Dra. Julia Lorenzo-Rivera. El mismo fue financiado a través de becas doctorales otorgadas por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Asimismo, la realización del trabajo de tesis doctoral contó con el respaldo y el apoyo de los siguientes proyectos:

- PICT-2016-4365 (2017-2019): “Estudio de inhibidores peptídicos de proteasas aislados de alimentos de origen vegetal: potenciales aplicaciones como agentes medicinales nutraceuticos, anti-infectivos naturales y conservantes naturales para la industria alimentaria”.
- PIP 2015-2017 GI (11220150100596CO) “Aplicación biotecnológica de fitoproteasas en agroindustria, la industria alimenticia y la industria farmacéutica”.
- Proyecto de Vinculación Tecnológica: Universidades Agregando Valor (UAV 2017). Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación. “Revalorización expeller chia”, código: VT38-UNLU9394.
- Proyecto Promocional de Investigación y/o Desarrollo (PPID) para jóvenes investigadores. UNLP. PPID/X014. “Proteasas e inhibidores de proteasas como fuentes de compuestos bioactivos para la industria agroalimentaria y farmacéutica. (2014-2016).
- Proyecto Promocional de Investigación y/o Desarrollo (PPID) para jóvenes investigadores. UNLP, PPID/X004. “Genómica y Proteómica vegetal aplicadas al desarrollo de nuevos fármacos”. (2012-2014).
- Proyecto Promocional de Investigación y/o Desarrollo (PPID) para jóvenes investigadores. UNLP. “Proteínas de origen vegetal moduladoras de la actividad proteolítica de potencial implicancia en biomedicina y en la industria alimentaria y farmacéutica”. (2017-2019).
- Proyecto Interinstitucional de Redes Internacionales, Redes VIII. “Red Internacional para el estudio de compuestos bioactivos con aplicación en la industria agroalimentaria y/o farmacéutica”- 2da parte (2016-2017). Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación. (RSPU 207/14).
- Proyecto Interinstitucional de Redes Internacionales, Redes VII: “Red Internacional para el estudio de compuestos bioactivos con aplicación en la industria agroalimentaria y/o farmacéutica” (2014-2015). Otorgado por la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación (RSPU 207/13).
- Programa de Subsidios para Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica 2013. Tema: “Péptidos bioactivos de interés alimenticio obtenidos de plantas nativas y por tecnologías enzimáticas con fitoproteasas autóctonas”. (2014-2017). (CICPBA) (Acta 1396/13).
- Diseño de nanopartículas conteniendo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) para el tratamiento de las úlceras del pie diabético (2014-2015). CICPBA.
- Diseño de nanopartículas conteniendo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) para el tratamiento de las úlceras del pie diabético. Tetraanual, 2014-2017. UNLP. X-706.
- Proyecto Bilateral MINCYT-CITMA 2013. Obtención de productos naturales de plantas para el control de patógenos con incidencia en la salud y la agricultura. Años: 2014-2017.
- Proyectos Misiones VII y Misiones Inversas VI: “Misión científico-académica argentina-cuba para el estudio de biomoléculas de origen vegetal con potencial utilidad en la industria alimentaria y farmacéutica” otorgado por la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación de la Nación. Año 2016.

A Marcos, Lourdes y Guadalupe

AGRADECIMIENTOS

A David, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo aun conociendo mis limitaciones. Por confiar en mis capacidades y darme plena libertad de trabajo. Por su paciencia y comprensión en mis días ausente. Por su apoyo incondicional, dedicación y consejos. Sin dudas, el mejor compañero para recorrer el camino de la investigación, docencia y extensión.

A la Dra. Julia Lorenzo y el Dr. Xavier Avilés, por su colaboración desinteresada y por poner a nuestra disposición las instalaciones del IBB-UAB de la Universitat Autònoma de Barcelona.

A Mónica, por su esfuerzo y dedicación en la revisión de esta Tesis Doctoral. Por su confianza para permitirme trabajar en nuevas líneas de investigación.

A Santiago, por abrir las puertas de su laboratorio y poner a nuestra disposición sus instalaciones. Por su asesoramiento en los ensayos de actividad antimicrobiana y anticoagulante.

Al Dr. Martín Lavecchia, por su colaboración en los ensayos de dinámica molecular.

A Dani, Seba y Mari, por ser los primeros en compartir el trabajo diario en el laboratorio. Por sus palabras de aliento y su ayuda siempre que lo necesité.

A mis compañeros de laboratorio, por los mates y charlas compartidas.

A mis familiares y amigos, por sus palabras de apoyo y ayuda en momentos difíciles.

A Lourdes y Guadalupe, mis princesas. Gracias por sus besos y abrazos, por todo su amor a pesar del tiempo dedicado al trabajo.

A Marcos, por su amor y apoyo incondicional. Por sus consejos y palabras de aliento. Por permitirme seguir mi sueño aún en tiempos difíciles. Sin él este camino no hubiese sido posible.

RESUMEN

Los Inhibidores de Proteasas (IPs) son moléculas que se utilizan para el control y la regulación de la actividad de las proteasas. Los IPs constituyen importantes herramientas de la naturaleza para el control de la actividad proteolítica de sus proteasas blanco, así como su bloqueo en casos de actividad exacerbada y descontrolada. Se presentan en múltiples formas, en numerosos tejidos de animales, plantas y microorganismos. Los IPs participan en la prevención de la proteólisis no deseada y, por tanto, están involucrados en la mayoría de los procesos fisiológicos normales, al igual que en los procesos patológicos, debido a su implicación en la regulación de la actividad proteolítica, la activación de coenzimas y la liberación de polipéptidos biológicamente activos.

El objetivo general de esta Tesis consiste en la búsqueda de nuevos inhibidores peptídicos de proteasas de origen vegetal, su aislamiento, purificación y caracterización cinética, proteómica, molecular y bioquímica, haciendo hincapié en la búsqueda de nuevas actividades biológicas tales como actividad antimicrobiana, antioxidante y anticoagulante, recientemente descubiertas para este tipo de moléculas. Adicionalmente se evaluó la actividad protectora de estos nuevos inhibidores frente al factor crecimiento epidérmico (EGF, de sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*), con la finalidad de generar una disminución en la degradación de dicha molécula provocada por las proteasas mayoritarias presentes en las úlceras de pie diabético.

En el Capítulo 1 se presenta una introducción general de los inhibidores peptídicos de proteasas, su naturaleza, abundancia y aplicaciones en el ámbito de la biotecnología y de la biomedicina. También se describe el objetivo general y los objetivos específicos de la Tesis.

El Capítulo 2 se divide en dos grandes partes que abarcan prácticamente la totalidad de la Tesis. En la primera parte del Capítulo 2 se presenta el aislamiento y caracterización de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A; proveniente de una variedad de papa andina (*Solanum*

tuberosum subsp. *andigenum* cv. Imilla morada), el primer inhibidor clonado en esta especie, el cual fue expresado de forma recombinante y ensayado frente al EGF, encontrando resultados interesantes de actividad protectora (resultados que se presentan en el Capítulo 4). En la segunda parte del Capítulo 2, se presenta un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A, proveniente de morrón amarillo (*Capsicum annuum* L.), purificado mediante cromatografía de afinidad y caracterizado bioquímicamente, encontrando también resultados promisorios para investigaciones futuras teniendo en cuenta que este inhibidor (YBPCI) presenta una marcada estabilidad a elevadas temperaturas, a pHs extremos y a altas fuerzas salinas, así como también notable estabilidad bioquímica frente a ensayos de simulación gástrica *in vitro* (Capítulo 2 – Parte 2).

En el Capítulo 3 se describe la purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de papaína proveniente de *Moringa oleifera*, observándose interesantes actividades biológicas con aplicaciones medicinales, principalmente actividad anticoagulante y actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.

En el Capítulo 4 se desarrolla el análisis bioinformático de la estructura del EGF, con el fin de diseñar una estrategia de mutagénesis sitio-dirigida que permita la producción de un EGF mutante con resistencia a la proteólisis. Este capítulo se encuentra en etapa de investigación, ya que al haber hallado actividad protectora con el inhibidor de carboxipeptidasa aislado de papas andinas en el Capítulo 2 – Parte 1 (rimaPCI), la investigación fue desviada a la búsqueda de nuevos inhibidores que presenten dicha actividad.

En el último capítulo, Capítulo 5, se presentan las conclusiones más relevantes obtenidas a lo largo de la Tesis. Se describen además, las líneas de investigación que se originan a partir de este trabajo de tesis doctoral y en las que deberían orientarse las investigaciones futuras de nuestro grupo.

INDICE GENERAL

Abreviaturas.....	13
Índice de tablas.....	17
Índice de figuras.....	19
Capítulo 1: <i>Introducción general y objetivos.....</i>	24
Capítulo 2: <i>Aislamiento, purificación y caracterización de dos nuevos inhibidores de carboxipeptidasa A aislados a partir de especies solanáceas.....</i>	59
Capítulo 2 – Parte 1: <i>Clonado, expresión y caracterización de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de tubérculos de Solanum tuberosum subsp. andigenum cv Imilla morada.....</i>	91
Capítulo 2 – Parte 2: <i>Purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de pimiento amarillo (Capsicum annuum L.).....</i>	143
Capítulo 3: <i>Purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de papaína aislado a partir de semillas de Moringa (Moringa oleifera L.).....</i>	179
Capítulo 4: <i>Utilización de inhibidores de proteasas en la protección del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Análisis bioinformático para la búsqueda in silico de sitios promisorios para la generación de un EGF mutante resistente a la proteólisis.....</i>	225
Capítulo 5: <i>Conclusiones generales y perspectivas.....</i>	253
Referencias.....	262

ABREVIATURAS

ACI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Ascaris suum*

AD: Agua destilada

ADNc: Ácido Desoxiribonucleico complementario

AGRP: Péptido de señalización Relacionado con el péptido Agouti

AMP: Péptidos antimicrobianos

APs: Peptidasas aspárticas

APTT: Tiempo de tromboplastina parcial activada

ARN: Ácido Ribonucleico

ASIP: Péptido de Señalización Agouti

BAPNA: N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida

BBI: Inhibidor de Tripsina de tipo Bowman-Birk

bCPA: Carboxipeptidasa A bovina

BIR: Repetición de Baculovirus IAP

BI-VI, Inhibidor Bromeláneo VI de Ananá

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BPTI: Inhibidor de Tripsina de Páncreas Bovino

C11PI: inhibidor de *Cajanus cajan*

CaTI: inhibidor de *Capsicum annuum* var. chilli pepper

CFPI: inhibidor de *Clitoria fairchildiana*

chuPCI: Inhibidor de carboxipeptidasa A de Churqueña

ciAP1: Inhibidor Celular de Proteína Apoptotica 1

CMTI I: Inhibidor de Tripsina de Curcubita máxima 1

CPs: Cisteín proteasas

CPAh: Carboxipeptidasa A Humana

CPB: Carboxipeptidasa B

CPN: Carboxipeptidasa N

CrmA: Citoquina de respuesta modificada A

DTT: Ditioneitol

DM: Diabetes mellitus

EC: Extracto crudo

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

FDA: Food and Drug Administration

GFs: Factores de crecimiento

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HITCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Garrapata *Haemaphysalis longicornis*

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)

HSTI: Inhibidor de *Hyptis suaveolens*

IA3: Inhibidor de Proteasas Aspárticas de levaduras

IAP: Inhibidor de Apoptosis

IAPs: Inhibidores de proteínas de la apoptosis

IL-1: Interleuquina-1

imaPCI: Inhibidor de carboxipeptidasa A Imilla morada

IPs: Inhibidores de Proteasas

IPPs: Inhibidores peptídicos de proteasas

IPTG: Isopropil-β-D-1-tioalactopiranósido

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

Ki: Constante cinética de inhibición

LCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela

LzaBBI: inhibidor de *Luetzelburgia auriculara*

m/z: Relación masa/carga

MALDI-TOF MS: (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) (Espectrometría de Masas Laser de Desorción/Ionización Asistida por Matriz- Analizador de Tiempo de Vuelo)

MAP quinasas: quinasas activadas por mitógenos

MBSP: Serín proteasas unidas a miofibrillas

MCPIs: Inhibidor de metalocarboxipeptidasas

MCPTI: Inhibidor de metalocarboxipeptidasa de tomate

MCPs: Metalocarboxipeptidasas

Medio LB: Medio Luria-Bertani

MM-GBSA: superficie de área de Born mediante mecánica molecular

MMPs: Metaloproteasas de Matriz

MoPI: Inhibidor de papaína de *Moringa oleifera*

MpBBI: inhibidor de *Maclura pomífera*

MS/MS: Espectrometría de Masas en Tándem

NC-IUBMB: (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

NvCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de *Nerita versicolor*

OMTKY3: Tercer dominio Ovomucoide Turco

PCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PDB: Protein Data Bank (Base de datos de proteínas)

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PDI: Inhibidor de Catepsina D de papa

PFLNA: L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida

PI-3: Inhibidor de Pepsina 3 de *Ascaris suum*

PI-9: Inhibidor de Proteasas 9

PIN1: inhibidor de Proteinasa I

PMF: Peptide Mass Fingerprinting (Huella Peptídica)

PNF: Paranitrofenol

PSA: Persulfato de Amonio

PT: Tiempo de protrombina

rhEGF: Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano

rimaPCI: Inhibidor de carboxipeptidasa A de Imilla morada recombinante

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMSD: Desviación cuadrática media

RsBBI1: inhibidor de *Rhynchosia sublobata*

rPCI: Inhibidor de carboxipeptidasa A de papa recombinante

RP-HPLC: HPLC de Fase Reversa

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa)

SBTI: Inhibidor de tripsina de soja
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis Desnaturalizante en Geles de Poliacrilamida)
SIDA: Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
smCI: Inhibidor de carboxipeptidasa de *Sabellastarte magnifica*
SMPI: Inhibidor Proteico de Metaloproteasas de Streptomyces
SNC: Sistema nervioso central
TAE: Tris-Acético-EDTA
TAFI: Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina
TAP: Péptido Anticoagulante de Garrapata
TCA: Ácido Tricloroacético
TCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Garrapata
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TFA: Acido trifluoroacético

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta
TIMP: Inhibidor de Metaloproteasas de Tejido
TNF- α : factor de necrosis tumoral- α
t-PA: Activador tisular de Plasminógeno
TRP: Receptor Catiónico de Potencial Transitorio
TRPV1: Receptor Catiónico de Potencial Transitorio V1
UPD: Úlceras de pie diabético
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
XIAP: Inhibidor X-adosado a IAP
YBPCI: Inhibidor de carboxipeptidasa A de pimienta amarillo
YBPTI: Inhibidor de tripsina de morrón amarillo

INDICE DE TABLAS

Capítulo 1

<i>Tabla 1.1</i> Clasificación de las proteasas de acuerdo con el NC-IUBMB.....	32
<i>Tabla 1.2</i> Características estructurales y mecánicas de inhibidores de proteasas peptídicos.....	35

Capítulo 2

Capítulo 2 – Parte 1

<i>Tabla 2.1.1</i> Primers diseñados a partir de dominios conservados del PCI_t	95
<i>Tabla 2.1.2</i> Secuencia del primer R_0R_1 <i>polidT</i>	97
<i>Tabla 2.1.3</i> Mezcla de reacción para el tratamiento con DNasal.....	98
<i>Tabla 2.1.4</i> Mezcla de reacción de la transcripción reversa.....	98
<i>Tabla 2.1.5</i> Mezcla de reacción de la PCR para clonado.....	99
<i>Tabla 2.1.6</i> Preparación de buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 50X.....	99
<i>Tabla 2.1.7</i> Preparación de buffer de muestra 10X.....	100
<i>Tabla 2.1.8</i> Preparación de geles de agarosa 1,5% para celdas grandes y chicas.....	100
<i>Tabla 2.1.9</i> Preparación de medio de cultivo 2YT.....	101
<i>Tabla 2.1.10</i> Preparación de medio de cultivo LB líquido.....	102
<i>Tabla 2.1.11</i> Preparación de medio de cultivo LB sólido.....	102
<i>Tabla 2.1.12</i> Preparación de solución de X-Gal 20 mg/ml.....	103
<i>Tabla 2.1.13</i> Preparación de solución de Ampicilina 100 mg/ml.....	103
<i>Tabla 2.1.14</i> Preparación de solución de IPTG 0,1 M.....	103
<i>Tabla 2.1.15</i> Mezcla de reacción de la ligación.....	105
<i>Tabla 2.1.16</i> Observaciones a realizar para la selección de clones.....	106
<i>Tabla 2.1.17</i> Mezcla de reacción para la digestión con NotI.....	108
<i>Tabla 2.1.18</i> Primers diseñados a partir de las regiones N- y C-terminal del nuevo PCI_t	109
<i>Tabla 2.1.19</i> Mezcla de reacción de PCR para expresión recombinante.....	110
<i>Tabla 2.1.20</i> Preparación de medio de cultivo BAT.....	111
<i>Tabla 2.1.21</i> Composición de sales para el medio BAT.....	112

Tabla 2.1.22 Composición de oligoelementos para el medio BAT.....	112
Tabla 2.1.23 Preparación de buffer de muestra 6X.....	116
Tabla 2.1.24 Preparación de buffer del gel.....	116
Tabla 2.1.25 Preparación de gel de apilamiento.....	117
Tabla 2.1.26 Preparación de gel de resolución.....	117
Tabla 2.1.27 Preparación de buffer anódico 2M.....	117
Tabla 2.1.28 Preparación de buffer catódico 1M.....	118
Tabla 2.1.29 Preparación de solución fijadora.....	118
Tabla 2.1.30 Preparación de solución colorante.....	118
Tabla 2.1.31 Preparación de solución decolorante.....	119
Tabla 2.1.32 Constantes cinéticas de inhibición (K_i) del rPCI y rimaPCI para bCPA, hCPA1, hCPA2 y pCPB.....	136

Capítulo 2 – Parte 2

Tabla 2.2.1 Mezcla de reacción para la cuantificación por el método de Bradford.....	147
Tabla 2.2.2 Mezcla de reacción para la medida de actividad de tripsina.....	148
Tabla 2.2.3 Mezcla de reacción para la medida de actividad de CPA.....	148
Tabla 2.2.4 Concentración de proteínas solubles luego de cada tratamiento térmico.....	160
Tabla 2.2.5 Purificación del inhibidor de CPA de morrón amarillo.....	170

Capítulo 3

Tabla 3.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMPs) de plantas.....	186
Tabla 3.2 Niveles alterados de CPs en patologías humanas.....	189
Tabla 3.3 Mezcla de reacción para la medida de actividad de papaína.....	203
Tabla 3.4 Concentración proteica luego de cada tratamiento térmico.....	210
Tabla 3.5 Purificación del inhibidor de papaína de <i>Moringa oleifera</i>	213
Tabla 3.6 Tiempos de coagulación para los ensayos de actividad anticoagulante.....	216

Capítulo 4

Tabla 4.1 Primers diseñados para el clonado de hEGF	239
Tabla 4.2 Energía de interacción con el receptor de EGF.....	248
Tabla 4.3 RMSD de los EGFs mutantes respecto al EGF salvaje.....	249

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Capítulo 2

Figura 2.1 Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor.....73

Figura 2.2 Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor, CPA4 humana-Latexina y CPA4 humana-SmCl.....74

Figura 2.3 Estructuras primaria y secundaria del inhibidor de carboxipeptidasa de *Solanum tuberosum* (PCI) estudiado (P01075 (MCPI_SOLTU) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot).....75

Figura 2.4 Modelo del PCI donde puede observarse la distribución de los puentes disulfuro en color cian y las cisteínas que lo componen, además de los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C).....76

Figura 2.5 Modelo de paisaje energético (energy landscape).....87

Figura 2.6 Formación de los X-isómeros producidos entre el desplegado y el replegado reversible de una proteína nativa (scrambling).....88

Capítulo 2 – Parte 1

Figura 2.1.1 Tubérculos de *S. tuberosum* subespecie *andigenum* variedad *Imilla morada*.....94

Figura 2.1.2 Secuencia del cDNA que codifica para el preproPCI_t.....96

Figura 2.1.3 Vector pGEM-T Easy (Promega).....105

Figura 2.1.4 Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT, mediante empleo de primers Fw1 y Rv1.....121

Figura 2.1.5 Esquema del inserto del cDNA de *Solanum tuberosum* especie *andigenum* variedad *Imilla morada*, purificado previamente a su incorporación en el vector pGEM-T Easy (Promega) e inserción del mismo en el vector para la obtención del plásmido.....122

Figura 2.1.6 Alineamiento de la secuencia consenso del cDNA del nuevo PCI con su correspondiente secuencia aminoacídica.....124

Figura 2.1.7 Alineamiento entre la secuencia nucleotídica del PCI_a y la secuencia del PCI_t	125
Figura 2.1.8 Alineamiento entre la secuencia aminoacídica del PCI_a y la secuencia del PCI_t	126
Figura 2.1.9 Construcción pIN -III-OmpA3_ PCI_t	128
Figura 2.1.10 Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de la construcción de clonado $imaPCI/pGEM$ -T, mediante empleo de primers Fw2 y Rv2.....	130
Figura 2.1.11 Esquema del inserto del cDNA de <i>Solanum tuberosum</i> subespecie <i>andigenum</i> variedad <i>Imilla morada</i> , previamente a su incorporación en el vector pIN -III-OmpA3.....	131
Figura 2.1.12 Expresión de la proteína recombinante $imaPCI$	132
Figura 2.1.13 HPLC del producto de expresión sometido a reshuffling.....	133
Figura 2.1.14 HPLC del producto de expresión sometido a intercambio iónico.....	134
Figura 2.1.15 HPLC del producto de expresión sometido a cromatografía en fase reversa a presión normal.....	134
Figura 2.1.16 Medida de actividad inhibitoria de CPA por absorbancia a 350 nm.....	135
Figura 2.1.17 Análisis MALDI-TOF MS del producto de expresión purificado.....	137
Figura 2.1.18 Espectro de masas obtenido luego de la digestión triptica del producto de expresión purificado.....	138
Figura 2.1.19 PMF MALDI-TOF/TOF del péptido fragmentado de m/z 1596.7 Da.....	139

Capítulo 2 – Parte 2

Figura 2.2.1 Fruto y planta de <i>C. annuum</i> L.....	145
Figura 2.2.2 Activación de la Agarosa 10 BCL con glicidol. Alargamiento de la cadena y generación de un grupo aldehído para reacción de Schiff.....	151
Figura 2.2.3 Unión de la enzima a glioxil agarosa y formación de base de Schiff.....	151
Figura 2.2.4 Reducción del enlace del enlace de la base de Schiff entre la enzima y la glioxil-agarosa.....	152

Figura 2.2.5 Actividad inhibitoria de tripsina del extracto crudo de morrón amarillo.....	158
Figura 2.2.6 Actividad inhibitoria de CPA del extracto crudo de morrón amarillo.....	159
Figura 2.2.7 Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad inhibitoria de tripsina.....	161
Figura 2.2.8 Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.....	161
Figura 2.2.9 SDS-PAGE para fracciones correspondientes a los diferentes tratamientos térmicos.....	164
Figura 2.2.10 Espectros de masas entre 3 y 12 kDa obtenidos para el extracto de morrón amarillo y los tratamientos térmicos.....	165
Figura 2.2.11 Cromatografía de afinidad a tripsina.....	166
Figura 2.2.12 Curva que corresponde a la actividad de tripsina con el agregado de distintas concentraciones de inhibidor.....	167
Figura 2.2.13 Espectrometría de masas MALDI-TOF realizada sobre la muestra de inhibidor de tripsina de morrón amarillo (YBPTI).....	168
Figura 2.2.14 Cromatografía de afinidad a carboxipeptidasa A.....	169
Figura 2.2.15 Relación dosis-respuesta para el inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo parcialmente purificado.....	171
Figura 2.2.16 Efecto del pH en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.....	172
Figura 2.2.17 Efecto de la adición de NaCl en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.....	173
Figura 2.2.18 Efecto de la simulación gástrica in vitro en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.....	174
Figura 2.2.19 Espectrometría de masas MALDI-TOF realizada sobre la muestra de inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo (YBPCI).....	175
Figura 2.2.20 Relación dosis-respuesta para el inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo.....	176

Capítulo 3

Figura 3.1 Esquema de la estructura característica de las cistatinas.....	192
--	-----

Figura 3.2 Modelos estructurales característicos de las fitocistatinas.....	194
--	-----

Figura 3.3 Vainas, semillas y árbol de <i>M. oleifera</i> L.....	201
Figura 3.4 Mecanismo de reducción de la resarzurina a resorufina.....	207
Figura 3.5 Actividad de papaína residual (%) en presencia de extracto crudo de <i>M. oleifera</i> (MoEC).....	208
Figura 3.6 Actividad residual de papaína (%) en presencia de los diferentes tratamientos térmicos de <i>M. oleifera</i>	211
Figura 3.7 Cromatografía de afinidad del inhibidor de <i>M. oleifera</i> obtenida por tratamiento térmico (MoTT100_15) en columna con relleno de papaína-agarosa..	213
Figura 3.8 SDS-PAGE del inhibidor de papaína de <i>M. oleifera</i> (MoPI).....	214
Figura 3.9 Curva dosis-respuesta del inhibidor de papaína de <i>M. oleifera</i>	215
Figura 3.10 Actividad antimicrobiana sobre <i>Escherichia coli</i> (Bacteria A).....	217
Figura 3.11 Actividad antimicrobiana sobre <i>Enterococcus faecalis</i> (Bacteria B).....	217
Figura 3.12 Actividad antimicrobiana sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Bacteria C).....	218
Figura 3.13 Actividad antimicrobiana sobre <i>Salmonella typhimurium</i> (Bacteria D) y <i>Citrobacter amalonaticus</i> (Bacteria F).....	218
Figura 3.14 Actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (Bacteria E).....	219
Figura 3.15 Actividad antimicrobiana sobre <i>Enterobacter cloacae</i> (Bacteria G) y <i>Proteus</i> (Bacteria I).....	219
Figura 3.16 Actividad antimicrobiana sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Bacteria H).....	220
Figura 3.17 Actividad antimicrobiana determinada por el método de resarzurina ensayada para <i>K. pneumoniae</i> (a), <i>E. cloacae</i> (b), <i>C. amalonaticus</i> (c), <i>S. aureus</i> (d), <i>S. typhimurium</i> (e), <i>E. faecalis</i> (f), <i>E. coli</i> (g).....	221
Capítulo 4	
Figura 4.1 Secuencia y estructura tridimensional del EGF.....	234
Figura 4.2 Construcción de clonado para la expresión de hEGF en <i>Pichia pastoris</i>	237
Figura 4.3 Estrategia de PCRs recursivas para la inserción del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF.....	238

Figura 4.4 Diseño de primers para la adición del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF.....	239
Figura 4.5 Secuencia de pIN-III-OmpA3_hEGF con las regiones de hibridación para los primers y sitios de restricción.....	244
Figura 4.6 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de las PCRs sucesivas para la inserción del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF.....	245
Figura 4.7 Esquema de los sitios de reconocimiento para el corte por proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético.....	246
Figura 4.8 Análisis proteómico de la proteólisis C-terminal del hEGF en presencia de rimaPCI.....	250

Capítulo 1:

Introducción general y objetivos

En el presente capítulo se presenta una introducción general de las proteasas, los inhibidores peptídicos de proteasas, su naturaleza, abundancia y aplicaciones en el ámbito de la biotecnología y biomedicina. También se describe el objetivo general y los objetivos específicos de la Tesis.

INDICE CAPITULO 1

1.1 Introducción.....	29
1.1.1 <i>Proteasas e inhibidores de proteasas.....</i>	29
1.1.2 <i>Proteasas.....</i>	30
1.1.2.1 <i>Clasificación de las proteasas.....</i>	30
1.1.2.2 <i>Rol de las proteasas en procesos biológicos.....</i>	33
1.1.3 <i>Inhibidores de proteasas.....</i>	34
1.1.3.1 <i>Clasificación de los inhibidores de proteasa.....</i>	35
1.1.3.1.1 <i>Inhibidores peptídicos de serín proteasas.....</i>	37
1.1.3.1.2 <i>Inhibidores peptídicos de cisteín proteasas.....</i>	38
1.1.3.1.3 <i>Inhibidores peptídicos de aspartil proteasas.....</i>	38
1.1.3.1.4 <i>Inhibidores peptídicos de metaloproteasas.....</i>	39
1.1.3.2 <i>Función general de los inhibidores de proteasas de plantas.....</i>	39
1.1.3.3 <i>Inhibidores de proteasas de plantas.....</i>	41
1.1.3.3.1 <i>Inhibidores de serín proteasas de plantas.....</i>	42
1.1.3.3.2 <i>Inhibidores de cisteín proteasas de plantas.....</i>	43
1.1.3.3.3 <i>Inhibidores de aspartil proteasas de plantas.....</i>	43
1.1.3.3.4 <i>Inhibidores de metaloproteasas de plantas.....</i>	44
1.1.3.4 <i>Estabilidad fisicoquímica de los inhibidores de proteasas de plantas.....</i>	44
1.1.3.5 <i>Uso de los inhibidores de proteasas en la industria, en la biotecnología y en biomedicina.....</i>	45
1.1.3.5.1 <i>Aplicación en Biomedicina y Farmacología.....</i>	46
1.1.3.5.1.1 <i>Actividad antimicrobiana.....</i>	47
1.1.3.5.1.2 <i>Actividad anticoagulante.....</i>	48
1.1.3.5.1.3 <i>Actividad anticancerígena.....</i>	48
1.1.3.5.1.4 <i>Aplicación de IPs como protectores de proteólisis de factores de crecimiento.....</i>	49
1.1.3.5.2 <i>Aplicación en Agricultura.....</i>	50
1.1.3.5.3 <i>Aplicación en la Industria Alimentaria.....</i>	52
1.1.3.6 <i>Inhibidores de proteasas, actualidad y perspectivas.....</i>	53

1.2 Objetivos.....56
 1.2.1 *Objetivo general*.....56
 1.2.2 *Objetivos específicos*.....56

1.1 INTRODUCCIÓN

La bioprospección es el estudio de la naturaleza dedicado al hallazgo de organismos y sustancias con posibles usos para beneficio del ser humano; que pueden tener un valor comercial significativo en sectores como el industrial, alimentario, cosmético y farmacéutico, entre otros. Se entiende entonces como la búsqueda sistemática, la clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que forman parte de la biodiversidad. En este sentido, el trabajo realizado en esta tesis doctoral forma parte de las ramas de las ciencias que fomentan la investigación, la identificación y el uso de metabolitos primarios y secundarios del Reino Vegetal para el desarrollo de productos de interés farmacéutico, alimentario y cosmético. Dentro de este contexto, la Fitoterapia se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. El impulso a la bioprospección, desde el punto de vista de la Fitoterapia, es el paso inicial que nos permitirá la búsqueda de nuevos principios activos a partir de diferentes especies vegetales, siendo esta búsqueda nuestro punto de partida, y su hallazgo, identificación y aplicación, nuestro destino final.

1.1.1 PROTEASAS E INHIBIDORES DE PROTEASAS

Las peptidasas, también denominadas enzimas proteolíticas o proteasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico en proteínas o péptidos. Se encuentran naturalmente en todos los organismos vivos y juegan un papel fundamental en casi todos los procesos biológicos. La apoptosis, coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que participan las proteasas escindiendo proteínas o pro-enzimas (Ivanov et al., 2006). Se ha demostrado que las proteasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Por tal motivo se ha despertado el interés por obtener o diseñar inhibidores que puedan actuar como agentes terapéuticos teniendo como "blanco" a las proteasas. Entre las principales

enfermedades en las que aparecen involucradas las enzimas proteolíticas pueden mencionarse el cáncer (Rakashanda et al., 2013), la epilepsia (Sapio et al., 2012), el SIDA (Virgil, 2010), el asma (Guay, Laviolette, & Tremblay, 2006), la malaria (Rosenthal, 2004) y el Alzheimer (Ricardo B. Maccioni, 2001). El proceso proteolítico está involucrado en la movilización de proteínas tisulares, en la regulación del metabolismo de proteínas intracelulares y en el procesamiento de neuropéptidos y funciones neurales. Los inhibidores de proteasas (IPs), en cambio, controlan a las proteasas y son esenciales para la regulación fisiológica. Tales inhibidores de proteasas son pseudosustratos con afinidad hacia el sitio catalítico de las enzimas (Otlewski & Jelen, 2005). El proceso de inhibición puede darse mediante dos mecanismos alternativos; mecanismo reversible o mecanismo irreversible. Los inhibidores con mecanismos irreversibles cambian la conformación de la enzima al unirse a la misma, cortan un enlace peptídico interno y se unen de manera covalente de manera tal que ni el inhibidor ni la enzima pueden participar en futuras reacciones. En reacciones reversibles, el inhibidor se une directamente al sitio activo de la proteasa u otro sitio de la misma disminuyendo su actividad; esta reacción es reversible y el inhibidor puede disociarse de la enzima tanto en estado virgen o luego de una modificación por la proteasa (Rawlings, Tolle & Barrett, 2004). La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuros, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Turk & Bode, 1991; Iwanaga, Yamasaki, Kimura, & Kouzuma, 2005; Rawlings, Barrett, & Finn, 2016).

1.1.2 PROTEASAS

1.1.2.1 Clasificación de las proteasas

Las enzimas se encuentran divididas en siete clases: (1) Oxido-reductasas, (2) Transferasas, (3) Hidrolasas, (4) Liasas, (5) Isomerasas, (6) Ligasas y (7) Translocasas. Dentro de las hidrolasas, las proteasas (también denominadas proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas) catalizan la degradación de proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos. Dependiendo de la localización del sitio de clivaje, las proteasas pueden ser clasificadas como

endoproteasas o exoproteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la secuencia de una proteína, mientras que las exoproteasas degradan las uniones peptídicas desde el extremo N-terminal o el C-terminal de una proteína, y son denominadas aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente. El mecanismo de clivaje es a través de ataque nucleofílico y subsecuente hidrólisis del intermediario tetraédrico (Rawlings et al., 2018).

Existen diferentes formas para ordenar y clasificar la información acerca de las peptidasas. Los más difundidos son el sistema de la *Enzyme Commission* (EC) y la Base de datos de peptidasas MEROPS, los cuales emplean diferentes criterios. El **sistema de clasificación EC** utiliza la nomenclatura recomendada por el *Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular* (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; NC-IUBMB*) con el asesoramiento de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry; IUPAC*). Una de las características más interesantes de este sistema es que para cada peptidasa existe un único código EC asignado, de manera que puede ser utilizado como referencia inequívoca para la enzima. Además de este código, también se indica el nombre recomendado, así como la lista de otros nombres posibles presentes en la literatura científica. Siguiendo las recomendaciones de la EC del NC-IUBMB el término peptidasa está reservado a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos (NC-IUBMB, 2006). Las peptidasas pertenecen a la clase de las hidrolasas EC 3 y dentro de esta clase, a la subclase EC 3.4 que contiene las enzimas que catalizan la hidrólisis de la unión peptídica.

Las proteasas se encuentran agrupadas de acuerdo al aminoácido o grupo involucrado en el sitio activo: serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu), o un átomo metálico en metaloproteasas. Ser, Cys y Thr actúan directamente como nucleófilos que atacan el carbonilo del grupo amida mientras que Asp, Glu y las metaloproteasas activan una molécula de agua que luego actúa como nucleófilo.

Entre las exopeptidasas existen aquellas que actúan sobre el extremo N-terminal y eliminan un solo aminoácido (aminopeptidasas), dipéptidos (dipeptidil-peptidasas) o tripéptidos (tripeptidil-peptidasas). Aquellas exopeptidasas que actúan en el C-terminal pueden liberar un solo aminoácido o un dipéptido, y se denominan

carboxipeptidasas o peptidil-dipeptidasas respectivamente. Otras exopeptidasas catalizan la hidrólisis en residuos con modificaciones post-traduccionales en el N- o C-terminal (por ejemplo, las omega peptidasas liberan residuos unidos mediante unión isopeptídica, es decir enlaces peptídicos distintos a aquellos que ocurren entre un grupo α -carboxilo y α -amino) (Rawlings et al., 2018).

La clasificación completa de las proteasas puede encontrarse en el siguiente enlace: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>. Las sub-familias de proteasas más relevantes se pueden observar en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Clasificación de las proteasas de acuerdo con el NC-IUBMB.

Número EC	Tipo de proteasa
3.4.11	Aminopeptidasas
3.4.13	Dipeptidasas
3.4.14	Dipeptidil-peptidasas
3.4.15	Peptidil-di peptidasas
3.4.16	Carboxipeptidasas tipo serino
3.4.17	Metalocarboxipeptidasas
3.4.18	Carboxipeptidasas tipo cisteino
3.4.19	Peptidasas Omega
3.4.21	Serin endopeptidasas
3.4.22	Cistein endopeptidasas
3.4.23	Endopeptidasas aspárticas
3.4.24	Metaloendopeptidasas
3.4.25	Treonin endopeptidasas
3.4.99	Endopeptidasas de tipo desconocido

Otro sistema de clasificación es el que utiliza la base de datos MEROPS, la cual fue propuesta por Rawlings y Barret como un método sistemático para clasificar proteasas, basado en características estructurales y de secuencia. La clasificación jerárquica se realiza en un principio agrupando proteasas de secuencias homólogas en especies, las especies se agrupan en familias y las familias en clanes. Existen hasta el momento 244 familias y 55 clanes (Rawlings et al., 2016).

A cada familia de proteasas, le corresponde una letra identificando el tipo de sitio catalítico de la proteasa (Aspártica (A), Cisteínica (C), Glutámica (G), Metalo (M), Asparagina (N), Mixtas (P), Serina (S), Treonina (T) y Desconocida (U)) más un número. Algunas familias se encuentran divididas en sub familias debido a que existe evidencia de una divergencia muy antigua dentro de la familia y se representan con la adición de una letra (ej. la familia M14 de metalocarboxipeptidasas está dividida en cuatro subfamilias M14A, M14B, M14C y M14D). La lista completa de las familias y clanes de proteasas puede ser encontrada en la base de datos MEROPS en internet <http://merops.sanger.ac.uk/>.

1.1.2.2 Rol de las proteasas en procesos biológicos

Las proteasas son moléculas esenciales que desempeñan una gran variedad de acciones biológicas en organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos, e incluso en virus (Rawlings, Barrett, & Bateman, 2014). Participan en procesos de tecnología alimentaria (Tavano, Berenguer-murcia, Secundo, & Fernandez-lafuente, 2018), en la regulación de la fibrinólisis/coagulación, remodelado de tejidos, apoptosis y proliferación celular, mecanismos de defensa, fertilización y en la progresión del ciclo celular (Craik, Page, & Madison, 2011). La totalidad de las proteasas que se encuentran en un organismo ha sido definida como Degradoma (Puente, Sánchez, Overall, & López-Otín, 2003; Quesada et al., 2009).

El control en la actividad de las proteasas puede realizarse mediante la regulación de la expresión o secreción de las peptidasas, la activación de propeptidasas y/o mediante la específica degradación de las enzimas maduras. Otro tipo de regulación ocurre a través del bloqueo de la actividad enzimática por parte de inhibidores específicos de proteasas. Esta forma adicional de control proteolítico se ha puesto en evidencia gracias a la acumulación de inhibidores en algunas células o tejidos de algunos organismos.

La actividad de las proteasas debe ser cuidadosamente controlada, ya que su desregulación podría alterar la homeostasis de los organismos. Enfermedad cardiovascular e inflamatoria, cáncer, osteoporosis, desórdenes neurológicos, así como también enfermedades infecciosas como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Ébola, Malaria y enfermedad del sueño son algunas de las patologías desencadenadas por una disfunción de proteasas (Heutinck, ten Berge,

Hack, Hamann, & Rowshani, 2010; Linden et al., 2015; Agbowuro, Huston, Gamble, & Tyndall, 2018).

1.1.3 INHIBIDORES DE PROTEASAS

En la naturaleza existen diversos compuestos de estructuras químicas diferentes que inhiben proteasas y que tienen potencial aplicación en la biomedicina, la agricultura y la industria alimentaria. Asimismo, el hombre ha generado inhibidores de proteasas por síntesis química, cuyo diseño ha mejorado la efectividad en la acción pero sin tener en cuenta el daño ecológico que los productos de origen sintético están generando en el medio ambiente. Con el advenimiento de la química verde y la preocupación ecológica en poner énfasis en la utilización de productos naturales, se empezó a estudiar y analizar la posibilidad de encontrar nuevos inhibidores naturales para su posible utilización terapéutica.

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido estudiados de la naturaleza son de origen proteico (Otlewski & Jelen, 2005). Sorprendentemente el número de inhibidores descritos en organismos vivos es muy bajo en comparación con el número de peptidasas conocidas hasta el momento.

Los inhibidores de proteasas de naturaleza proteica o inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) son polipéptidos que inhiben la acción de proteasas y se encuentran extensamente distribuidos en diferentes tejidos de animales, plantas y microorganismos (Laskowski M Jr, 1980). Muchos de ellos son pequeños péptidos que oscilan entre 15 a 60 aminoácidos, la mayoría de los cuales son hidrofóbicos y catiónicos, con un alto contenido de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro y confieren resistencia a tratamientos térmicos, pHs extremos, fuerza iónica y proteólisis (Torres-Castillo, Jacobo, & Blanco-Labra, 2009; Macedo et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro Júnior et al., 2017; Cotabarren, Tellechea, Avilés, Lorenzo Rivera, & Obregón, 2018; Martins et al., 2018).

1.1.3.1 Clasificación de los inhibidores de proteasa

Los inhibidores de proteasas pueden ser clasificados de diferentes formas, a saber:

- En base al sitio catalítico de las proteasas que inhiben: en este sentido, han sido identificados inhibidores frente a proteasas serínicas, cisteínicas, aspárticas o metaloproteasas (Tabla 1.2), pero no ha ocurrido lo mismo con inhibidores frente a treonín o glutámico proteasas (Fan & Wu, 2005).
- En base a sus secuencias y similitudes estructurales: En la base de datos MEROPS existe una clasificación de inhibidores de proteasas que se caracteriza por tener la misma agrupación de clanes y familias que tienen las proteasas. Un clan de inhibidores de peptidasas es un grupo de inhibidores de una o más familias que muestran evidencia de relación evolutiva por similitud en sus estructuras terciarias y contiene a todos los inhibidores conocidos hasta la fecha que han surgido a partir de un único origen evolutivo. Cada clan de inhibidores tiene un identificador de dos letras, en el que la primera letra es "I". Existen en la actualidad 99 familias de inhibidores (Rawlings et al., 2016).
- En base a su mecanismo de inhibición: Los inhibidores pueden interactuar con el sitio activo de las proteasas de diversas siguientes maneras, por ejemplo: a) como lo hace el sustrato, b) a través de un sitio externo, adyacente al sitio activo para cubrirlo de forma externa; c) a través de las formas anteriores al mismo tiempo, o d) interactuando en una zona de interdominio lejos del sitio activo de la proteasa previniendo su dimerización en caso de inhibidores alostéricos (Otlewski & Jelen, 2005).

Tabla 1.2: Características estructurales y mecánísticas de inhibidores de proteasas peptídicos. Tabla tomada de (Otlewski J. 2005).

Tipo de proteasa	Inhibidor	Ejemplos	Características de inhibición	Tamaño del inhibidor (kDa)
Serino	Inhibidores canónicos	BPTI, OMTKY3, eglin c, CMTI I	Se comportan como inhibidores fuertes y rápidos, de interacción no covalente que se asemeja al complejo Michaelis, bloqueo directo del sitio activo, no producen cambios conformacionales y suelen formar hojas β antiparalelas entre el inhibidor y la enzima.	3-21 por dominio
	Inhibidores no canónicos	Hirudin, TAP, ornitodorin	Interacción extremadamente fuerte, rápida y específica en dos etapas cinéticas. Inhibición a través de la interacción del N-terminal en el sitio activo.	6-8 por dominio
	Serpin	α -1-antitripsina, antitrombina	Complejo covalente e irreversible acil-enzima, mecanismo de trampa de ratón, grandes cambios conformacionales, inhibidor suicida y	45-55

			disrupción del sitio activo de la proteasa.		
Cisteínica	Cistatinas	Cistatina de pollo, cistatina C, stefin B, quinínógeno	Extremadamente fuertes pero no específicos, inhibición reversible y no covalente, interacción a través de la cuña formada por dos <i>hairpin loops</i> y a través del N-terminal. Cys25 accesible en el complejo e interacción importante a través de la posición P2.	11-13, hasta 60-120 (quinínógeno)	
	Tiropinas	p41, equistatina	Inhibición muy fuerte, mecanismo similar a las cistatinas pero a menudo más específico. Inusual inhibición de proteasas cisteínicas y aspárticas a través de diferentes dominios de equistatin.	7 por dominio	
	Inhibidores bromelicos	BI-VI	Inhibición moderadamente fuerte a bajo pH y no inhibición a pH neutro, semejanza estructural a ihibidores canónicos de tipo Bowman-Birk.	6-8	
	Stafostatinas	Stafostatin B	Inhibición moderadamente fuerte, mecanismo de inhibición similar a inhibidores canónicos, estructura diferente de cistatinas, inusual conformación de Gly en P1, orientación del inhibidor similar al sustrato, gran área de interacción, importancia de la posición P1'	11	
	IAP		XIAP, cIAP1	Inhibición altamente específica, cinética de unión fuerte y reversible, también inhibición a través de un interdominio flexible.	9 por dominio BIR
			CrmA, PI-9	Inhibición altamente específica, mecanismo de inactivación similar a las serpinas.	38
			P35	Inhibición no específica, acil-enzima irreversible, distorsión del sitio activo, el N-terminal de p35 esconde la Cys360 catalítica de moléculas de agua, considerables cambios conformacionales en el inhibidor.	35
Metallo		PCI, LCI	Fuerte complejo enzima-producto, inhibición a través del segmento C-terminal, importante rol de Val38 (P1), no se producen cambios conformacionales en el inhibidor.	4	
		SMPI	Inhibidor moderadamente específico, mecanismo de inhibición similar a inhibidores canónicos de serin-proteasas, inhibición temporal.	11	
		Inhibidor de <i>P. aeruginosa</i> , Inhibidor de <i>E. chrisantemi</i>	Han sido observadas fuertes y débiles inhibiciones, gran interacción de cinco residuos del N-terminal, el grupo amino del N-terminal forma una unión de coordinación con el Zn, en analogía con TIMPs	15	
		TIMP1-4	Interacción no covalente, fuerte pero no altamente específica, contacto a través del N-terminal en el sitio activo, coordinación catalítica del Zn a través del N-terminal, la mayor interacción es a través del residuo P1', cambios conformacionales moderados en el inhibidor durante la formación del complejo.	20-22	
	Aspártica		IA ₃	Inhibición fuerte y altamente específica, totalmente desplegado en estado libre, forma una larga hélice en el complejo no covalente.	8
		PI ₃	Inhibición fuerte pero no muy específica, una hoja <i>b</i> entre la enzima y el inhibidor, no se producen cambios conformacionales.	17	

BPTI: Inhibidor de Tripsina de Páncreas Bovino; OMTKY3: Tercer dominio Ovomucoide Turco; CMTI I: Inhibidor de Tripsina de *Curcubita máxima* 1; TAP: Péptido Anticoagulante de Garrapata; BI-VI, Inhibidor Bromeláneo VI de Ananá; IAP: Inhibidor de Apoptosis; XIAP: Inhibidor X-adosado a IAP; cIAP1: Inhibidor celular de Proteína Apoptótica 1; BIR: Repetición de Baculovirus IAP; CrmA: Citoquina de respuesta modificada A; PI-9: Inhibidor de Proteasas 9; PCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa; LCI: Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela; SMPI: Inhibidor Proteico de Metaloproteasas de *Streptomyces*; TIMP: Inhibidor de Metaloproteasas de Tejido; IA₃: Inhibidor de Proteasas Aspárticas de Levaduras; PI-3, Inhibidor de Pepsina 3 de *Ascaris suum*.

1.1.3.1.1 Inhibidores peptídicos de serín proteasas

Los inhibidores de serín proteasas ocupan la clase de mayor extensión de inhibidores, la cual se encuentra dividida en más de 20 familias. Entre ellos se encuentran los *inhibidores canónicos* pertenecientes a las familias Kazal (Kazal fue la primera persona que descubrió el inhibidor de tripsina secretado por el páncreas, de ahí su nombre), Kunitz, e hirudina, así como también los *no-canónicos* de la familia de las serpinas (del inglés *serine protease inhibitors*).

Los inhibidores tipo Kunitz y Bowman-Birk se encuentran dentro del grupo de inhibidores canónicos y se hallan con frecuencia en miembros de la familia *Leguminosae*. Estos inhibidores se distinguen sobre la base de su contenido en residuos de cisteína y por el número de sitios catalíticos. Los inhibidores tipo Kunitz son proteínas que usualmente presentan una masa molecular de 18-24 kDa, con una o dos cadenas polipeptídicas y 4 residuos de cisteína formando 2 puentes disulfuro, presentando un único sitio activo (Bendre, Ramasamy, & Suresh, 2018). Los inhibidores tipo Bowman-Birk son proteínas pequeñas (4-8 kDa aproximadamente) con 14 residuos de cisteína formando 7 puentes disulfuro intracatenarios y dos sitios activos (Qi, Song, & Chi, 2005). Los miembros de la familia de las serpinas se encuentran ampliamente distribuidos dentro y fuera de las células, y cumplen diversos roles incluyendo la regulación de la coagulación de la sangre, activación del complemento, fibrinólisis, inflamación e inhibición de la apoptosis (Silverman et al., 2001; Krowarsch, Cierpicki, Jelen, & Otlewski, 2003; Rau, Beaulieu, Huntington, & Church, 2007).

1.1.3.1.2 Inhibidores peptídicos de cisteín proteasas

Los inhibidores peptídicos de proteasas cisteínicas (o cistatinas) forman una superfamilia de proteínas subdividida inicialmente en tres familias: familia I (estefinas), familia II (cistatinas) y familia III (quininógenos) (V Turk & Bode, 1991). Las estefinas son proteínas pequeñas (11 kDa aproximadamente) que carecen de enlaces disulfuro; las cistatinas (de 13,4-14,4 kDa) contienen dos enlaces disulfuro en el extremo C-terminal del polipéptido y los quininógenos (de 60-120 kDa) compuestos de múltiples dominios cistatina y puentes disulfuro. Si bien las cistatinas de plantas (fitocistatinas) se encuentran relacionadas estructuralmente a las cistatinas de las familias I y II, fueron reconocidas como una familia independiente, constituyendo la familia IV de la superfamilia cistatina (T. N. Shamsi, Parveen, & Fatima, 2016).

El interés en el estudio de inhibidores de cisteín proteasas se ha incrementado por la aplicación de proteasas cisteínicas en muchos procesos fisiológicos importantes. Por ejemplo, las cistatinas pueden inhibir catepsinas lisosomales y la familia de inhibidores de proteínas de la apoptosis (IAPs) son inhibidores de caspasas que bloquean la fase de ejecución de la apoptosis (G Dubin, 2005).

1.1.3.1.3 Inhibidores peptídicos de aspartil proteasas

El mecanismo catalítico de las peptidasas aspárticas (APs) ha sido determinado a partir de estructuras cristalográficas de complejos enzima-sustrato en el estado de transición. El mecanismo de acción aceptado es una catálisis general ácido-base que implica la coordinación de una molécula de agua entre los dos residuos de Asp o Glu.

Uno de los residuos de Asp actúa como base general y tiene carga negativa mientras que el otro residuo de Asp actúa como ácido general y está protonado. La molécula de agua activada por el aspartato realiza el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del enlace escindible del sustrato generando el intermediario tetraédrico de la reacción. El intermediario es estabilizado mediante una extensa red de puentes de hidrógeno que conecta el residuo conservado de Ser con el Asp del

sitio activo y el grupo oxhidrilo del residuo Thr con el carboxilo del Asp o Glu, el cual protege a este carboxilo de la protonación en medio ácido. El reordenamiento de este intermediario conduce a la protonación de la amida escindible (Lee et al., 1998).

Entre los inhibidores de las proteasas aspárticas el mejor caracterizado es el inhibidor de catepsina D de papa (PDI), el cual presenta gran similitud con la familia del inhibidor de tripsina de soja (Mares, Meloun, Pavlik, Kostka, & Baudyg, 1989). Varios trabajos mostraron que PDI consiste de varias isoformas, las cuales han sido clonadas y secuenciadas (Lisón 2006).

1.1.3.1.4 Inhibidores peptídicos de metaloproteasas

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

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

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

1.1.3.2 Función general de los inhibidores de proteasas de plantas

Se cree que la función principal de los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) de plantas está asociada a los mecanismos de defensa y regulación de proteasas endógenas, pero también pueden funcionar como proteínas de almacenamiento (Mosolov, Grigoreva, & Valueva, 2001). Principalmente, los IPPs juegan un rol importante en la protección de tejidos vegetales de ataques de parásitos y

patógenos en virtud de una interacción antinutricional, basada en su capacidad inhibitoria de enzimas del tracto digestivo de insectos.

Algunos inhibidores son expresados constitutivamente en semillas y órganos de almacenamiento mientras otros son inducidos por heridas en las plantas. Muchos IPPs también se acumulan en las semillas en desarrollo (García-olmedo, Molina, Segura, & Moreno, 1995), de manera tal que puedan ser rápidamente liberados durante la germinación. Así, el rol de los IPPs puede estar asociado con la protección de semillas, las cuales carecen de un sistema de defensa activo, y durante la germinación temprana, cuando los tejidos son particularmente expuestos al potencial ataque de patógenos del suelo. Es, por lo tanto, posible que dichos IPPs actúen sinérgicamente con otras proteínas de defensa expresadas en plantas contribuyendo a restringir la invasión por patógenos (Satheesh & Murugan, 2011).

El posible papel de los IPPs en la protección de plantas fue informado a partir de 1947 cuando Mickel y Standish observaron que las larvas de ciertos insectos eran incapaces de desarrollarse normalmente en productos de soja (Haq, Atif, & Khan, 2004).

El rol defensivo de los IPPs se basa en su actividad inhibitoria de las enzimas digestivas de insectos y otras proteasas de patógenos involucradas en procesos vitales, resultando ya sea en una crítica disminución en la disponibilidad de aminoácidos esenciales (M. a. Jongsma & Bolter, 1997; J. Y. Kim et al., 2005), o interfiriendo importantes procesos bioquímicos o fisiológicos (Gutierrez-Campos, Torres-Acosta, Saucedo-Arias, & Gomez-Lim, 2000).

La primera evidencia convincente de que los IPPs son parte del arsenal de productos químicos defensivos naturales de plantas fue la demostración de que heridas producidas por escarabajos en hojas de tomate y papa inducían una rápida acumulación de inhibidor de proteinasa I (PIN1), no sólo en las hojas dañadas, sino también en hojas distales, no dañadas (Green & Ryan, 1972). En las últimas décadas se han desarrollado numerosas plantas transgénicas expresando IPs para evaluar sus capacidades defensivas, obteniendo resultados exitosos (Singh, Singh, Kumar, Mittal, & Singh, 2018).

1.1.3.3 Inhibidores de proteasas de plantas

Los inhibidores de proteasas (IPs) están extensamente distribuidos dentro del reino vegetal encontrándose en una variedad de grupos sistémicos. Elevados niveles de inhibidores de proteasas son a menudo encontrados en plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* (Brzin & Kidrič, 1996; J. Y. Kim et al., 2009) y otro gran porcentaje en las familias *Leguminosae* (*Fabaceae*) y *Graminaceae* (*Poaceae*). PLANT-PIs es una base de datos desarrollada para facilitar la recuperación de información sobre la distribución y las propiedades funcionales de los inhibidores de proteasa en plantas superiores. Actualmente, PLANT-PIs contiene información de 495 inhibidores (más varios iso-inhibidores) identificados en 129 plantas diferentes (De Leo et al., 2002).

Como decíamos, los IPs se encuentran generalmente en órganos de almacenamiento, como semillas y tubérculos, pero su incidencia en la parte aérea de las plantas, como consecuencia de varios estímulos, también ha sido ampliamente documentada (De Leo et al., 2002). Los IPs pueden acumularse constituyendo aproximadamente 1 a 10 % del total de proteínas en los tejidos de almacenamiento. Se encuentra un número creciente de IPs en tejidos que no son de almacenamiento, como hojas, flores y raíces (Brzin & Kidrič, 1996; Xu, Qi, Ouyang, Yeung, & Chye, 2001; Sin & Chye, 2004).

Los inhibidores de proteasas serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas son ubicuos, pero los inhibidores de proteasas aspárticas no han sido hasta ahora detectados en semillas, aun cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar (<http://www.ba.itb.cnr.it/PLANT-PIs/TabII.html>).

Los inhibidores de serín proteasas ocupan la clase de mayor extensión de inhibidores, la cual se encuentra dividida en más de 20 familias. El siguiente grupo más grande de inhibidores es el de las cisteín proteasas. Por el contrario, solo unos pocos inhibidores de aspártico y metaloproteasas han sido reportados hasta el momento.

1.1.3.3.1 Inhibidores de serín proteasas de plantas

Los IPPs de serín proteasa son universales en todo el reino vegetal y se han descrito en muchas especies de plantas (Haq et al., 2004; Fan & Wu, 2005), aunque la mayoría de los estudiados se han aislado de las familias *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae* y *Cucurbitaceae*. Se informaron ocho clases de inhibidores de serín proteasa de plantas sobre la base de sus secuencias de aminoácidos (Valueva & Mosolov, 2004). Entre ellos, el inhibidor de proteasa 1, el inhibidor de proteasa 2 y las familias de inhibidores de tripsina de soja (J. Y. Kim et al., 2009; Meulenbroek et al., 2012).

Los inhibidores de serín proteasa son los más estudiados hasta la fecha (Mello et al., 2002; Haq & Khan, 2003; Fan & Wu, 2005), y se clasifican en familias como Kunitz, Bowman-Birk, Potato I y II, la superfamilia de calabacines y cereales. Chiche et al., 2004 informaron por primera vez el inhibidor de la calabaza, una familia bien establecida de inhibidores de serina proteinasa canónicos altamente potentes aislados de *Cucurbitaceae*. Los inhibidores de la calabaza se encontraban entre las primeras proteínas descubiertas con el típico pliegue de “knottin” (Chiche, Postic, Charlotte, & Gelly, 2018) compartido por numerosos péptidos extraídos de plantas, animales y hongos.

1.1.3.3.2 Inhibidores de cisteín proteasas de plantas

Las cistatinas de plantas o fitocistatinas son la segunda clase de inhibidores más estudiados (Benchabane, Schlüter, Vorster, Goulet, & Michaud, 2010). Se encuentran agrupadas en 3 subfamilias; el Grupo I incluye miembros con un único dominio cistatina y masas moleculares de entre 12 y 16 kDa, el Grupo II se caracteriza por presentar masas moleculares alrededor de 23 kDa y dominios conservados en sus regiones N- y C-terminal que le confiere la capacidad de inhibir cistein proteasas de tipo C13 (Martinez et al., 2005), y por último el Grupo III compuesto por multicistatinas, las cuales contienen dos o más dominios cistatina (Walsh & Strickland, 1993).

Se han identificado y caracterizado fitocistatinas a partir de varias plantas, a saber, caupí (Fernandes et al., 1993), papa (Waldron, Wegrich, Merlo, & Walsh, 1993), repollo (C. O. Lim et al., 1996), ambrosía (Rogersa, Pollock, Klapperb, & Griffith, 1993), zanahoria (Ojima et al., 1997), papaya (Song, Taylor, Baker, & Bateman, 1995), manzana (S. N. Ryan, Laing, & McManus, 1998), aguacate (M. Kimura, Ikeda, Fukumoto, Yamasaki, & Yonekura, 1995), castaño (Connors, Laun, Maynard, & Powell, 2002) y lágrimas de Job (Yoza, Nakamura, Yaguchi, Haraguchi, & Ohtsubo, 2002).

Las cistatinas también se han aislado de semillas de una amplia gama de plantas de cultivo. Estas incluyen las semillas de girasol, arroz, trigo, maíz, soja y caña de azúcar (Connors et al., 2002; Yoza et al., 2002; Haq et al., 2004).

1.1.3.3.3 Inhibidores de aspartil proteasas de plantas

Los inhibidores de proteasas aspárticas son una clase relativamente menos estudiada, en parte debido a su rareza. Miembros de esta familia se han encontrado en flores de girasol, cebada y cardo (*Cynara cardunculus*) y en tubérculos de papa (Mares, Meloun, Pavlik, Kostka, & Baudyg, 1989; Kervinen et al., 1999; Park, Yamanaka, Mikkonen, Kusakabe, & Kobayashi, 2000; Cater et al., 2002; T. N. Shamsi et al., 2016). El inhibidor de la catepsina D, un inhibidor de aspartil proteasa descrito en los tubérculos de papa, comparte una considerable homología de secuencia de aminoácidos con el inhibidor de tripsina de soja. Es una proteína de 27 kDa e inhibe las serin proteasas tripsina y quimotripsina, además de la aspartil

proteasa catepsina D. Sin embargo, no inhibe la pepsina, la catepsina E y la renina, que son todas proteasas aspárticas (Mares, Meloun, Pavlik, Kostka, & Baudyg, 1989).

1.1.3.3.4 Inhibidores de metaloproteasas de plantas

Los inhibidores de la metaloproteasas en las plantas son, al igual que los inhibidores de aspartil proteasas, escasos. En la naturaleza existen hasta la fecha 13 inhibidores reportados de esta familia, 5 de los cuales provienen de plantas de la familia *Solanaceae* (3 de ellos aislados y caracterizados por nuestro grupo de trabajo) (Rees & Lipscomb, 1982; Normant, Martres, Schwartz, & Gros, 1995; Reverter et al., 2000; Alonso-Del-Rivero et al., 2009; Arolas et al., 2005; Pallares et al., 2005; Arolas, Vendrell, Aviles, & Fricker, 2007; Gong et al., 2007; Sanglas, Aviles, Huber, Gomis-Rüth, & Arolas, 2009; Covalada, Del Rivero, Chavez, Aviles, & Reverter, 2012; Lufrano, Cotabarren, García-Pardo, Fernandez-Alvarez, Tort, Tanco, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2015; Cotabarren, Tellechea, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2018; Cotabarren, Tellechea, Tanco, Lorenzo, García-Pardo, & Avilés, 2018).

Este grupo de inhibidores se encuentra representado por la familia del inhibidor de la metalocarboxipeptidasa en plantas de tomate (MCPTI) y papa (PCI) (Hass et al., 1975; Graham & Ryan, 1981), siendo el PCI el inhibidor caracterizado por excelencia.

1.1.3.4 Estabilidad fisicoquímica de los inhibidores de proteasas de plantas

En la naturaleza es escaso el número de moléculas que poseen extraordinarias estabilidades fisicoquímicas tales como resistencia a temperaturas extremas, valores extremos de pH y/o altas fuerzas salinas, entre otras. Entre estas moléculas las más estudiadas hasta el momento han sido las T-knot y los IPPs.

Se han realizado numerosos ensayos para evaluar la contribución de los puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas a la estabilidad de proteínas (K A Dill, 1990; Nosoh & Sekiguchi, 1990; W. A. Lim, Richards, & Fox, 1994; Vogt, Woell, & Argos, 1997). Dicha estabilidad se encuentra sustancialmente incrementada por la presencia de puentes disulfuro naturales (Betz, 1993; Darby & Creighton, 1995). Es por ello que la inserción de nuevos puentes

disulfuro en una proteína representa una estrategia interesante para mejorar su estabilidad. Sin embargo, los intentos por mejorar la estabilidad fisicoquímica de las proteínas mediante esta técnica no han sido satisfactorios, dando lugar en algunos casos a la desestabilización proteica (Betz, 1993; C. M. Johnson, Oliveberg, Clarke, & Fersht, 1997; Zavodszky et al., 2001). Dado que los IPPs son moléculas pequeñas con elevada carga de residuos de cisteína, es probable que muchos de ellos presenten gran número de puentes disulfuro, lo cual les otorgaría elevada estabilidad a temperaturas y pHs extremos. Estudios realizados en los últimos años han puesto en evidencia esta premisa, reportando IPPs de plantas con destacable estabilidad fisicoquímica (Torres-Castillo et al., 2009; Macedo et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro Júnior et al., 2017; Cotabarren, Tellechea, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2018; Martins et al., 2018).

Actualmente, la investigación sobre los inhibidores de proteasas está impulsada por sus potenciales aplicaciones en medicina, agricultura y biotecnología. En este contexto, la determinación de los parámetros fisicoquímicos que caracterizan la estabilidad estructural de los inhibidores es esencial para seleccionar inhibidores efectivos y estables en una gran variedad de condiciones ambientales. Además, el conocimiento de sus características estructurales es fundamental para comprender las interacciones entre inhibidores y enzimas y permitir nuevos enfoques en el uso de inhibidores sintéticos para el diseño de fármacos.

1.1.3.5 Uso de los inhibidores de proteasas en la industria, en la biotecnología y en biomedicina

Las semillas vegetales contienen nutrientes, como proteínas, aceites y sacáridos (Bewley, 1997) los cuales las convierten en alimentos predilectos para animales, insectos y microbios. En consecuencia, en el proceso de evolución, las semillas de plantas han desarrollado barreras físicas y compuestos antimicrobianos para protegerse de la destrucción por animales y patógenos (García-Olmedo, Molina, Alamillo, & Rodríguez-Palenzuela, 1998; Chen Z.Y. et. al., 1999). Durante la germinación, sólo los compuestos antimicrobianos son los responsables de la resistencia a las infecciones microbianas, porque las barreras físicas no están disponibles en ese punto. Entre varios compuestos, las proteínas antimicrobianas (PAMs), las cuales inhiben el crecimiento de bacterias y hongos patógenos, han sido

consideradas muy importantes en la defensa de las plantas (Garcia-Olmedo et al., 1998). Hasta ahora, un gran número de PAMs han sido caracterizadas. Estructuralmente pueden clasificarse en muchos tipos; las proteínas tipo taumatina (Grenier, Potvin, Trudel, & Asselin, 1999), quitinasas y β -1,3-glucanasas (Petruzzelli et al., 2013), tioninas (Epple, Apel, & Bohlmann, 1997), defensinas vegetales (Thomma, Cammue, & Thevissen, 2002; Wong & Ng, 2005), proteínas inactivadoras de ribosomas (Barbieri, Battelli, & Stirpe, 1993; Mishra et al., 2005), proteínas de transferencia de lípidos no específicos (nsLTPs) (Garcia-Olmedo et al., 1998; S. Y. Wang, Wu, Ng, Ye, & Rao, 2004), proteasas e Inhibidores Peptídicos de proteasas (IPPs) (Chen Z.Y. et. al., 1999; J. Y. Kim et al., 2005, 2009).

1.1.3.5.1 Aplicación en Biomedicina y Farmacología

Gracias a su utilización en industrias biotecnológicas y farmacéuticas (Ahn, Salzman, Braunagel, Koiwa, & Zhu-Salzman, 2004; Copeland, 2005; Imada, 2005), así como su potencial uso como herramientas valiosas para el estudio de los mecanismos de acción y las estructuras enzimáticas, los inhibidores de proteasas han recibido mucha atención por los investigadores científicos. Se ha informado el control de la proteólisis como una herramienta farmacológicamente eficiente, utilizando diferentes inhibidores de proteasa para tratar enfermedades infecciosas y sistémicas.

Los IPPs a su vez, han recibido un gran interés por su utilización para estudios de interacción proteína-proteína de gran importancia en farmacoterapéutica. La potencialidad y la eficacia terapéutica de los IPPs se han ejemplificado en el tratamiento de enfermedades inmunes, inflamatorias, respiratorias, SIDA, cardiovasculares y neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer) y han resultado ser útiles para el diseño de fármacos para prevenir la propagación de organismos que provocan enfermedades peligrosas, como el SIDA, el cáncer y la malaria (S. L. Johnson & Pellicchia, 2006). En este sentido, existen numerosas referencias bibliográficas sobre el efecto beneficioso que los IPPs vegetales podrían tener sobre dichas patologías. Se han informado actividades biológicas en IPPs de origen vegetal relacionadas con su acción antitumoral (Souza, Camargo, Demasi, & Santana, 2014) anticoagulante (Machado et al., 2013), y protectora de factores de crecimiento (Lufrano, Cotabarren, García-Pardo,

Fernandez-Alvarez, Tort, Tanco, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2015), entre otras. Si bien la actividad antioxidante es mayormente estudiada para péptidos producto de hidrolizados proteicos (Jiang & Xiong, 2016; Cotabarren, Rosso, Tellechea, García-Pardo, Lorenzo, Obregón, & Parisi, 2019), en el último tiempo han surgido estudios de IPPs con dicha actividad (A. Shamsi & Bano, 2017; T. N. Shamsi et al., 2018). Es notable la versatilidad descubierta en estas moléculas naturales, tal que podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades tan diversas como el cáncer (Dufour & Overall, 2013; Mehdad et al., 2016; Srikanth & Chen, 2016) y el Alzheimer (Fujioka, Dairyo, Yasunaga, & Emoto, 2012), enfermedades inmunológicas, inflamatorias (Dufour & Overall, 2013), cardiovasculares (Winckers, ten Cate, & Hackeng, 2013) y respiratorias (Ottaviani, Actis-goretta, Villordo, & Fraga, 2006), como el asma, e infecciones bacterianas, parasitarias, fúngicas y virales, como la malaria (Dash, Kulkarni, Dunn, & Rao, 2003), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Soares-Costa, Beltramini, Thiemann, & Henrique-Silva, 2002; Arribas et al., 2005; Binford et al., 2005; Oliveira et al., 2008), las hepatitis (Lamarre et al., 2003; Malcolm et al., 2006), entre otras (Ruseler-van Embden, van Lieshout, Smits, van Kessel, & Laman, 2004; A. G. Costa, Cusano, Silva, Cremers, & Bilezikian, 2011).

1.1.3.5.1.1 Actividad antimicrobiana

Durante la última década se ha vuelto a visitar la vieja idea del uso potencial de IPPs como nuevas sustancias terapéuticas debido a sus propiedades antimicrobianas (Zhao et al., 2014; Brito, Melo, Perdigão, & Alves, 2016; Habib, *et.al.*, 2016; Maria Lígia R. Macedo et al., 2016). Aunque el mecanismo antibacteriano de los IPPs no ha sido elucidado en detalle, hay trabajos que confirman la actividad antibacteriana *in vitro* de IPPs contra muchas bacterias patógenas. Se ha propuesto que las proteínas con acción antibacteriana forman un canal en la membrana celular y la célula muere como resultado del flujo de salida de contenido celular, siendo este mecanismo diferente al de los antibióticos (Satheesh & Murugan, 2011).

1.1.3.5.1.2 Actividad anticoagulante

Las proteasas, como la trombina, están involucradas en varios procesos como la cascada de coagulación de la sangre (Haq, Rabbani, Ahmad, & Atif, 2010). Las afecciones fisiopatológicas como el infarto de miocardio, el tromboembolismo venoso y el ictus implican una actividad inadecuada de la trombina (Milton T Stubbs, Huber, & Bode, 1995; Huntington & Baglin, 2003). Se ha verificado la acción de IPPs con actividad antitrombina y en la regulación la angiogénesis y de las calicreínas glandulares (Di Nisio, ten Wolde, Meijers, & Buller, 2005; Pathak, Wong, Dreveny, & Emsley, 2013), promoviendo a los IPPs como una clase novedosa de moléculas en el campo del descubrimiento de nuevos fármacos (Winckers et al., 2013).

1.3.5.1.3 Actividad anticancerígena

Durante la carcinogénesis y la angiogénesis, se expresan proteasas serínicas y metaloproteasas que, cuando son inhibidas por sus respectivos IPPs, pueden detener el crecimiento del tumor y la metástasis (Rudek, Venitz, & Figg, 2002). Algunas investigaciones han mostrado que el uso de semillas que contienen IPPs reduce la aparición de cánceres orales, de mama, de próstata, de colon y faríngeos (Aoki et al., 1995; Jedinak & Maliar, 2005; Meyskens & Szabo, 2005). Se han realizado varios estudios que demuestran que los IPPs derivados de soja pueden prevenir la carcinogénesis *in vivo* y la transformación maligna *in vitro* (A. R. Kennedy, 1993; A. R. Kennedy, Szuhaj, Newberne, & Billings, 1993). Se ha observado que una mayor ingesta de IPPs en la dieta protege contra algunos tumores y cánceres inducidos químicamente (Mokhtar et al., 1988; Steinmetz & Potter, 1993; Kobayashi, Suzuki, Kanayama, & Terao, 2004). Estudios *in vitro* sobre los IPPs han demostrado promover el crecimiento de células normales y la reparación de tejidos.

Además, IPPs serínicos han estimulado la proliferación de fibroblastos y la síntesis de pro-colágeno mediante la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) (Dabbagh et al., 2001). En las líneas celulares tumorales, IPPs serínicos inactivan el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en fibroblastos de pulmón humano (Kikuchi et al., 2000). Una pérdida en la expresión de IPPs serínicos está relacionada con la progresión tumoral en los carcinomas

ductales de la mama, lo que demuestra la eficacia de algunos IPPs en el tratamiento del cáncer (Kikuchi et al., 2000; Maass et al., 2001).

En muchos tumores de origen epitelial (carcinomas), se ha encontrado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está sobreexpresado, por lo que la interrupción de la activación del EGFR parece ser un excelente objetivo para el tratamiento del cáncer (Aaronson, 1991; Levitzki, 1996; Wels et al., 1995). La activación de EGFR se puede interrumpir de varias maneras, incluidos los antagonistas del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Groenen, Nice, & Burgess, 1994), los inhibidores de tirosina quinasa (Levitzki, 1996) y los anticuerpos dirigidos contra el EGFR (Baselga & Mendelsohn, 1994).

Blanco-Aparicio et al., 1998 demostraron que el inhibidor de metalocarboxipeptidasa de papa (PCI) es un análogo antagónico del EGF humano ya que el PCI se une a EGFR e inhibe su activación por EGF. Las similitudes estructurales del PCI con este y otros factores de crecimiento probablemente explican sus propiedades como antagonistas de EGF. Además, se encontró también que el PCI inhibió el crecimiento de líneas celulares pancreáticas humanas y tumores transplantados en ratones desnudos. Esos resultados indican que dichas propiedades antitumorales son probablemente el resultado de la actividad antagonista de EGF del PCI.

1.1.3.5.1.4 Aplicación de IPs como protectores de proteólisis de factores de crecimiento

Una potencial aplicación de los inhibidores de proteasas es la de proteger a otras proteínas frente a la proteólisis producida en un entorno donde la acción de las proteasas se encuentre exacerbada. Un ejemplo de esta situación se da en las úlceras de pie diabético (UPD), donde se ha demostrado la sobreexpresión de enzimas degradativas tales como catepsina G, activadores de plasminógeno, elastasa y múltiples metaloproteasas de matriz (MMPs) (Stacey, Burnand, Mahmoud-Alexandroni, Gaffney, & Bhogal, 1993; Staiano-Coico, & Grinnell, 1993; Grinnell & Zhu, 1996; Vaalamo et al., 1996; Wysocki, Yager & Nwomeh, 1999). Colectivamente, las MMPs tienen la capacidad de degradar prácticamente todos los componentes de la matriz extracelular, incluyendo el peptidoglicano. Asimismo, la presencia de niveles elevados de proteasas limita la biodisponibilidad de factores de

crecimiento responsables del proceso de cicatrización (Burrow et al., 2007). En este sentido, la aplicación de inhibidores específicos de metaloproteasas representaría un potencial blanco terapéutico para contrarrestar el efecto de dichas enzimas frente a los factores de crecimiento. Lufrano, Cotabarren, García-Pardo, Fernandez-Alvarez, Tort, Tanco, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2015 reportaron la actividad protectora del inhibidor de carboxipeptidasa A de *Imilla morada* (imaPCI) (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* var. *andigenum*) frente al factor de crecimiento epidérmico (EGF), demostrando por primera vez la potencial aplicación de IPPs como agentes protectores de factores de crecimiento.

1.1.3.5.2 Aplicación en Agricultura

No solo resulta de interés en la biotecnología la utilización de nuevas moléculas que contrarresten a las diversas enfermedades de mamíferos, sino que también resulta desafiante el hallazgo de nuevas armas biotecnológicas que sirvan para la prevención de ataques y erradicación de microorganismos e insectos infecciosos de las plantas, sobre todo en cultivos de interés biotecnológico, agropecuario y/o cultural.

La necesidad de la sustitución de los pesticidas tradicionales con agentes alternativos para el manejo de patógenos agrícolas está aumentando en todo el mundo. El uso inadecuado de pesticidas químicos en resonancia con la resistencia adquirida por diversos organismos invasores, han promovido el interés de la ciencia en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de dichas enfermedades. Es así como los agentes de control biológico biodegradables y/ productos naturales son las alternativas más promisorias, ya que se encuentran libres de residuos contaminantes y tienen una incidencia reducida para el desarrollo de resistencia (Pandhare, Zog, & Deshpande, 2002). La identificación y caracterización de moléculas de defensa naturales es el primer paso hacia la creación de mejores métodos para el control de plagas basado en moléculas de origen natural. Es por eso que en los últimos años, la investigación y aplicación de compuestos de fuentes vegetales con potencial insecticida han ganado prominencia.

Entre las múltiples alternativas, los inhibidores de proteasa representan una clase atractiva de posibles bioplaguicidas con varias características importantes que incluyen desde efectos ecológicos hasta un amplio espectro de acción sobre

numerosas plagas y patógenos de las plantas. En este sentido, fue aislado un IPP de kiwi que inhibió el crecimiento de bacterias fitopatógenas tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia* y *Erwinia carotovora* (Popovic, Andjelkovic, Grozdanovic, Aleksic, & Gavrovic-Jankulovic, 2013). Se ha observado también que varios IPPs vegetales (parientes silvestres y no hospedantes) son más efectivos que los IPPs de las plantas hospedadoras en el manejo de las plagas de insectos, ya que las enzimas digestivas presentes en sus órganos no se han adaptado a tales IPPs (M. A. Jongsma, Stiekema, & Bosch, 1996; Harsulkar et al., 1999). Por este motivo, una de las estrategias para el uso de IPPs, es la generación de plantas transgénicas que expresan IPPs de las plantas (huésped o no huésped) para contrarrestar las plagas de insectos (R. Johnson, Narvaez, An, & Ryan, 1989; Duan et al., 1996; Maria L R Macedo, de Oliveira, Costa, Castelhana, & Silva-Filho, 2015).

Varios inhibidores tipo Kunitz purificados a partir de semillas de leguminosas tienen actividad insecticida. Su modo de acción implica la reducción de los procesos hidrolíticos de las proteínas de la dieta en el intestino del insecto, lo que disminuye la disponibilidad de aminoácidos, particularmente aquellos esenciales para el desarrollo larvario (Oliva et al., 2011; Swathi et al., 2014a; A. P. Kaur & Sohal, 2016). De hecho, ensayos *in vitro* demuestran que el Inhibidor de Tripsina de Soja (SBTI) inhibe la actividad hidrolítica de proteasas de intestino medio en *Aedes aegypti* (Silva et al., 2015).

Finalmente, es importante resaltar el papel que ocupan las enfermedades fúngicas dentro del conjunto de afecciones que producen daños en las plantaciones, debido fundamentalmente a su diversidad y a lo difícil que resulta su control (Goodwin, 1997). A nivel mundial las enfermedades causadas por hongos han ido en aumento y la terapéutica se ha visto limitada por varios factores: por un lado, la falta de entera efectividad de los fármacos así como de los efectos adversos que producen y por otro, la resistencia que presentan. Por tal motivo, entre los blancos terapéuticos más importantes está la búsqueda de nuevas alternativas antifúngicas a partir de componentes naturales que puedan ejercer el biocontrol de las plagas (Mendieta, Pagano, Muñoz, Daleo, & Guevara, 2006; Pagano, Mendieta, Muñoz, Daleo, & Guevara, 2007; Rocha, Díaz, Rosso, & Parisi, 2016). Numerosos inhibidores de serín proteasas han sido ensayados en su actividad antifúngica

debido a su capacidad inhibitoria de tripsina y/o quimiotripsina, dado que son proteasas estrechamente asociadas a procesos fisiológicos clave (Dabhade, Mokashe, & Patil, 2016; Luo, Xie, Wang, Wei, & Cai, 2016; Cai, Xie, Fu, & Wang, 2018). Un ejemplo a destacar es el de varios hongos fitopatogénicos que son conocidos por producir proteinasas extracelulares que desempeñan un papel activo en el desarrollo de enfermedades. Las plantas sintetizan polipéptidos inhibitorios que pueden suprimir las actividades de la enzima en respuesta al ataque por las proteinasas producidas por microorganismos fitopatogénicos (J. Y. Kim et al., 2009; Soares-Costa et al., 2002).

1.1.3.5.3 Aplicación en la Industria Alimentaria

En cuanto a su aplicación en la industria alimentaria, los IPPs están abriendo un camino potencial como aditivos naturales estables para los procesos de conservación de alimentos, no sólo por su **capacidad inhibitoria del crecimiento de patógenos** sino que también por su **actividad inhibitoria de proteasas**.

Está bien establecido que los IPPs son capaces de prolongar la vida útil de varios alimentos producidos, ya que pueden retrasar su proteólisis mediante la inhibición de la actividad de las proteasas exógenas y endógenas a lo largo de la conservación y el procesamiento de alimentos (Reppond & Babbitt, 1993). El uso de una cantidad adecuada de IPPs es una forma eficaz de prolongar la vida útil de muchos tipos de mariscos, como los productos de pescado salados. Esto se debe al hecho de que los inhibidores pueden retardar varios procesos de deterioro, como la degradación de proteínas causada por el proceso natural de descomposición del alimento (Bijina et al., 2011). Se ha observado, por ejemplo, que la presencia de serín proteasas unidas a miofibrillas (MBSP) es crucial para la degradación de las proteínas miofibrilares de pescado. La existencia de MBSP en el músculo de pescado fue notificada en diferentes especies de peces. Los IPPs se utilizaron para frenar este proceso de degradación de las proteínas, y así mantener la estructura del alimento (Zhong et al., 2012).

Otro efecto alimentario fue encontrado con inhibidores de serín proteasas que tienen la capacidad de incrementar el nivel de colecistoquinina debido a la inhibición de tripsina, por lo que pueden ser útiles para reducir el consumo de comida en humanos (Zhang, Kouzuma, Miyaji, & Yonekura, 2008).

Por otro lado, varios estudios también han demostrado los efectos antibacterianos *in-vitro* de los IPPs contra varias especies bacterianas patogénicas y no patogénicas de humanos, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Klebsiella oxytoca*, a concentraciones micromolares (Satheesh & Murugan, 2011). En este sentido, resulta promisorio el empleo de IPPs como potenciales conservantes naturales de alimentos, no sólo por su actividad antimicrobiana sino también por sus actividades biológicas y notables estabilidades fisicoquímicas. Estas características resultan propicias en la industria alimentaria para la producción de un eficaz conservante alimentario sin efectos adversos en el medio ambiente.

El potencial para el empleo de IPPs como conservantes naturales de alimentos, sumado a las actividades biológicas beneficiosas mencionadas anteriormente (**actividad anticoagulante, antihipertensiva, antioxidante, etc.**) hacen que sea posible pensar en la incorporación de IPPs como potenciales ingredientes funcionales de alimentos, ya que además de su función nutricional también tienen un efecto beneficioso sobre el organismo consumidor (humanos, animales de granja y domésticos). Esto podría llegar a producir grandes avances en la industria alimenticia y el bienestar de la comunidad, lo que a su vez, demuestra la relevancia de las investigaciones científicas abocadas a la identificación y caracterización de nuevos IPPs.

1.1.3.6 Inhibidores de proteasas, actualidad y perspectivas

Las moléculas de origen natural, de bajo peso molecular, con estabilidad fisicoquímica y actividad biológica, implican facilidad de uso en una amplia gama de aplicaciones en la industria de alimentos, biotecnologías agrícolas o aplicaciones farmacéuticas. En este sentido, la búsqueda de nuevas moléculas que cumplan con estas características ha generado particular interés para la ciencia y la tecnología, principalmente por el sinfín de ventajas que supone su empleo, sin la necesidad de requerimientos especiales de almacenamiento a temperaturas bajas o templadas, medios especiales de estabilización, conservación en soluciones tampón y/o requerimientos de ambientes no oxidativos, entre otras.

La disponibilidad de moléculas naturales estables y con actividades biológicas tales como capacidad antimicrobiana y/o pesticida abre camino a la utilización a nivel industrial de un potencial producto rentable, ecológico y versátil en su distribución geográfica (desde su comercialización y uso en zonas cálidas, húmedas, sin electricidad de países subdesarrollados y del tercer mundo hasta su empleo en países en desarrollo pero con limitaciones ambientales y ecológicas).

En los últimos años, estudios focalizados en la caracterización de IPPs han demostrado que dichas moléculas no sólo cumplen con las características mencionadas (bajo peso molecular, estabilidad fisicoquímica, origen natural y actividad biológica), sino que presentan una amplia gama de actividades biológicas, con potencial aplicación ya sea a nivel biomédico, agropecuario y/o alimentario.

Actualmente más de 450 biofármacos están siendo probados para el tratamiento de más de 100 enfermedades, muchos de los cuales son muy lábiles, poseen poca estabilidad frente a cambios de pH y temperatura, otros tienen un alto peso molecular (macromoléculas), lo que dificulta su acceso a regiones de vascularización fina, y su semivida es generalmente muy breve. Otro de los problemas actuales en el ámbito biomédico es la creciente aparición de bacterias multirresistentes, que ponen en peligro la eficacia de los antibióticos y amenazan los sistemas de salud, generando a nivel global la denominada “crisis de resistencia a los antibióticos”. Esta crisis se ha atribuido al uso excesivo y la prescripción inadecuada de antibióticos, así como también al uso extensivo de la agricultura como suplementos de crecimiento en el ganado, entre otros usos. Sumado a ello, existe muy poca disponibilidad de antibióticos novedosos debido a obstáculos económicos y regulatorios (Martins et al., 2018). En este sentido, la comunidad científica se encuentra en la búsqueda de alternativas terapéuticas naturales en reemplazo de aquellos antibióticos que van quedando en desuso u obsoletos. Es por ello que el uso potencial de IPPs naturales como nuevos agentes antibióticos (sin resistencia generalizada) resulta promisorio, no sólo por su notables estabilidades fisicoquímicas (Torres-Castillo et al., 2009; Macedo et al., 2011; H. P. S. Costa et al., 2014; Monteiro Júnior et al., 2017; Cotabarren, Tellechea, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2018; Martins et al., 2018), sino porque es cada vez mayor el número de artículos científicos que reportan IPPs con actividad antimicrobiana (Satheesh &

Murugan, 2011; Zhao et al., 2014; Brito et al., 2016; Habib, Fazili, Zargar, & Ganie, 2016; Maria Lígia R. Macedo et al., 2016).

La estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura es ventajosa para la aplicaci3n de inhibidores en la agricultura. El ambiente hostil del intestino medio del insecto y el pH 3ptimo de las enzimas pat3genas requieren que estas propiedades se encuentren presentes en un inhibidor eficiente. Asimismo, como nombramos anteriormente, debido a estas propiedades, los IPPs tambi3n abren un camino potencial para el desarrollo de tratamientos adecuados para la conservaci3n de alimentos como aditivos naturales.

Por todo lo dicho anteriormente, el estudio realizado en esta tesis doctoral inicia el camino para la b3squeda de nuevos IPPs naturales, estables y con actividad biol3gica para poder ser empleados en todas las tecnolog3as nombradas anteriormente en el marco de las necesidades actuales a nivel mundial por generar productos ben3ficos, saludables, econ3micos, rentables y amigables con el medio ambiente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis doctoral es la identificación, el aislamiento (que incluye purificación), caracterización bioquímica y proteómica, clonado y expresión recombinante de nuevos IPPs de origen vegetal del género Solanaceae, en especial papas andinas (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) y morrón (*Capsicum annuum* L.), ricas en este tipo de moléculas, y la evaluación de sus potenciales actividades biológicas como anticoagulantes y antimicrobianos naturales y su capacidad protectora del EGF. Además se estudiará un inhibidor de papaína aislado de *Moringa oleifera* con el objeto de evaluar su actividad biológica.

Para cumplir con estos objetivos, el diseño de la tesis consta de 3 partes o capítulos: en la primera se estudiarán los IPPs de solanáceas, en la segunda parte los IPPs de *Moringa* y en la tercera parte se propone realizar un análisis bioinformático para el desarrollo de un EGF mutante que presente resistencia a la proteólisis producida por las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Obtener extractos crudos (ECs) a partir de extractos vegetales de papas andinas (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*), de morrón amarillo (*Capsicum annuum* L.) y de *Moringa oleifera*, y detectar actividad inhibitoria de proteasas de distinto grupo mecanístico en los extractos obtenidos.
- b) Caracterizar bioquímicamente los ECs mediante electroforesis, isoelectroenfoque, contenido proteico, estabilidad térmica, estabilidad a pHs extremos, entre otros ensayos.
- c) Desarrollar matrices de afinidad para la captura específica de IPPs mediante inmovilización de proteasas específicas en soportes de agarosa.
- d) Purificar IPPs por cromatografía de afinidad utilizando soportes diseñados previamente y por cromatografía con matrices de exclusión molecular (FPLC) y fase reversa.

- e) Identificar y caracterizar los IPPs aislados mediante técnicas proteómicas tales como *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) e *Intensity fading* MALDI-TOF.
- f) Comparar los inhibidores purificados obtenidos con los inhibidores de la familia *Solanaceae* ya estudiados.
- g) Clonar, secuenciar y expresar de manera recombinante en *E. coli* los IPPs.
- h) Evaluar actividades biológicas en los IPPs aislados: actividad antimicrobiana, actividad anticoagulante, capacidad protectora del EGF.
- i) Evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de los IPPs después de un proceso de digestión gastrointestinal simulada.

Capítulo 2:

Aislamiento, purificación y caracterización de dos nuevos inhibidores de carboxipeptidasa A aislados a partir de especies solanáceas.

INDICE CAPITULO 2

2.1 Introducción.....	68
<i>Inhibidores de proteasas en la familia Solanaceae.....</i>	<i>68</i>
<i>2.1-Metalocarboxipeptidasas e inhibidores de metalocarboxipeptidasas.....</i>	<i>70</i>
<i>2.1.1 Metalocarboxipeptidasas.....</i>	<i>70</i>
<i>2.1.2 Inhibidores de metalocarboxipeptidasas.....</i>	<i>71</i>
<i>2.1.2.1 Mecanismo de inhibición de las metalocarboxipeptidasas.....</i>	<i>72</i>
<i>2.1.2.2 Inhibidores de carboxipeptidasa A en plantas.....</i>	<i>75</i>
<i>2.1.2.3 Aplicaciones potenciales de los inhibidores de metalocarboxipeptidasas (MCPIs).....</i>	<i>77</i>
<i>2.1.2.3.1 MCPIs como anticancerígenos.....</i>	<i>77</i>
<i>2.1.2.3.2 MCPIs y Alzheimer.....</i>	<i>78</i>
<i>2.1.2.3.3 MCPIs y artritis reumatoidea.....</i>	<i>79</i>
<i>2.1.2.3.4 MCPIs como agentes antitrombóticos.....</i>	<i>79</i>
<i>2.2-Miniproteínas de tipo knot.....</i>	<i>81</i>
<i>2.2.1 Miniproteínas naturales.....</i>	<i>82</i>
<i>2.3-Clonado y expresión recombinante de miniproteínas.....</i>	<i>84</i>
<i>2.3.1 Expresión de proteínas mediante el clonado.....</i>	<i>84</i>
<i>2.3.2 Expresión de proteínas recombinantes.....</i>	<i>84</i>
<i>2.3.2.1 Microorganismo: Escherichia coli BL21 (DE3).....</i>	<i>85</i>
<i>2.3.2.2 Plegamiento de proteínas.....</i>	<i>86</i>
<i>2.3.2.2.1 El plegamiento de proteínas y la formación de puentes disulfuro.....</i>	<i>87</i>
<i>2.3.2.2.1.1 Plegado oxidativo.....</i>	<i>87</i>
2.2 CAPITULO 2 – PARTE 1: Caracterización, clonado y expresión de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigenum</i> cv Imilla morada.....	91
2.2.1 Materiales y métodos.....	94
<i>2.2.1.1 Material vegetal.....</i>	<i>94</i>
<i>2.2.1.2 Metodología.....</i>	<i>95</i>
<i>2.2.1.2.1 Clonado de un nuevo PCI.....</i>	<i>95</i>

2.2.1.2.1.1	Diseño de cebadores (<i>primers</i>) específicos.....	95
2.2.1.2.1.2	Obtención del cDNA.....	96
2.2.1.2.1.2.1	Extracción del RNA total.....	96
2.2.1.2.1.2.2	RACE-PCR.....	97
2.2.1.2.1.2.2.1	Reacción de Retrotranscripción (RT).....	97
2.2.1.2.1.2.2.2	Reacción de PCR.....	98
2.2.1.2.1.3	Electroforesis en geles de agarosa.....	99
2.2.1.2.1.3.1	Preparación de las muestras.....	99
2.2.1.2.1.3.2	Preparación de los geles.....	100
2.2.1.2.1.3.3	Condiciones de corrida.....	100
2.2.1.2.1.4	Purificación de fragmentos de DNA.....	101
2.2.1.2.1.5	Clonado del cDNA.....	101
2.2.1.2.1.5.1	Medios de cultivo utilizados.....	101
2.2.1.2.1.5.1.1	Medios de cultivo líquidos.....	101
2.2.1.2.1.5.1.2	Medios de cultivo sólidos.....	102
2.2.1.2.1.5.1.3	Reactivos adicionales.....	103
2.2.1.2.1.5.2	Obtención de células <i>E. coli</i> competentes.....	103
2.2.1.2.1.6	Clonación.....	104
2.2.1.2.1.6.1	Vector de clonado.....	104
2.2.1.2.1.6.2	Ligación.....	105
2.2.1.2.1.6.3	Transformación y selección de clones.....	106
2.2.1.2.1.6.4	Glicerinado de los clones.....	107
2.2.1.2.1.7	Secuenciación del cDNA clonado.....	107
2.2.1.2.1.7.1	Aislamiento del DNA plasmídico.....	107
2.2.1.2.1.7.2	Digestión con enzimas de restricción.....	107
2.2.1.2.1.7.3	Secuenciación del DNA.....	108
2.2.1.2.1.7.4	Análisis de las secuencias de los cDNAs.....	108
2.2.1.2.2	Expresión del nuevo PCI.....	109
2.2.1.2.2.1	Obtención de la construcción de expresión.....	109
2.2.1.2.2.1.1	Aislamiento del cDNA del nuevo PCI en el vector de expresión.....	109
2.2.1.2.2.1.2	Clonado del cDNA del nuevo PCI.....	110

2.2.1.2.2.1.3	<i>Ligación del cDNA del nuevo PCI al vector de expresión.....</i>	110
2.2.1.2.2.2	<i>Clonado y expresión de la proteína recombinante usando el vector pIN-III-OmpA3.....</i>	111
2.2.1.2.2.3	<i>Producción de la proteína recombinante.....</i>	111
2.2.1.2.2.3.1	<i>Medios de cultivo utilizados.....</i>	111
2.2.1.2.2.3.1.1	<i>Medios de cultivo líquidos.....</i>	111
2.2.1.2.2.3.2	<i>Expresión en E. coli.....</i>	112
2.2.1.2.2.3.3	<i>Reordenamiento de los puentes disulfuro.....</i>	113
2.2.1.2.2.3.4	<i>Clarificación y centrifugado.....</i>	113
2.2.1.2.3	<i>Purificación del nuevo PCI.....</i>	113
2.2.1.2.3.1	<i>Cromatografía de intercambio iónico.....</i>	113
2.2.1.2.3.2	<i>Cromatografía en fase reversa a presión normal.....</i>	114
2.2.1.2.3.3	<i>Cromatografía en fase reversa a alta presión.....</i>	114
2.2.1.2.4	<i>Caracterización del nuevo PCI.....</i>	114
2.2.1.2.4.1	<i>Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.....</i>	114
2.2.1.2.4.2	<i>Caracterización proteómica.....</i>	115
2.2.1.2.4.2.1	<i>Determinación de peso molecular por MALDI-TOF.....</i>	115
2.2.1.2.4.2.2	<i>PMF MALDI-TOF.....</i>	115
2.2.1.2.4.2.2.1	<i>Electroforesis SDS-PAGE.....</i>	115
2.2.1.2.4.2.2.1.1	<i>Preparación de las muestras.....</i>	116
2.2.1.2.4.2.2.1.2	<i>Preparación de los geles.....</i>	116
2.2.1.2.4.2.2.1.3	<i>Aplicación de muestras y condiciones de corrida.....</i>	117
2.2.1.2.4.2.2.1.4	<i>Fijación y tinción.....</i>	118
2.2.1.2.4.2.2.2	<i>Digestión trípica.....</i>	119
2.2.1.2.4.2.2.3	<i>Determinación de la huella peptídica.....</i>	119
2.2.1.2.4.2.3	<i>Secuenciación de péptido interno e identificación por PMF-MALDI-TOF/TOF.....</i>	120
2.2.2	Resultados y discusión.....	121
2.2.2.1	<i>Clonado y secuenciamiento del nuevo PCI.....</i>	121
2.2.2.1.1	<i>Aislamiento del cDNA.....</i>	121

2.2.2.1.2 Clonado del cDNA del preproPCI _a parcial.....	122
2.2.2.1.3 Análisis de secuencia.....	123
2.2.2.1.3.1 Análisis de la secuencia nucleotídica.....	124
2.2.2.1.3.2 Análisis de la secuencia aminoacídica.....	126
2.2.2.2 Expresión del nuevo PCI.....	127
2.2.2.2.1 Diseño y estrategia de expresión de la proteína madura.....	127
2.2.2.2.2 Clonado y expresión heteróloga de imaPCI.....	129
2.2.2.2.2.1 Clonado preliminar de pGEM-T Easy_imaPCI en <i>E. coli</i>	129
2.2.2.2.2.2 Expresión de imaPCI en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	130
2.2.2.2.2.3 Expresión de la proteína recombinante.....	131
2.2.2.2.3 Purificación del nuevo PCI.....	132
2.2.2.2.3.1 Cromatografía de intercambio iónico.....	133
2.2.2.2.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal.....	134
2.2.2.2.4 Caracterización del nuevo PCI.....	135
2.2.2.2.4.1 Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.....	135
2.2.2.2.4.2 Determinación de la constante cinética de inhibición (K _i) para MCPs tipo A/B.....	136
2.2.2.2.4.3 Caracterización proteómica.....	137
2.2.2.2.4.3.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF.....	137
2.2.2.2.4.3.2 PMF MALDI-TOF.....	138
2.2.2.2.4.3.3 PMF MALDI-TOF/TOF.....	139
2.2.3 Conclusiones.....	140
2.3 CAPITULO 2 – PARTE 2: Purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de pimiento amarillo (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	143
2.3.1 Materiales y métodos.....	145
2.3.1.1 Material vegetal.....	145
2.3.1.2 Metodología.....	146
2.3.1.2.1 Preparación de extracto crudo.....	146
2.3.1.2.2 Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976).....	146

2.3.1.2.3 Screening para la búsqueda de inhibidores de proteasas de distintos tipos mecanísticos por métodos bioquímicos.....	147
2.3.1.2.3.1 Determinación de actividad inhibitoria de tripsina.....	147
2.3.1.2.3.2 Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.....	148
2.3.1.2.3.2.1 Determinación de la IC ₅₀ : curva dosis-respuesta.....	149
2.3.1.2.4 Purificación.....	149
2.3.1.2.4.1 Purificación parcial mediante tratamiento térmico.....	149
2.3.1.2.4.2 Purificación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad.....	150
2.3.1.2.4.2.1 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa.....	150
2.3.1.2.4.2.2 Desarrollo de la cromatografía de afinidad.....	153
2.3.1.2.4.2.2.1 Cromatografía de afinidad a tripsina.....	153
2.3.1.2.4.2.2.2 Cromatografía de afinidad a CPA.....	153
2.3.1.2.5 Método para concentración de proteínas: liofilización.....	154
2.3.1.2.6 Caracterización.....	155
2.3.1.2.6.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	155
2.3.1.2.6.2 Caracterización proteómica.....	155
2.3.1.2.6.2.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF.....	155
2.3.1.2.6.2.2 PMF MALDI-TOF.....	155
2.3.1.2.6.3 Ensayos de estabilidad.....	155
2.3.1.2.6.3.1 Efecto del pH en la estabilidad del inhibidor.....	155
2.3.1.2.6.3.2 Efecto de la concentración de NaCl en la estabilidad del inhibidor.....	155
2.3.1.2.6.3.3 Ensayo de simulación de la digestión gastrointestinal.....	156
2.3.2 Resultados y discusión.....	157
2.3.2.1 Screening o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de diferentes tipos mecanísticos.....	157
2.3.2.1.1 Actividad Inhibitoria de tripsina del Extracto Crudo.....	157

2.3.2.1.2 <i>Actividad Inhibitoria de carboxipeptidasa A del Extracto Crudo</i>	158
2.3.2.2 <i>Purificación parcial de inhibidores mediante tratamiento térmico</i>	159
2.3.2.2.1 <i>Actividad inhibitoria de proteasas</i>	160
2.3.2.2.2 <i>Análisis del patrón proteico mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF</i>	163
2.3.2.3 <i>Caracterización parcial del inhibidor de tripsina de morrón amarillo (YBPTI)</i>	166
2.3.2.3.1 <i>Purificación del inhibidor de tripsina aislado a partir de pimiento amarillo</i>	166
2.3.2.3.2 <i>Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta</i>	167
2.3.2.3.3 <i>Determinación de la masa molecular</i>	167
2.3.2.4 <i>Purificación y caracterización parcial del inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo (YBPCI)</i>	169
2.3.2.4.1 <i>Purificación del inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de morrón amarillo</i>	169
2.3.2.4.2 <i>Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta</i>	170
2.3.2.4.3 <i>Ensayos de estabilidad</i>	171
2.3.2.4.3.1 <i>Estabilidad a valores extremos de pH</i>	171
2.3.2.4.3.2 <i>Estabilidad a concentraciones de NaCl</i>	172
2.3.2.4.3.3 <i>Efecto de la digestión gastrointestinal en la estabilidad del inhibidor</i>	173
2.3.2.5 <i>Caracterización del YBPCI purificado</i>	175
2.3.2.5.1 <i>Determinación de la masa molecular</i>	175
2.3.2.5.2 <i>Identificación proteica mediante PMF-MALDI-TOF</i>	176
2.3.2.5.3 <i>Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta</i>	176
2.3.3 Conclusiones	177

2.1 INTRODUCCIÓN

Inhibidores de proteasas en la familia Solanaceae

Como mencionamos en el capítulo anterior, polipéptidos inhibidores de enzimas proteolíticas se encuentran en una variedad de grupos sistemáticos de plantas. En particular, se hallan niveles elevados de inhibidores de proteasas en muchas plantas de la familia Solanaceae (Fan & Wu, 2005). Estos inhibidores representan entre el 20-50% de la totalidad de proteínas solubles en los tubérculos de papas (Pouvreau, Gruppen, Van Koningsveld, Van Den Broek, & Voragen, 2003), tienen pesos moleculares de entre 2 y 24 kDa, y pueden inhibir proteasas serínicas (Walsh & Twitchell, 1991), aspárticas (Mares, Meloun, Pavlik, Kostka, & Baudys, 1989; Pouvreau et al., 2003), cisteínicas (Krizaj, Drobnic-Kosorok, Brzin, Jerala, & Turk, 1993; Pouvreau et al., 2003) y metaloproteasas (Hass & Hermodson, 1981). Estos inhibidores se acumulan en hojas y tubérculos de papas en respuesta a heridas mecánicas (Valueva et al., 2001), radiación UV (Conconi, Smerdon, Howe, & Ryan, 1996), y lesiones por insectos (Bergey, Howe, & Ryan, 1996) o microorganismos patógenos (Valueva & Mosolov, 2004).

Estudios posteriores mostraron que los tubérculos de papas acumulan inhibidores de serín proteasas de 2 a 24 kDa en respuesta a heridas mecánicas e infección con *Phytophthora infestans* (Valueva, Revina, Kladnitskaya, & Mosolov, 1998; Valueva & Mosolov, 2004). Potide-G es un péptido antimicrobiano de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley) que inhibe potencialmente el crecimiento de una variedad de cepas de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, y *Clavibacter michiganense* subsp. *Michiganinse*) y hongos (*Candida albicans* y *Rhizoctonia solani*). Tal como otros miembros de esta clase de inhibidores de proteasas, potide-G puede tener una cantidad de usos beneficiosos y terapéuticos (M. H. Kim et al., 2006). Finalmente, otro inhibidor de serín proteasas con actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, y *Clavibacter michiganense* subsp. *Michiganinse* fue aislado de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu). Estos resultados son muy promisorios y sugieren que dicho inhibidor es un excelente

candidato como un compuesto líder para el desarrollo de nuevos agentes antiinfecciosos orales u otros (M. H. Kim et al., 2006).

El inhibidor de MCPs más estudiado es el PCI (Potato Carboxypeptidase Inhibitor) aislado a partir de Solanum tuberosum subsp. tuberosum. En este capítulo hablaremos de las potenciales aplicaciones del PCI y se expondrán los resultados del aislamiento, purificación, caracterización y potencial aplicación biotecnológica de dos nuevos inhibidores tipo-PCI obtenidos a partir de distintas especies de solanáceas.

2.1- METALOCARBOXIPEPTIDAS E INHIBIDORES DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS

2.1.1 METALOCARBOXIPEPTIDASAS

Las carboxipeptidasas son enzimas proteolíticas (exopeptidasas) que hidrolizan uniones peptídicas a partir del extremo C-terminal o carboxilotermino de péptidos y proteínas, jugando un rol esencial en los procesos de degradación, procesamiento y modulación del proteoma celular (Arolas et al., 2007). Las carboxipeptidasas fueron consideradas inicialmente como enzimas degradativas asociadas al catabolismo de proteínas, pero con el correr de los años los estudios científicos han demostrado que algunas carboxipeptidasas juegan roles esenciales en el control de una variedad de procesos biológicos (Tanco et al., 2013).

La acción de carboxipeptidasas puede ocurrir mediante tres mecanismos catalíticos asociados a los diferentes residuos aminoacídicos localizados en el sitio activo de la enzima: a) un residuo de serina, b) una cisteína o c) un átomo de zinc. Este último grupo representa a las metalocarboxipeptidasas (MCPs) las cuales poseen un átomo de Zn^{+2} fuertemente unido en su estructura que se encuentra directamente implicado en la catálisis enzimática (Hooper NM. 1996). Estas enzimas llevan a cabo una amplia gama de funciones fisiológicas, que van desde la digestión de alimentos hasta el control fino de la señalización celular.

Las MCPs pueden ser clasificadas en base a sus motivos de interacción y relaciones estructurales, siendo esta clase de enzimas nucleada en la familia M14 de la base de datos MEROPS. Dentro de la misma existen cuatro subfamilias: M14A, M14B, M14C y M14D (Rawlings et al., 2016), donde el grado de identidad de la secuencia dentro de cada subfamilia es del 25-63%, pero disminuye solo al 15-25% cuando dos subfamilias son comparadas (Arolas et al., 2007).

Las MCPs también pueden ser clasificadas de acuerdo a la especificidad de sustrato (Lyons & Fricker, 2010) en:

- MCPs tipo-A: con preferencia por aminoácidos hidrofóbicos en el C-terminal. A su vez, pueden ser divididas en dos grupos (Tanco et al., 2013):
 - MCPs tipo-A1 (preferencia por residuos alifáticos pequeños y grandes residuos aromáticos),

-MCPs tipo-A2 (preferencia marcada por residuos aromáticos grandes).

- MCPs tipo-B: con preferencia por aminoácidos básicos en el C-terminal.
- MCPs tipo-O: con preferencia por aminoácidos ácidos en el C-terminal.
- MCPs con amplia especificidad de sustrato.

Las MCPs pancreáticas A1, A2 y B típicamente funcionan solo como enzimas digestivas, mientras que el resto de MCPs incluyendo la carboxipeptidasa A de mastocitos (CPA3) y la carboxipeptidasa U, ejercen su acción en procesos selectivos, principalmente en procesos no digestivos, aún llamadas erróneamente carboxipeptidasas (pancreáticas).

En humanos, la actividad desregulada de algunas MCPs ha sido asociada a diversas patologías tales como: alteraciones de la coagulación sanguínea y de la fibrinólisis, procesos inflamatorios, carcinogénesis, epilepsia y convulsiones febriles, entre otras (Arolas et al., 2007; Sapio et al., 2012; Tanco et al., 2013; Sun et al., 2016). De acuerdo a estos estudios, el uso de inhibidores de proteasas con el objeto de regular la acción de las MCPs ha emergido como una herramienta potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas para un elevado número de patologías, por ejemplo como anticarcinogénicos, anti-angiogénicos y anti-trombóticos entre otras (Sitjà-Arnau et al., 2005; X. Wang, Smith, Hsu, Ogletree, & Schumacher, 2006; Cavallini et al., 2011; Xue et al., 2016).

2.1.2 INHIBIDORES DE METALOCARBOXIPEPTIDASAS

Si bien los IPs han sido considerados durante décadas como factores antinutricionales, en los últimos años han ganado interés por su potencial para el desarrollo de drogas y sus posibles efectos dietarios positivos. El empleo de IPs de origen natural por sobre los sintéticos presenta numerosas ventajas debido a su baja toxicidad e hidrofobicidad (Fear, Komarnytsky, & Raskin, 2007), sin embargo el número de inhibidores de MCPs de origen natural identificados y caracterizados hasta el momento es muy limitado: en la familia *Solanaceae* se han aislado en tomate (*Solanum lycopersicum*, MCPTI) y papa (*Solanum tuberosum*, PCI) (Arolas et al., 2007; Rees & Lipscomb, 1982); en papas andinas (*Solanum tuberosum* grupo andigenum cv. Imilla morada, imaPCI y cv. Churqueña, chuPCI) (Cotabarren, Tellechea, Tanco, Lorenzo, García-Pardo, Avilés, & Obregón, 2018; Lufrano,

Cotabarren, García-Pardo, Fernandez-Alvarez, Tort, Tanco, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2015 respectivamente); en pimiento amarillo (*Capsicum annuum* cv. Amarillo, YBPCI) (Cotabarren, Tellechea, Avilés, Lorenzo, & Obregón, 2018); en el parásito intestinal *Ascaris suum* (ACI) (Sanglas et al., 2009); en la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis* (LCI) (D Reverter et al., 2000); en las garrapatas *Rhipicephalus bursa* (TCI) (Arolas et al., 2005) y *Haemaphysalis longicornis* (HITCI) (Gong et al., 2007); *Nerita versicolor* (NvCI) (Covaleda et al., 2012); en tejidos de rata y humanos (latexina o ECI) (Normant et al., 1995; Pallares et al., 2005); y en el anélido marino *Sabellastarte magnifica* (SmCI) (Alonso-Del-Rivero et al., 2009).

2.1.2.1 Mecanismo de inhibición de las metalocarboxipeptidasas

En este capítulo de la tesis doctoral proponemos estudiar un grupo particular de inhibidores de MCPs, los cuales interaccionan con la cavidad del sitio activo imitando al sustrato peptídico (pseudosustrato) (Vendrell, Querol, & Aviles, 2000). Ejemplos de este tipo de inhibición están dados por el PCI, el ACI, el LCI, el TCI y el NvCI.

En el caso del PCI, la estructura cristalográfica en complejo junto a la carboxipeptidasa A bovina, y a las MCPs A1, A2 y A4 humanas (Rees & Lipscomb, 1982; D Reverter et al., 2000) muestra que la cadena C-terminal del PCI se encuentra inserta en el sitio activo de la enzima formando el primer sitio de interacción. El residuo C-terminal de Gly39 es posteriormente removido, manteniendo unido el resto del PCI al subsitio S1' de la carboxipeptidasa a través del nuevo residuo C-terminal de Val38. El nuevo residuo C-terminal se encuentra ahora coordinado con el Zn^{2+} del sitio activo y mediante un puente de hidrógeno al oxígeno del fenol de la Tyr248 de la MCP humana. Algunos átomos de la cadena lateral de la Val38 del PCI residual se encuentran a una distancia de Van der Waals del oxígeno del grupo carbonilo de la Ser197 y Tyr198 y de las cadenas laterales de Ile247, Tyr248, Tyr198 y Phe279 de la MCP. Por otro lado, el grupo carbonilo del oxígeno de las Tyr37 se encuentra unido mediante puente de hidrógeno al grupo guanidinio de la Arg71 de la MCP. Algunas interacciones secundarias son dadas por los residuos 15, 22 y 27-30 del PCI, y mayormente los residuos 246-248 de las enzimas, las cuales son de importancia ya que refuerzan la interacción enzima-inhibidor. En las estructuras de la Figura 2.1 se puede observar como los sitios S1, S2 y S3 de la carboxipeptidasa están envueltos en los contactos con el inhibidor. Las

numerosas interacciones con los residuos esenciales para la interacción del sustrato y la catálisis probablemente suman para que la inhibición sea eficiente. Adicionalmente, hay un excelente ajuste o acople entre las superficies de la región globular de los inhibidores y las carboxipeptidasas, lo cual excluye cualquier penetración y promueve la formación de un fuerte complejo.

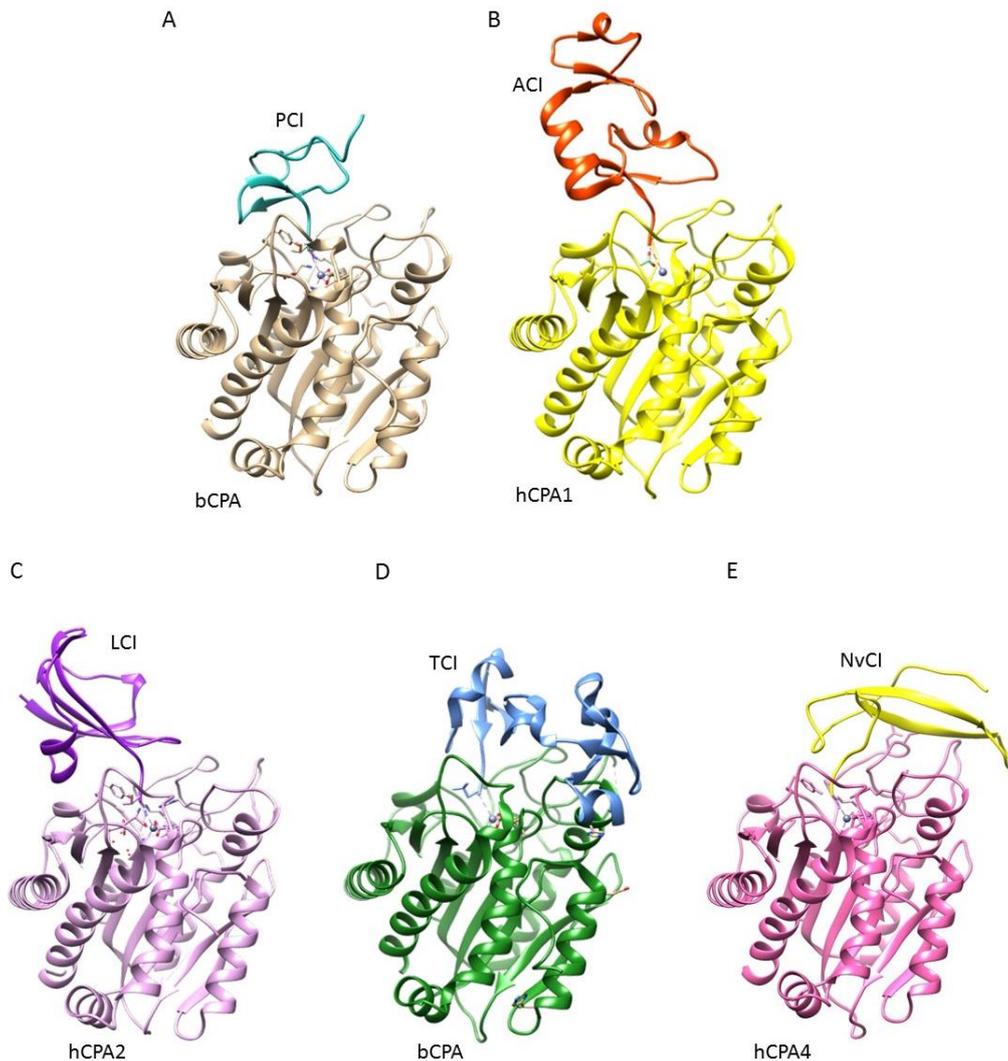


Figura 2.1: Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor. A, CPA bovina-PCI; B, hCPA1 (CPA1 humana)-ACI; C, hCPA2-LCI; D, CPA bovina-TCI y E, hCPA4-NvCI.

Se puede observar en la Figura 2.1 que las estructuras del PCI y del LCI en los complejos son completamente diferentes, exceptuando el extremo C-terminal, donde las estructuras se observan de forma idéntica en ambas proteínas. Dado que

la secuencia de los residuos de la región C-terminal es la única región conservada podría ser un claro ejemplo de evolución convergente dictada por las metalocarboxipeptidasas blanco (David Reverter et al., 1998).

Por otro lado, la estructura cristalográfica del SmCI en complejo con CPA4 muestra una zona de interacción a través del N-terminal con el sitio activo, pero además se encuentra bloqueando la carboxipeptidasa de forma estérica. La gran diferencia es que este inhibidor posee un tamaño mayor que los inhibidores que interaccionan con las MCPs a través del C-terminal. SmCI es una proteína de 19,7 kDa y posee 3 dominios, de los cuales D1 y D2 son necesarios para la inhibición de CPA. La latexina humana (inhibidor de CPA4 involucrado en funciones inflamatorias y en vías de inmunidad innata, (Aagaard et al., 2005) también se describe como este tipo de inhibidores, la cual es una molécula más grande aún, de 25 kDa, pero a su vez ninguno de sus extremos se encuentra implicado en la inhibición de las CPAs. La inhibición se produce a través de la interacción de la latexina por la parte superior del embudo que forma la estructura de la CPA (Figura 2.2).

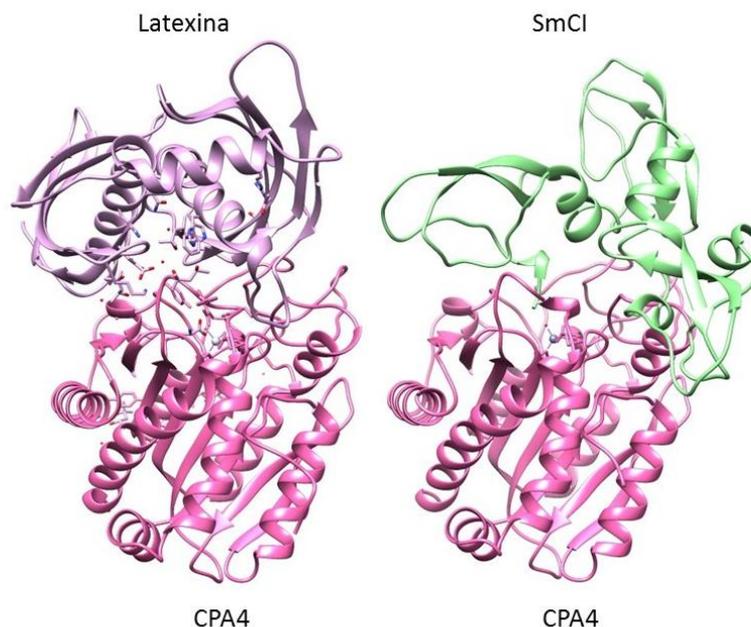


Figura 2.2: Estructuras cristalográficas de los complejos carboxipeptidasa-inhibidor, CPA4 humana-Latexina y CPA4 humana-SmCI.

2.1.2.2 Inhibidores de carboxipeptidasa A en plantas

El inhibidor de MCPs más estudiado hasta el momento es el de *Solanum tuberosum*, PCI. Fue el primero que se caracterizó gracias al trabajo pionero de Hass, Neurath, Ryan y colaboradores (Neurath & Walsh, 1976; Hass & Derr, 1979; C. A. Ryan, 1980). Es una proteína globular de 39 residuos, una de las más pequeñas que se ha descrito. Las estructuras primaria (secuencia lineal) y secundaria se muestran en la Figura 2.3.

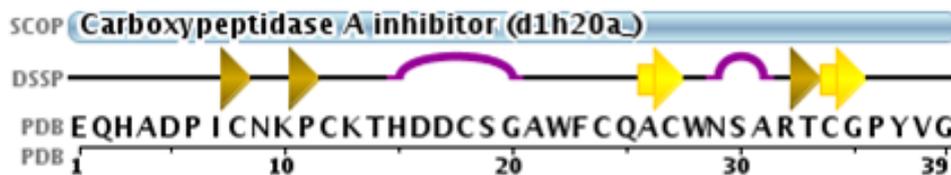


Figura 2.3: Estructuras primaria y secundaria del inhibidor de carboxipeptidasa de *Solanum tuberosum* (PCI) estudiado (P01075 (MCPI_SOLTU) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot).

La estructura tridimensional de este IPP se conoce en solución acuosa (Clore, Gronenborn, Nilges, & Ryan, 1987) y como un complejo cristalizado con carboxipeptidasa A (Rees & Lipscomb, 1982). Por otro lado, la estructura en solución y el esqueleto dinámico del PCI recombinante también fueron caracterizados por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Gonzalez 2003).

Los residuos 8 a 34 constituyen el núcleo globular del PCI, el cual 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 siete residuos en el extremo N-terminal y cinco residuos hacia el extremo C-terminal (cola C-terminal) (Figura 2.4).

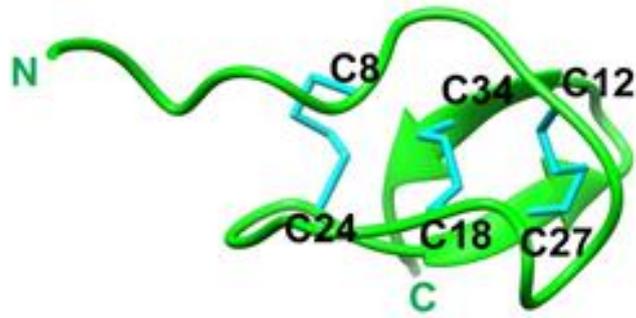


Figura 2.4: Modelo del PCI donde puede observarse la distribución de los puentes disulfuro en color cian y las cisteínas que lo componen, además de los extremos N-terminal (N) y C-terminal (C).

El PCI pertenece a la super familia de proteínas llamadas “*cysteín-knot*” o “*knot*”, llamadas así por su particular patrón de puentes disulfuros (Bronsoms, Villanueva, Canals, Querol, & Aviles, 2003; Bateman & James, 2011). El papel funcional del extremo N-terminal no es atribuido a la inhibición en sí, sino al correcto plegado de la molécula para adquirir su forma nativa (Venhudova, Canals, Querol, & Aviles, 2001).

El PCI se expresa como una pro-proteína y la misma se acumula en las vacuolas. La incapacidad de la pro-forma de inhibir carboxipeptidasas y su estabilidad frente 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, McBride, & Houck, 1991), un papel en la modulación de la actividad inhibitoria del PCI (es decir el pro-inhibidor, no inhibe la enzima y es estable a su digestión). El extremo C-terminal del PCI se acopla a la carboxipeptidasa A (CPA) penetrando en el sitio activo de la enzima, dando lugar a un mecanismo de inhibición tipo tapón (Aviles, Vendrell, Guasch, Coll, & Huber, 1993; Marino-Buslje et al., 2000). El inhibidor se comporta como un producto peptídico estrechamente ligado. Una vez formado el complejo estable, el residuo C-terminal (Gly39) del PCI es escindido por la enzima mientras que el resto del inhibidor se mantiene ligado al sitio activo de la enzima por varios contactos, impidiendo así el acceso de otros sustratos (Arolas et al., 2005; Zhang & Li, 2012).

La importancia funcional de los 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 Gly35 (Rees & Lipscomb, 1982). Por otra parte, un corto tramo de residuos del núcleo central es conocido como el sitio secundario de unión, el cual incluye los residuos 15, 23 y 28-31 del PCI (Marino-Buslje et al., 2000; Arolas et al., 2005;). Ambos sitios de interacción han sido experimentalmente demostrados por estudios de modificación química (Hass & Derr, 1979), por lo que dichas regiones se consideran esenciales para la interacción.

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 (Zhang & Li, 2012).

2.1.2.3 Aplicaciones potenciales de los inhibidores de metalocarboxipeptidasas (MCPIs)

En los últimos años, el uso de IPPs naturales para regular la actividad de MCPs ha emergido como una potencial herramienta para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Fischer, Kuckenber, Kastilan, Muth, & Gebhardt, 2014; Atanasov et al., 2015). A continuación se describen las potenciales aplicaciones de los inhibidores de MCPs de acuerdo a los ensayos *in vitro* realizados hasta la fecha.

2.1.2.3.1 MCPIs como anticancerígenos

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) tienen fama de causar la destrucción inflamatoria del tejido que caracteriza a las enfermedades inflamatorias crónicas y de degradar el colágeno de la membrana basal, lo que facilita la metástasis de las células cancerosas (Dufour & Overall, 2013). Al reconstruir las proteínas del estroma y de la superficie celular, las proteasas extracelulares dependientes de metales regulan el comportamiento celular, lo que influye en la forma, la actividad, la generación, la estabilidad genómica y la diferenciación de las células. Por lo tanto, cualquier cambio en las interacciones celulares por las proteasas puede conducir a

la progresión neoplásica (Begers & Coussens, 2000). Se ha reportado que las serín y las metaloproteasas se encuentran involucradas en los eventos combinados que subyacen a la migración celular (Murphy & Gavrilovic, 1999). La inhibición de MMPs mediante IPPs puede prevenir la invasión de angiogénesis, metástasis y crecimiento de tumores. Durante la carcinogénesis y la angiogénesis, se expresan gelatinasas, MMP-2 y MMP-9 que, cuando son inhibidas por los IPPs, pueden detener el crecimiento del tumor y la metástasis (Rudek et al., 2002).

Estudios llevados a cabo por Blanco-Aparicio y colaboradores (Blanco-Aparicio et al., 1998) demostraron que el PCI compite con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*) para unirse al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) inhibiendo la activación del mismo y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. El PCI suprime así 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, 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.

2.1.2.3.2 MCPIs y Alzheimer

Se cree que la acumulación de proteína β -amiloide ($A\beta$) es la causa principal de la enfermedad de Alzheimer (Badiola et al., 2013). Las MMPs representan una nueva clase de proteasas involucradas en la patogénesis de varias enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC) como la enfermedad de Alzheimer, donde las MMPs podrían ser un intermediario en la deposición de α -péptidos tipo $A\beta$ ya que regulan la capacidad angiogénica y contribuyen a la invasividad de células de glioma malignas. Por lo tanto, los inhibidores de MMPs naturales y/o sintéticos pueden ser importantes para curar algunas enfermedades del SNC (Fujioka et al., 2012).

2.1.2.3.3 MCPIs y artritis reumatoidea

Las MMPs han sido conocidas por su papel en las enfermedades patológicas como la osteoartritis, la desmineralización de los huesos y cartílagos y la artritis reumatoidea. Debido a esto, el nivel de MMP-7 y otros cofactores se consideran biomarcadores que pueden contribuir a la detección no invasiva de dichas enfermedades (Murphy & Lee, 2005). Las metaloenzimas tienen el potencial de destruir todos los componentes del cartílago (Cawston, 1998; Murphy & Lee, 2005), que es una causa importante de fracaso de los tratamientos convencionales. Por lo tanto, se están realizando nuevas investigaciones para evaluar los Inhibidores de Metaloproteasas de Tejido (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) que específicamente bloquean las MMPs activas *in vitro*, así como en modelos animales (Cawston, 1998; Haq et al., 2010).

2.1.2.3.4 MCPIs como agentes antitrombóticos

El Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina (TAFI), también conocido como procarboxipeptidasa B plasmática, procarboxipeptidasa U o carboxipeptidasa R, es una glicoproteína de 60 kDa que circula en el plasma y que se activa por la trombina generada durante la coagulación. El TAFI activado (TAFIa) escinde los residuos de lisina C-terminal de la fibrina parcialmente degradada haciéndola menos sensible a la fibrinólisis (Marx, 2004). Los niveles de TAFI en plasma humano influyen en el tiempo de lisis del coágulo en individuos sanos (Mosnier, von dem Borne, Meijers, & Bouma, 1998) es por ello que niveles elevados de TAFI podrían predecir el riesgo de trombosis venosa profunda (van Tilburg, Rosendaal, & Bertina, 2000), enfermedad arterial coronaria (Schroeder et al., 2002; Zorio et al., 2003) y accidente cerebrovascular isquémico (Montaner, Ribo, Monasterio, Molina, & Alvarez-Sabin, 2003).

Se ha observado que la incorporación de un inhibidor natural de la actividad del TAFIa, como el PCI, en un coágulo creado dentro de la vena yugular de conejos potenció la trombólisis endógena (Minnema et al., 1998; Nagashima et al., 2002). Además, la administración de PCI o de una pequeña molécula inhibidora de carboxipeptidasa B (CPB) y carboxipeptidasa N (CPN) redujo la micro trombosis renal inducida por factor tisular en ratas (Muto, Suzuki, Sato, & Ishii, 2003). En 2006,

Wang y colaboradores desarrollaron un modelo murino de trombosis de vena cava y caracterizaron la actividad antitrombótica del PCI en ratones, demostrando que dicho inhibidor puede actuar como un fármaco antitrombótico.

2.2- MINIPROTEINAS DE TIPO KNOT

Las miniproteínas de tipo *knot* constituyen una clase de biomoléculas que combinan características de proteínas y péptidos, teniendo un tamaño de péptidos pero una estructura característica de proteínas. Poseen alrededor de treinta aminoácidos y están definidas mediante una estructura terciaria extraordinariamente estable, constituidas por tres hojas- β antiparalelas, conectadas mediante bucles (*loops*) de un largo y composición de secuencia variables, y unidas entre ellas mediante un característico patrón de tres puentes disulfuro llamado nudo (*knot*) de cisteínas. En este patrón, uno de los puentes disulfuro pasa a través del anillo formado por los otros dos puentes estableciendo la estructura característica. Este es el motivo por el cual el nombre “*knotting*” fue asignado a estas moléculas con estos particulares puentes disulfuro (Chiche et al., 2004). La distribución de estos enlaces otorga a las miniproteínas “*knot*” una extraordinaria estabilidad térmica, química y resistencia a la proteólisis. Pueden ser hervidas, incubadas a 65 °C por semanas, o incluso conservadas en HCl o NaOH 1N, sin perder su integridad funcional ni estructural (Werle, Kafedjiiski, Kolmar, & Bernkop-Schnürch, 2007; Heitz et al., 2008; R. H. Kimura, Levin, Cochran, & Cochran, 2009; C. K. Wang et al., 2009). Muchas de estas miniproteínas son de por sí resistentes frente a las proteasas presentes en el suero o incluso frente a proteasas intestinales con lo cual podrían administrarse oralmente como fármacos. Miembros de la familia de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento nervioso (NGF), o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también contienen un cuerpo del tipo *knot* de tres puentes disulfuro. Sin embargo, los loops que sobresalen del *core* o centro *knot* son más largos que lo normal para este tipo de miniproteínas, más flexibles y por lo tanto no muestran las características de estabilidad que presentan las proteínas tipo *knot* (Kolmar, 2009).

Los representantes de las familias de proteínas con cisteínas de tipo *knot*, tales como los inhibidores de proteasas de plantas; péptidos de las familias de plantas *Rubiaceae* y *Violaceae*; toxinas de caracoles como marinos, arañas, insectos, cangrejo herradura o escorpión; péptidos de tipo Gurmarin (Sigoillot et al., 2018) proteínas relacionadas con el dominio C-terminal de la proteína Agouti humana; y por último péptidos antimicrobianos se encuentran disponibles en la base de datos KNOTTIN (Gracy et al., 2008) (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>).

2.2.1 MINIPROTEÍNAS NATURALES

Las proteínas tipo *knot* han sido aisladas de varias fuentes naturales, como artrópodos, moluscos, esponjas, vertebrados, hongos y plantas. El único motivo conservado que poseen es la distribución de los *loops* flanqueados por cisteínas y el modo en que forman los puentes disulfuro. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos entre estas proteínas son muy variables lo que incluye un amplio espectro de actividades biológicas.

Se han aislado proteínas tipo *knot* de caracoles marinos con blanco en canales iónicos operados por voltaje. El ejemplo más prometedor es la ω -conotoxina MVIIa, un potente bloqueador de canales de calcio derivado del molusco *Conus magus*, que ha sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de pacientes con dolor crónico severo (Williams, Day, & Heavner, 2008). Otras conotoxinas se encuentran en fase clínica I/II para indicaciones similares. Además, esta clase de miniproteínas se encuentran bajo consideración para el tratamiento de lesiones cerebrales por accidente cerebro vascular isquémico, ya que existe evidencia de que el bloqueo de canales de calcio podría ser de valor terapéutico para este asunto (Perez-Pinzon, Yenari, Sun, Kunis, & Steinberg, 1997; Massote et al., 2008).

Muchas proteínas aisladas del veneno de arañas, como ω -agatoxinas, robustoxina, versutoxina, y proteína 5 (Pallaghy, Nielsen, Craik, & Norton, 1994) actúan también como inhibidores de los canales iónicos. En el veneno de la tarántula Trinidad chevron *Psalmopoeus cambridgei* se han descrito proteínas tipo *knot* que tienen como blanco el receptor de capsaicina TRPV1 (Receptor catiónico de potencial transitorio V1), un canal de excitación expresado en neuronas sensitivas de la vía del miedo, que funciona como agonista de TRP (Receptor catiónico de potencial transitorio). Estas vanillotoxinas activan los canales de excitación en neuronas somatosensoriales para provocar el pánico y la inflamación en mamíferos (Siemens et al., 2006). Otra dos proteínas tipo *knot*, las psalmopeotoxinas I y II fueron aisladas del veneno de la misma tarántula y han sido presentadas como un inhibidor del estado intraeritrocítico del parásito *Plasmodium falciparum* de la malaria (Pimentel et al., 2006).

Miniproteínas cisteínicas de tipo *knot* de origen humano son el Péptido de Señalización Agouti (ASIP) y el Péptido de Señalización relacionado con el Péptido

Agouti (AGRP), que contienen dominios C-terminales con un plegado de tipo *knot*. Ellos actúan como agonistas inversos que controlan, respectivamente, la pigmentación y la función metabólica (Jackson et al., 2002; Wilczynski, Joseph, & Haskell-Luevano, 2005; Yu & Millhauser, 2007).

Como mencionamos anteriormente, el PCI aislado de papa es una proteína que con sus tres puentes disulfuro y su tamaño responde a las características de tipo *knot*. Esta molécula ha sido evaluada como antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Blanco-Aparicio et al., 1998) e incluso ha sido estudiado el mecanismo por el cual ejerce su efecto (Sitjà-Arnau et al., 2005).

2.3- CLONADO Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE MINIPROTEINAS

2.3.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL CLONADO

Las proteínas en organismos hospedadores se expresan en cantidades limitadas y usualmente en respuesta a cierto estímulo. Uno de los objetivos del clonado es obtener un elevado nivel de la expresión de la proteína de interés, mayor a la del organismo de origen en lo que respecta a dicha proteína, de modo de poder producirla en cantidades, aproximadas al miligramo, necesarias para la caracterización estructural y funcional.

Los sistemas de clonado pueden ser utilizados de una manera controlada para expresar la proteína de interés en respuesta a estímulos, cuando sea necesario hacerlo. Estos sistemas requieren de un inductor o de condiciones de estrés para desbloquear la transcripción progresiva del gen clonado de la proteína de interés (Ather, 2009).

La selección cuidadosa del sistema de clonado de acuerdo a las características de la proteína y los requisitos para la purificación de la proteína, es el paso inicial y más importante en la expresión de la proteína en lo que respecta a la tecnología de clonado. El segundo paso es la optimización de las condiciones de crecimiento o los constituyentes del medio para obtener el mayor rendimiento posible. La decisión teórica y experimental en estos dos pasos gobiernan lo que es el desarrollo de sistemas de expresión económicamente viables (Ather, 2009).

2.3.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la producción de una proteína recombinante es necesario caracterizar la proteína de interés y, posteriormente, seleccionar un sistema para expresar la misma (Guerrero-Olazarán et al., 2004). Para ello, se debe tener en consideración el origen biológico, estructura y funcionalidad de la proteína de interés. En cuanto a la estructura y funcionalidad se debe analizar la secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización de la transcripción; evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico; la estabilidad al pH, temperatura y el destino (extracelular o intracelular), entre otras cosas (Guerrero-Olazarán et al., 2004).

2.3.2.1 Microorganismo: *Escherichia coli* BL21 (DE3)

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

Escherichia coli es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedador podemos mencionar: la rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), la fácil manipulación genética, que no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, la alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, la gran variedad de vectores de expresión y además posee diversas variantes mutantes (Jonasson et al., 2002). Los parámetros importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* incluyen eficiencia transcripcional y traduccional, estabilidad del vector de expresión y de los mRNA transcriptos, estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Fakruddin, Mohammad Mazumdar, Bin Mannan, Chowdhury, & Hossain, 2013).

La cepa BL21 (DE3) es deficiente en los genes *lon* y *ompT* que codifican para la síntesis de las proteasas Lon (citoplasmática) y OmpT (membrana externa), las cuales pueden degradar proteínas durante la purificación. Además, presenta altos niveles de expresión, con un sistema de inducción por lactosa o IPTG basado en el mecanismo de acción del operón Lac. La desventaja se asocia a la expresión basal de T7 RNA polimerasa, la cual es altamente selectiva y activa. Cuando se induce fuertemente, casi todos los recursos de la célula se dirigen hacia la producción de la proteína recombinante y los productos pueden corresponder hasta en un 50% a la proteína recombinante de interés (Rosano & Ceccarelli, 2014).

2.3.2.2 Plegamiento de proteínas

Las proteínas son sintetizadas como una cadena polipeptídica la cual es rápidamente plegada en una única estructura tridimensional. El correcto plegamiento es necesario para la función biológica de las proteínas, por eso el conocimiento de la relación estructura-función es uno de los desafíos de la ciencia desde la mitad del último siglo. Si bien el mecanismo de plegamiento se encuentra actualmente bastante descrito mediante el avance de técnicas físicas y químicas así como también computacionales, quedan cuestiones por resolver. Para destacar la importancia del conocimiento del plegamiento proteico, podemos referirnos a enfermedades tales como el Alzheimer, la fibrosis quística y la enfermedad de Parkinson, las cuales se encuentran asociadas a un fallo en el correcto plegado proteico (Uversky, Gillespie, & Fink, 2000; C M Dobson, 2001; Luk et al., 2012;).

Como decíamos, el plegamiento de proteínas es un tema poco conocido para la ciencia pues no se conoce hasta el momento un mecanismo definido de plegamiento. En este contexto, la energía libre (*energy landscape*) es una forma de describirlo. Durante el proceso de plegado, un polipéptido sufre muchos cambios conformacionales y hay una disminución significativa en la entropía configuracional del sistema a medida que se aborda el estado nativo. Para entender el plegamiento nos enfocamos en cómo las proteínas buscan el espacio conformacional. El proceso está acompañado de muchas reacciones microscópicas, cuya naturaleza está determinada por los detalles de la superficie de la energía. Por lo tanto, las características de la superficie energética de una cadena polipeptídica son la clave para una comprensión cuantitativa del plegado. Aunque los grados de libertad de una cadena polipeptídica permiten un número enormemente grande de configuraciones posibles, las "restricciones" en la energía disminuyen estas configuraciones visitadas en la reacción plegable a un número limitado. La comprensión de la superficie de energía libre ("paisaje") nos permite comprender el proceso de plegado. Un equilibrio entre la energía potencial y la entropía configuracional conduce a una barrera de la libre-energía que genere el comportamiento de plegamiento del doble-estado observado generalmente en pequeñas proteínas. La energía potencial disminuye a medida que el estado nativo es abordado y favorece el plegado, pero disminuir la entropía de la configuración es desfavorable al plegamiento (Mallamace et al., 2016) (Figura 2.5).

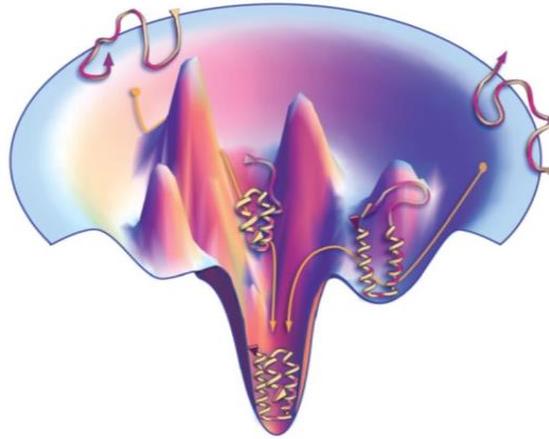


Figura 2.5: Modelo de paisaje energético (*energy landscape*). Se representan varias zonas elevadas, donde se observan estructuras de una proteína desplegadas, solo pocos puntos de baja energía con estructuras en distintos estados de plegamiento y en la zona más baja del embudo se puede observar la estructura plegada o nativa. Como se puede apreciar, el plegado ocurre mediante trayectorias alternativas. Tomado de Ken A Dill & MacCallum, 2012.

De esta manera diferentes caminos de plegamiento son posibles a lo largo del embudo con una energía mínima local que da lugar a los intermediarios de plegamiento. Estos intermediarios están generalmente en el camino hacia la conformación nativa, pero también pueden existir algunos que no, actuando como trampas de plegamiento (*folding traps*) (Christopher M Dobson, 2003).

2.3.2.2.1 El plegamiento de proteínas y la formación de puentes disulfuro

2.3.2.2.1.1 Plegado oxidativo

El estudio del plegamiento proteico se hace dificultoso ya que involucra la identificación y caracterización de los intermediarios que solamente se encuentran presentes en un corto lapso de tiempo así como lo es también la determinación de la particular formación de puentes disulfuro de una proteína (Figura 2.6).

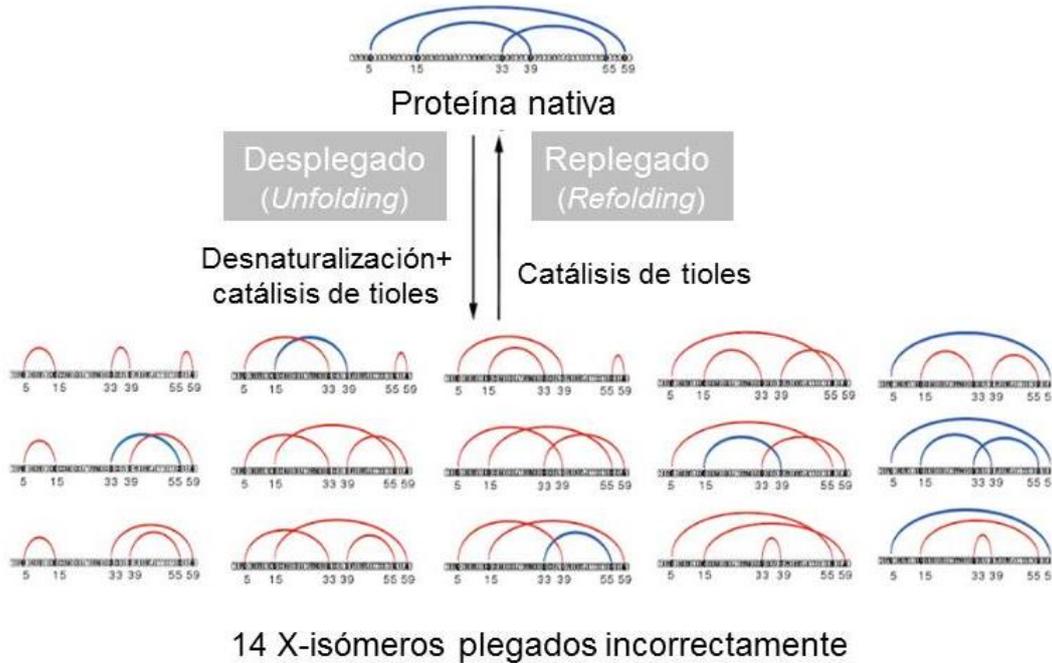


Figura 2.6: Formación de los X-isómeros producidos entre el desplegamiento y el replegamiento reversible de una proteína nativa (*scrambling*). Aquí se presenta una proteína con tres puentes disulfuro y la formación de los 14 posibles X-isómeros plegados incorrectamente. Adaptado del capítulo 5 del libro *Folding and Disulfide Proteins* (Chang 2011).

Una de las técnicas usadas para realizar este tipo de estudio es el plegado oxidativo (*oxidative folding*). Esta técnica tiene la ventaja de permitir la captura de los intermediarios mediante alquilación (irreversible) o acidificación (reversible) de la reacción de plegamiento. En el plegado oxidativo, las proteínas son inicialmente reducidas y desnaturalizadas totalmente y luego se impulsa el replegado en presencia de buffers seleccionados conteniendo diferentes agentes redox. Durante el proceso de plegamiento, los intermediarios son capturados en distintos tiempos de reacción, separados mediante cromatografía líquida de fase reversa de alto rendimiento (RP-HPLC), y luego la siguiente caracterización en términos de conexión de puentes disulfuro y estructura tridimensional (Arolas et al., 2007).

En el presente capítulo se presenta el aislamiento y caracterización de dos nuevos inhibidores de carboxipeptidasa A (mini proteínas estables tipo “knot”);

1. *el primero (imaPCI), proveniente de una variedad de papa andina (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* cv. *Imilla morada*), el cual fue expresado de forma recombinante, luego sometido a plegado oxidativo y evaluación de la*

actividad inhibitoria. Finalmente fue ensayado frente al EGF, hallando actividad protectora del mismo (Capítulo 2 – Parte 1).

- 2. el segundo (YBPCI), proveniente de morrón amarillo (Capsicum annuum L.), fue purificado en forma nativa mediante cromatografía de afinidad y caracterizado bioquímicamente encontrando resultados promisorios para investigaciones futuras: una marcada estabilidad a elevadas temperaturas, a pH extremos y a altas fuerzas salinas, así como también notable estabilidad bioquímica frente a ensayos de simulación gástrica in-vitro (Capítulo 2 – Parte 2).*

Capítulo 2 – Parte 1:

Clonado, expresión y caracterización de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* cv Imilla morada.

*En la primera parte del capítulo 2 se abordará el estudio de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de una variedad de papa andina denominada Imilla morada. El trabajo realizado en esta primera etapa fue el primero de mi Tesis doctoral, arrojando los primeros resultados alentadores sobre el aislamiento, caracterización bioquímica, clonado y expresión de inhibidores de proteasas y dando lugar a una publicación en la revista internacional *Phytochemistry* (“Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes”. Daniela Lufrano, Juliana Cotabarren, Javier García-Pardo, Roberto Fernandez-Alvarez, Olivia Tort, Sebastián Tanco, Francesc Xavier Avilés, Julia Lorenzo, Walter David Obregón. *Phytochemistry*, 2015, 120, 36-45). El trabajo fue complementado con la ayuda del Laboratorio de Proteómica e Ingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona a través de una pasantía de la Dra. Daniela Lufrano, de nuestro grupo de investigación, quien realizó tareas experimentales junto con la Dra. Julia Lorenzo (co-directora de mi Tesis doctoral), en el cual se realizaron los estudios proteómicos del nuevo inhibidor que previamente he aislado, clonado y caracterizado bioquímicamente. Aquí también se comenzaron los primeros ensayos sobre el rol*

protector de los inhibidores sobre el EGF, resultados que se mostrarán y analizarán en el Capítulo 4 de esta Tesis doctoral.

2.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1.1 Material vegetal

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, provenientes de la provincia de Jujuy, sobre la quebrada de Humahuaca, Cordillera de los Andes, Argentina (Figura 2.1.1). El nombre vulgar de estas especies es de “papas andinas”, y es muy común su cultivo en dichas zonas geográficas.

S. tuberosum es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia, de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura. El tubérculo es un tallo subterráneo y se halla engrosado a partir de los rizomas (otro tipo de tallo subterráneo), para funcionar como un órgano de almacenamiento de nutrientes pudiendo presentar una forma alargada, redondeada u oblonga (ovalada); su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo. En dichos tubérculos se encuentran almacenados, entre otras biomoléculas, inhibidores de proteasas (Milan D., 1987).



Figura 2.1.1: Tubérculos de *S. tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada.

2.2.1.2 Metodología

2.2.1.2.1 Clonado de un nuevo PCI

2.2.1.2.1.1 Diseño de cebadores (*primers*) específicos

El diseño de *primers* específicos se realizó a partir de secuencias nucleotídicas de las regiones más conservadas del mRNA codificante para el Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa extraído de *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* (PCI_t) (Villanueva et al., 1998), ampliamente estudiado en dicha familia. Estas regiones se hallan localizadas en las secuencias codificantes para el dominio “pre” de la proteína, mientras que la secuencia para el diseño del primer reverso fue obtenida de regiones conservadas de dominios no codificantes localizadas *downstream* (corriente abajo) al gen que codifica para el inhibidor. En la Tabla 2.1.1 se muestran los *primers* diseñados, indicando sus propiedades más relevantes:

Tabla 2.1.1: *Primers* diseñados a partir de dominios conservados del PCI_t.

<i>PRIMERS</i>	SECUENCIA (5'a 3')	PROPIEDADES DE LA ZONA QUE HIBRIDA		
		Tm (°C)	Long	% GC
Fw1	ATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGC	60,3	23 nt	43,5
Rv1	GCCACAAAGCATGTATCTAAGAC	56,5	23 nt	43,5

Fw1: *Primer forward* 1; Rv1: *Primer reverse* 1; Tm: Temperatura de *melting*; Long: Longitud; % GC: Contenido de residuos de Guanina y Citocina (%).

La Figura 2.1.2 muestra la secuencia del cDNA que codifica para el preproPCI_t, a partir de la cual se diseñaron los *primers* Fw1 y Rv1. En rojo se indica el segmento elegido de la secuencia conservada para el diseño del *primer* Fw1 y en verde la secuencia para el *primer* Rv1. También se subrayan el codón de inicio (ATG), el codón stop (TAA) y dos posibles secuencias de poliadenilación (AATAAA). El sitio de corte entre la región pre y el propéptido se indica con una flecha, mientras la secuencia correspondiente a la proteína madura se presenta dentro del recuadro negro.

```

1  GGTAGATTACATTATGGGAAGGTGGATTACATTATTTTTATTATTACCATGGCACAAAA 60
      M G R W I H I I F I I T M A Q K
61  ACTTACTATCCTTTTCACCATTCTCCTTGTGGTTATTGCTGTCATGACAATTCATTCTA 120
      L T I L F T I L L V V I A A H D N S F Y
      ↓
121  CTCCACGAAAATTCATGTGATGGCCCAAGATGTTGTTCTACCAACGGTGACGAACTTTT 180
      S T K I H V M A Q D V V L P T V T K L F
181  TCAGCAACACGCAGATCCAATTTGTAACAAACCTTGTAACACACACGATGATTGCTCTGG 240
      Q Q H A D P I C N K P C K T H D D C S G
241  TGCCTGGTTCTGTGTCAGGCATGTTGGAATTCGCGCGGACATGTGGGCCCTATGTTGGCGG 300
      A W F C Q A C W N S A R T C G P Y V G G
301  CGCCATGGCCATAGGCCTGTAATTTCAATATTATTGTCTCAAGTGTGTTCTTCTTTTCG 360
      A M A I G L *
361  ACTTTTAGTCCTAAGTGACCTAAGTGAATTCGAAAAGAAGAAAAAAGTATCTATGTCTT 420
421  AGATACATGCTTTGTGGCTAATAATAAATCAACTATGCTTGTGATTGATATAAATATG 480
481  TTACCAGGGTGAATATGTAATCACCAAATTAATAAAAAATCATCATGTTATGTGTGTT (A)n 539

```

Figura 2.1.2: Secuencia del cDNA que codifica para el preproPCl_α. Marcada en rojo se observa la región conservada para el diseño de Fw1 y en verde para Rv1.

2.2.1.2.1.2 Obtención del cDNA

2.2.1.2.1.2.1 Extracción del RNA Total

Con el fin de extraer el RNA de brotes de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, se utilizó el kit “*RNeasy Plant Mini Kit*” (Qiagen). Se cortaron aproximadamente 100 mg de brote del material elegido y se colocó en un mortero para luego ser llevado a -80 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se molió hasta la obtención de un polvo fino, se colocó en un *ependorf* de 1,5 ml y se le agregaron 450 µl de buffer RLT del kit conteniendo 4,5 µl de β-mercaptoetanol. Luego se procedió a la extracción siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante empleando cromatografía en microcolumnas. El RNA se eluyó con 50 µl de agua libre de RNasas.

2.2.1.2.1.2.2 RACE-PCR

La técnica RACE-PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends-Polimerase Chain Reaction*: amplificación rápida de extremos de cDNA-reacción en cadena de la polimerasa) fue diseñada para conocer la secuencia de los extremos de un RNA (Frohman, Dush, & Martin, 1988). Con este método se generan cDNAs (obtenidos por PCR) que incluyen copia de la secuencia del extremo 3' o 5' del RNA (3' RACE o 5' RACE, respectivamente). La estrategia consiste en añadir una secuencia diana (secuencia inespecífica) en el extremo del cDNA que se desea obtener para luego, empleando además un *primer* específico, amplificar una secuencia del gen buscado.

La 3' RACE-PCR consta de una primera etapa de retrotranscripción (RT) en la que se adiciona la secuencia diana unida a un homopolímero polidT y de una segunda etapa en la que se amplifican por PCR los cDNAs específicos utilizando dos *primers*, uno correspondiente a la secuencia del gen buscado y otro a la secuencia diana.

2.2.1.2.1.2.2.1 Reacción de Retrotranscripción (RT)

Para la obtención de la primera cadena de cDNA se diseñó un *primer* con una diana en el extremo 5' seguida del polidT en el extremo 3'. Dicho oligonucleótido se denominó R₀R₁polidT.

Tabla 2.1.2: Secuencia del primer R₀R₁polidT.

PRIMER	SECUENCIA (5'a 3')
R ₀ R ₁ polidT	CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGC(T) ₁₄

Como paso previo a la reacción de RT, el RNA fue sometido a tratamiento con DNasaI (Fermentas), seguido de un tratamiento térmico (30 min a 37 °C, 10 min a 65 °C) para provocar la ruptura de su estructura secundaria. La reacción se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-312, con un programa de 10 min a 65 °C, 60 min a 42 °C y 10 min a 70 °C. Como control negativo de la retrotranscripción no se agregó muestra de RNA, sustituyendo ese volumen por H₂O libre de RNasa.

Tabla 2.1.3: Mezcla de reacción para el tratamiento con DNasal.

MEZCLA DE REACCIÓN DEL TRATAMIENTO CON DNasal	
Muestra de RNA	10 µl
H ₂ O libre de RNasa	6 µl
Buffer (10 X, c/ MgCl ₂)	2 µl
DNasal (1 U/µl)	2 µl
EDTA (50 mM)	2 µl

Tabla 2.1.4: Mezcla de reacción de la transcripción reversa.

MEZCLA DE REACCIÓN DE RT	
Muestra de RNA tratado	5 µl
H ₂ O libre de RNasa	17,5 µl
RoR1polidT (10 µM)	5 µl
Buffer (5X, c/ MgCl ₂ 20 mM)	10 µl
dNTPs (2.5 mM c/u)	5 µl
Inhibidor de RNasa 40 U/µl	1,25 µl
H ₂ O libre de RNasa	3,75 µl
Retrotranscriptasa (200 U/µl)	2,5 µl

2.2.1.2.1.2.2.2 Reacción de PCR

Para aislar los productos específicos de la reacción se realizó una PCR utilizando los *primers* específicos Fw1 y Rv1. La reacción se llevó a cabo utilizando el mismo termociclador que se empleó anteriormente y el siguiente programa: [1x (5 min a 95 °C), 27x (30 seg a 94 °C, 30 seg a 56.5 °C, 25 seg a 72 °C), 5x (30 seg a 94 °C, 30 seg a 59 °C, 25 seg a 72 °C), 1x (10 min a 72 °C), 24x (1 h a 4 °C)]. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y visualizados mediante el empleo del colorante Gel Red (Biotium).

Tabla 2.1.5: Mezcla de reacción de la PCR para clonado.

MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR	
H ₂ O	25,6 µl
Buffer (10 X)	5 µl
dNTPs (10 mM c/u)	5 µl
<i>Primer Fw1</i> (10 µM)	4 µl
<i>Primer Rv1</i> (10 µM)	4 µl
DNA Polimerasa FastStart (5U/µl)	0,4 µl
Muestra	5 µl

2.2.1.2.1.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron utilizados para el análisis de las muestras conteniendo DNA. La agarosa tiene menor poder de resolución que la poliacrilamida, pero mayor rango de separación (50 pb hasta algunos megabases de longitud). Pequeños fragmentos (20 pb – 20000 pb) son mejor resueltos en geles horizontales de agarosa con un campo eléctrico de fuerza y dirección constante.

Se utilizaron dos equipos diferentes de Bio-Rad, Sub-Cell GT para geles de 15x20 cm y Mini Sub-Cell GT para geles de 7x10 cm. La fuente utilizada fue Major Science MP-250V.

2.2.1.2.1.3.1 Preparación de las muestras

A las muestras de DNA, previamente a ser sembradas en el gel, se les añadió una décima parte en volumen de buffer de muestra 10X.

Tabla 2.1.6: Preparación de buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 50X.

BUFFER TRIS-ACÉTICO-ÉDTA (TAE) 50X	
Tris base	242 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
Agua MilliQ c.s.p.	500 ml

Tabla 2.1.7: Preparación de buffer de muestra 10X.

BUFFER MUESTRA 10X	
Buffer TAE (50 X)	1 ml
Glicerol	5 ml
Orange G	15 mg
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml

2.2.1.2.1.3.2 Preparación de los geles

Los geles fueron preparados empleando el bastidor plástico correspondiente al equipo utilizado en cada caso. La solución fue preparada de la siguiente manera:

Tabla 2.1.8: Preparación de geles de agarosa 1,5% para celdas grandes y chicas.

GELES DE AGAROSA 1,5%	ESPESOR 0,75 cm CELDA CHICA	ESPESOR 0,75 cm CELDA GRANDE
Agarosa	0,45 g	1,35 g
Buffer TAE (1X)	30 ml	90 ml
Calentar a ebullición hasta clarificación. Enfriar hasta 60 °C		
Colorante Gel Red	3 µl	9 µl

Luego de verter esta mezcla en la placa se dejó enfriar hasta su gelificación. Se utilizaron peines de 15 calles con capacidad de 9,7 µl para los geles en celda chica, mientras que para los geles en celda grande se utilizaron peines de 15 calles con capacidad de 20,7 µl.

2.2.1.2.1.3.3 Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló a voltaje constante manteniendo una relación de 10 mV por cada cm de longitud de gel, empleando buffer de corrida TAE 1X (Tris-acético-EDTA).

2.2.1.2.1.4 Purificación de fragmentos de DNA

En base a los resultados obtenidos en la electroforesis de los productos de PCR, se realizó la purificación del DNA. Las bandas de DNA seleccionadas fueron recortadas del gel de agarosa bajo luz UV y tratadas con un kit de extracción de DNA (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas). Se pesó cada banda cortada y se le agregó 1:1 en volumen de “Binding Buffer”, continuando con el protocolo descrito por el fabricante hasta obtener una solución final de DNA en 50 µl de agua estéril.

2.2.1.2.1.5 Clonado del cDNA

El cDNA aislado fue clonado utilizando una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue competentes (Sambrook *et al.*, 1989) y el vector pGEM-T Easy (Promega).

2.2.1.2.1.5.1 Medios de cultivo utilizados

2.2.1.2.1.5.1.1 Medios de cultivo líquidos

Tabla 2.1.9: Preparación de medio de cultivo 2YT.

MEDIO 2YT	
Bacto-Triptona	16 g
Bacto-extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T ° ambiente	

Tabla 2.1.10: Preparación de medio de cultivo LB líquido.

MEDIO LURIA-BERTANI (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T ° ambiente	

2.2.1.2.1.5.1.2 Medios de cultivo sólidos

La preparación de las placas de cultivo se realizó en condiciones de esterilidad. Cuando la temperatura del medio de cultivo (Tabla 2.1.11) alcanzó los 60 °C se cargaron las placas de Petri (9 cm de diámetro) con aproximadamente 20 ml de medio fundido cada una y se dejaron solidificar cerca de mechero. Las cajas fueron luego tapadas, colocadas durante 30 min en estufa a 37 °C y conservadas a 4 °C por un período no mayor a 15 días.

Tabla 2.1.11: Preparación de medio de cultivo LB sólido.

MEDIO LURIA-BERTANI (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Enfriar a 60 °C en estufa antes de plaquear.	

2.2.1.2.1.5.1.3 Reactivos adicionales

Tabla 2.1.12: Preparación de solución de X-Gal 20 mg/ml.

SOLUCIÓN DE 5-Br-4-Cl-3-Indol-β-D-galactósido 20 mg/ml (X-Gal)	
X-Gal, Roche	400 mg
N, N'-dimetilformamida, Sigma c.s.p.	20 ml
Conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 2.1.13: Preparación de solución de Ampicilina 100 mg/ml.

SOLUCIÓN DE AMPICILINA (100 mg/ml)	
Ampicilina, Sigma	1 g
Agua MilliQ, c.s.p.	10 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Tabla 2.1.14: Preparación de solución de IPTG 0,1 M.

SOLUCIÓN DE Isopropil-β-D-tiogalactósido 0,1 M (IPTG*)	
IPTG, Roche	1,19 g
Agua MilliQ, c.s.p.	50 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

* IPTG es un análogo no fermentable de la lactosa que inactiva al represor del operón lacZ.

2.2.1.2.1.5.2 Obtención de células *E. coli* competentes

Se procedió según el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Se partió de un cultivo puro en etapa de crecimiento exponencial, para lo cual se inocularon las células de una colonia de *E. coli* aislada de un cultivo en placa LB en 5 ml de medio de cultivo 2YT (Tabla 2.1.9) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche con agitación a 250 rpm. Una alícuota de 100 μ l de este cultivo fue inoculada en 10 ml de medio fresco y se hizo crecer en las mismas condiciones hasta una densidad óptica de 0.6 (DO 600nm).

El cultivo obtenido en estas condiciones se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 3000 rpm. Trabajando bajo campana de flujo se descartó el sobrenadante y se suspendieron las células en 5 ml de CaCl₂ 0,05 M estéril. La suspensión celular se mantuvo nuevamente en baño de hielo durante 10 min, se centrifugó como se indicó anteriormente y luego de descartar el sobrenadante asépticamente, se resuspendieron cuidadosamente las células en 1 ml de CaCl₂ estéril 0,05 M preenfriado a 4 °C y se almacenó en heladera a 4 °C durante toda la noche. Se tomaron alícuotas de 100 µl y a cada una de ellas se le adicionó 23 µl de glicerol 80% (v/v) estéril. Cada alícuota de suspensión de células competentes fue almacenada a -80 °C hasta su uso.

2.2.1.2.1.6 Clonación

2.2.1.2.1.6.1 Vector de clonado

El vector pGEM-T Easy contiene los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP6, flanqueando una zona de clonado múltiple dentro de la región codificante de la enzima β-galactosidasa (lac Z), lo que permite secuenciar el inserto introducido en el vector empleando los *primers* correspondientes. La zona de clonado múltiple incluye sitios de digestión para diferentes enzimas de restricción, lo que permite la liberación de insertos. En cada uno de sus extremos lleva además una timidina 3' terminal, lo que aumenta la eficiencia de ligación con productos de PCR obtenidos con DNA polimerasas sin actividad de 3'→5' exonucleasa, las que suelen añadir una adenina 3' terminal. El vector posee además una región que codifica para la β-lactamasa (Amp^r), con lo que las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy.

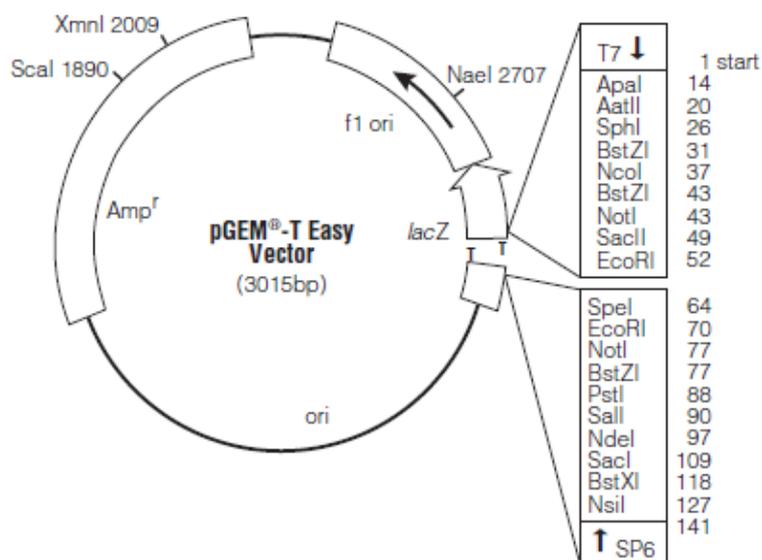


Figura 2.1.3: Vector pGEM-T Easy (Promega).

Cuando se liga un inserto al vector se produce una interrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β -galactosidasa sobre el X-Gal hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

2.2.1.2.1.6.2 Ligación

Los fragmentos de DNA seleccionados y purificados (cfr. 2.2.1.2.1.4) fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega).

Tabla 2.1.15: Mezcla de reacción de la ligación.

MEZCLA DE LIGACIÓN	
Buffer de ligación (2X)	5 μ l
Vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ l)	0,5 μ l
DNA	3,5 μ l
DNA ligasa T4 (3 U/ μ l, Promega)	1 μ l
Incubar a 4 °C toda la noche.	

2.2.1.2.1.6.3 Transformación y selección de clones

La transformación se realizó agregando 5 µl de la mezcla de ligación (cfr. 2.2.1.2.1.6.2) a una alícuota de 50 µl de *E. coli* XL1-Blue competentes (cfr. 2.2.1.2.1.5.2) siguiendo un protocolo de shock térmico (30 min en hielo, 45 seg a 42 °C, 5 min en hielo).

A la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación se le añadió 1 ml de medio LB (Tabla 2.1.10) y se incubó durante 1 hora a 37 °C en estufa de cultivo, con agitación a 250 rpm. A continuación se centrifugó 1 min a 3000 rpm; y a partir de aquí se trabajó en condiciones de esterilidad cerca de mechero. Se desecharon 900 µl de sobrenadante, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en el sobrenadante restante y trasvasadas con pipeta automática a una placa de Petri con medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (112 µg/ml) y X-Gal (80 µg/ml) (cfr. 2.2.1.2.1.5.1.3). Utilizando una espátula de Drigalsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad en cercanías de mechero, se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C.

La selección de los clones se basa en las observaciones que se describen en la siguiente tabla:

Tabla 2.1.16: Observaciones a realizar para la selección de clones.

SELECCIÓN DE CLONES	
Células sin vector	No crecen
Células con vector sin inserto	Colonias azules
Células con vector con inserto	Colonias blancas

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo *ependorf* para realizar la reacción de PCR (cfr. 2.2.1.2.1.2.2.2) utilizando los *primers* específicos Fw1 y el Rv1 (Tabla 2.1.1). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 2.2.1.2.1.3).

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan conservar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados

anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3,5 ml de medio de cultivo LB con 50 µg/ml de ampicilina (cfr. 2.2.1.2.1.5.1). Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

2.2.1.2.1.6.4 Glicerinado de los clones

Se tomó una alícuota de 400 µl de cada cultivo creciendo en fase exponencial a la que se le añadió 92 µl de glicerol 80% (v/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

2.2.1.2.1.7 Secuenciación del cDNA clonado

2.2.1.2.1.7.1 Aislamiento del DNA plasmídico

Se utilizó el kit de extracción “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Fermentas). La técnica consiste en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el DNA plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y es eluido con agua MilliQ estéril.

Para obtener el DNA plasmídico se tomó una alícuota de 1,5 ml proveniente del cultivo de interés (cfr. 2.2.1.2.1.6.3). Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 seg y se eliminó el sobrenadante. Las células obtenidas fueron lisadas con el buffer de lisis y en el mismo tubo se agregaron los buffers de precipitación, eliminando el sólido por centrifugación. El sobrenadante fue pasado a través de la columna cromatográfica quedando retenido el DNA plasmídico. Luego de los pasos de lavado se realizó la elución con agua MilliQ estéril.

2.2.1.2.1.7.2 Digestión con enzimas de restricción

Esta etapa fue realizada con el objeto de confirmar la presencia de insertos específicos dentro del vector en cuestión. Se utilizó el protocolo descrito a continuación.

Tabla 2.1.17: Mezcla de reacción para la digestión con NotI.

DIGESTIÓN DE DNA CON NotI	
Buffer Multi-Core (10 X)	2 μ l
BSA (10 μ g/ μ l)	0,2 μ l
NotI (Fermentas)	0,5 μ l
Muestra de DNA	1 μ l
Agua MilliQ	16,3 μ l
Incubar en estufa a 37 °C durante 3 horas.	

Se analizaron los productos de la digestión por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 2.2.1.2 1.3). Recordando el mapa de restricción del vector de clonado, el empleo de la enzima NotI produce un corte a cada lado del cDNA inserto en el vector, por lo tanto su empleo produciría la liberación de dicho fragmento.

2.2.1.2.1.7.3 Secuenciación del DNA

Las muestras fueron sometidas a secuenciamiento automático bajo el servicio de Macrogen Inc., Corea, empleando como material de partida la construcción descrita anteriormente y efectuando las amplificaciones pertinentes valiéndose de los *primers* específicos de los promotores T7 y SP6, ambos incluidos en el vector pGEM-T Easy (cfr. 2.2.1.2.1.6.1).

2.2.1.2.1.7.4 Análisis de las secuencias de los cDNAs

Las secuencias obtenidas de los cDNAs de los clones fueron analizadas con un software de alineamiento [Clustal-W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994)] para obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso fue traducida en los seis marcos de lectura con el software *Translate Tool* disponible en el servidor de ExpASy para poder identificar la presencia de elementos conservados en la secuencia aminoacídica de familias conocidas de inhibidores de carboxipeptidasa A. Al mismo tiempo se hizo una búsqueda por PSI-BLAST utilizando la base de datos NCBI nr y restringiéndola al reino *Viridiplantae*.

2.2.1.2.2 Expresión del nuevo PCI

2.2.1.2.2.1 Obtención de la construcción de expresión

La expresión de una proteína heteróloga requiere la inserción del gen en un vector de expresión, para introducirlo en el genoma de *E. coli*. El vector de expresión utilizado fue el pIN-III-OmpA3, que contiene el promotor del operón lac, en el cual se inserta el gen que codifica para la proteína de interés. Posee además un fragmento de DNA que codifica para el péptido señal OmpA de modo que la proteína expresada sea secretada al medio extracelular y presenta la construcción de tres sitios únicos de clonado en tres marcos de lectura diferentes (Ghrayeb et al., 1984).

2.2.1.2.2.1.1 Aislamiento del cDNA del nuevo PCI en el vector de expresión

Previo a la ligación al vector de expresión, el nuevo PCI fue amplificado utilizando los *primers* Fw2 y Rv2, cuyo diseño y fin de utilización será explicado en la sección 2.2.2.2.1.

En la Tabla 2.1.18 se muestran los *primers* diseñados, resaltando la zona de hibridación e indicando sus propiedades más relevantes.

Tabla 2.1.18: *Primers* diseñados a partir de las regiones N y C-terminal del nuevo PCI. En gris se muestra la zona de hibridación de cada *primer*.

PRIMER	SECUENCIA (5'a 3')	PROPIEDADES DE LA ZONA QUE HIBRIDA		
		Tm	Long	%GC
Fw2	TCAGGGATCCAAATTTGTAACAAACCTTGTA ^{AAACACAC} ACAC BamHI	61,5	28 nt	29
Rv2	GTCAGAATTCCTAGCCAACATAGGGCCCACATG EcoRI Stop	61,5	28 nt	29

La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 2.1.19.

Tabla 2.1.19: Mezcla de reacción de PCR para expresión recombinante.

MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR	
H ₂ O	24,2 µl
Buffer (5X)	10 µl
dNTPs (10 mM c/u)	5 µl
Primer Fw2 (10 µM)	4 µl
Primer Rv2 (10 µM)	4 µl
DNA Polimerasa GoTaq (5 U/µl)	0,3 µl
Muestra	2,5 µl

La reacción se llevó a cabo utilizando el siguiente programa: [1x (2 min a 94 °C) 27x (15 seg a 94 °C, 30 seg a 47,4 °C, 30 seg a 72 °C) 1x (2 min a 72 °C) 24x (1 hora a 4 °C)]. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (cfr. 2.2.1.2.1.3) y purificados utilizando el kit de extracción de DNA (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas) (cfr. 2.2.1.2.1.4).

2.2.1.2.2.1.2 Clonado del cDNA del nuevo PCI

Una alícuota del DNA purificado fue ligada al vector de clonado pGEM-T Easy (cfr. 2.2.1.2.1.6.1). Los productos de ligación fueron clonados en *E. coli* XL1-Blue siguiendo el protocolo descrito en cfr. 2.2.1.2.1.6.2. Los clones transformados se seleccionaron haciéndolos crecer en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (112 µg/ml) y X-Gal (80 µg/ml) (cfr. 2.2.1.2.1.5.1) en estufa de cultivo a 37 °C durante toda la noche. El vector pGEM-T Easy le confiere a las células resistencia a ampicilina, por lo que sólo aquellas células que contengan al vector crecerán en este medio. La selección de clones recombinantes se efectúa de acuerdo a la coloración blanca/azul de las colonias (cfr. 2.2.1.2.1.6.3).

2.2.1.2.2.1.3 Ligación del cDNA del nuevo PCI al vector de expresión

El aislamiento del DNA plasmídico se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en cfr. 2.2.1.2.1.7.1. Una alícuota del DNA de uno de los clones seleccionados fue digerida con las enzimas EcoRI y BamHI (sitios de corte del vector pIN-III-OmpA3 readaptado para nuestra expresión, ver explicación en resultados). Dado que ambas

utilizan el mismo buffer de reacción, la digestión se realizó en una sola etapa (digestión doble). Al mismo tiempo se hizo la digestión doble de la construcción *PCI/pIN-III-OmpA3* con las mismas enzimas de restricción.

Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% (cfr. 2.2.1.2.1.3) y posteriormente fueron extraídos del gel (cfr. 2.2.1.2.1.4). Finalmente se obtuvo la construcción de expresión del nuevo *PCI/pIN-III-OmpA3* mediante la ligación con T4 DNA Ligasa (cfr. 2.2.1.2.1.6.2) de los productos de digestión.

2.2.1.2.2.2 Clonado y expresión de la proteína recombinante usando el vector *pIN-III-OmpA3*

Los productos de ligación fueron transformados químicamente en *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo el protocolo descrito en cfr. 2.2.1.2.1.6.3. Los clones transformados se seleccionaron haciéndolos crecer en placas de LB (cfr. 2.2.1.2.1.5.1) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) e IPTG (112 µg/ml) en estufa de cultivo a 37 °C durante toda la noche.

2.2.1.2.2.3 Producción de la proteína recombinante

2.2.1.2.2.3.1 Medios de cultivo utilizados

2.2.1.2.2.3.1.1 Medios de cultivo líquidos

Tabla 2.1.20: Preparación de medio de cultivo BAT.

MEDIO BAT	
Sales 10X M9	100 ml
MgSO ₄ (1 M)	1 ml
CaCl ₂ (0.1) M	3 ml
Tiamina (1 M)	1 ml
Glicerol (80% v/v)	6,25 ml
Oligoelementos	1 ml
Cas aas (20%)	10 ml
Agua desionizada c.s.p	1 l

Cada una de las disoluciones se esterilizan por separado en autoclave, a excepción de la tiamina que se filtra (en membrana de 0,22 μm).

Tabla 2.1.21: Composición de sales para el medio BAT.

SALES 10X M9	
Na_2HPO_4	71,8 g
KHPO_4	30 g
NH_4Cl	10 g
NaCl	5 g
Agua desionizada c.s.p	1 l
Se ajusta el pH a 7.2 usando NaOH y se autoclava	

Tabla 2.1.22: Composición de oligoelementos para el medio BAT.

Oligoelementos	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mg/l
Na_2MoO_4	2 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
AlCl_3	1 mg/l
H_3BO_3	0,5 mg/l

2.2.1.2.2.3.2 Expresión en *E. coli*

Algunas de las colonias blancas obtenidas fueron aisladas con un palillo de madera estéril e introducidas en un tubo con 20 ml de medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ e incubado a 37 °C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. Finalizado el crecimiento del preinóculo, se diluyeron 10 ml en 1 l de medio mínimo de expresión (dilución 1:100) (cfr. 2.2.1.2.2.3.1), con crecimiento en estufa de cultivo a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0,6 (DO a 600nm). Se agregó luego IPTG hasta alcanzar concentración final 0,2 mM, continuando con el crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo durante 20 horas. Transcurrido

este tiempo se centrifugó 20 min a 4 °C y 6000 rpm con el objeto de separar los restos celulares.

2.2.1.2.2.3.3 Reordenamiento de los puentes disulfuro

Una vez colectado el sobrenadante conteniendo la proteína madura del nuevo PCI, se procedió al reordenamiento de los puentes disulfuro mediante la técnica de “*reshuffling*” citada en la introducción (cfr. 2.3.2.2.1). Este proceso se realizó en presencia de cisteína 4 mM y cistina 2 mM, ajustando a pH 8,5 con NaOH para posterior incubación de 3 horas a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4 °C, con agitación (Chang, Canals, Schindler, Querol, & Avilés, 1994).

2.2.1.2.2.3.4 Clarificación y centrifugado

Luego del *reshuffling*, se ajustó el pH en un valor de 4,0 con ácido cítrico, se incubó toda la noche a 4 °C y se colectó el sobrenadante por centrifugado a 7000 rpm durante 20 minutos, dando inicio a la fase de purificación.

2.2.1.2.3 Purificación del nuevo PCI

Al finalizar cada paso de purificación se eligió como método de seguimiento del grado de pureza de la muestra, la realización de una cromatografía en fase reversa a alta presión (RP-HPLC). Además de ser útil para este propósito, dicha técnica fue elegida como último paso de purificación.

2.2.1.2.3.1 Cromatografía de intercambio iónico

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio catiónico empleando una resina HST-*Streamline* y adaptadores FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden), desarrollada en un equipo de purificación ÄKTA, GE. En este proceso se cargaron 15 ml de muestra a la columna y se equilibró con buffer citrato de sodio 100 mM de pH 4. A continuación se aplicó un gradiente de pH desde 4 a 8,5 (cromatoenfoco) utilizando citrato de sodio 20 mM de pH 4 y fosfato de sodio 100 mM de pH 8,5. La cromatografía fue monitoreada espectrofotométricamente por

medidas de absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la cual absorben los aminoácidos aromáticos de las proteínas.

2.2.1.2.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal

El segundo paso de purificación se realizó por cromatografía en fase reversa a presión normal utilizando una resina de C18 (Sep-Paks C18, Waters) que fue activada con 100% de acetonitrilo y luego cargada con 34 ml del material eluido en el paso anterior. En primer lugar se lavó la columna con agua y a continuación se realizó un gradiente escalonado de cuatro volúmenes de columna cada uno utilizando como eluyentes acetonitrilo 10%, isopropanol 30% y acetonitrilo 100% respectivamente. Cada fracción eluída se secó en SpeedVac y finalmente se resuspendió en TFA 0,1%.

2.2.1.2.3.3 Cromatografía en fase reversa a alta presión

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía en fase reversa a alta presión, RP-HPLC. Se empleó una columna Nova-Pak C18 (Waters) de 150 x 3.9 mm. El material de relleno estaba formado por un soporte de sílice que contenía cadenas hidrocarbonadas de 4 a 8 átomos de carbono. La elución de la proteína se efectuó empleando un gradiente creciente de 20-40% de acetonitrilo en 30 min bajo un flujo de 0,7 ml/min. La elución fue monitoreada espectrofotométricamente por medidas de absorbancia a 280 nm. Como mencionamos anteriormente, esta cromatografía también se empleó al finalizar cada paso de purificación para hacer el seguimiento de la muestra.

2.2.1.2.4 Caracterización del nuevo PCI

2.2.1.2.4.1 Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A

Para verificar la presencia de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) en la proteína expresada, se incubaron 800 µl de buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,4 con NaCl 0,2 M, 100 µl de muestra y 7,5 µl de la solución de CPA durante 3 minutos a 37 °C. Seguidamente se agregaron 2,5 µl del sustrato específico N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH, de color naranja, en concentración 10 mM (Mock, Liu,

& Stanford, 1996). La reacción se llevó a cabo efectuando el registro de actividad durante 3 min mediante el descenso de la absorbancia a 350 nm durante 120 seg, considerando que la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja.

2.2.1.2.4.2 Caracterización proteómica

2.2.1.2.4.2.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF

La masa molecular del inhibidor así como su grado de pureza fueron determinados por espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight*). Para ello se usó un espectrómetro de masas UltrafleXtreme MALDI-TOF de Bruker Daltonics, equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm; dicho equipo pertenece al Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), España.

Para el análisis, se mezcló 1 µl de muestra con 1 µl de solución saturada de ácido α -4-hidroxicinámico (HCCA) como matriz y se depositó sobre una placa de siembra (MP 384 Ground Steel, Bruker), dejando secar a temperatura ambiente. Se analizó la muestra usando un método en modo reflectrón y un voltaje de aceleración de 25 kv. La calibración se realizó con calibradores peptídicos externos (mezcla de patrones Brucker Daltonik GmbH).

2.2.1.2.4.2.2 PMF MALDI-TOF

2.2.1.2.4.2.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina. Para alcanzar una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, se emplea un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C), y un gel de resolución (16.5% T y 3% C). Otra ventaja de este sistema, si se lo

desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias.

2.2.1.2.4.2.2.1.1 Preparación de las muestras

El producto de expresión se redisolvió en buffer de muestra 6X para electroforesis y se llevó a ebullición durante 5 min.

Tabla 2.1.23: Preparación de buffer de muestra 6X.

BUFFER DE MUESTRA 6X	
Tris	9,42 g
SDS	12 g
Mercaptoetanol	30 ml
Glicerol	48 ml
Azul de Bromofenol	12 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100 ml

2.2.1.2.4.2.2.1.2 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:

Tabla 2.1.24: Preparación de buffer del gel.

BUFFER DEL GEL	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
Llevar a pH 8,45 con HCl 1 M	
AD c.s.p.	100 ml

Tabla 2.1.25: Preparación de gel de apilamiento.

GEL DE APILAMIENTO (4% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	0,4 ml
Buffer del gel	1,250 ml
AD	3,4 ml
PSA 10%	0,04 ml
TEMED	0,007 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100 ml

Tabla 2.1.26: Preparación de gel de resolución.

GEL DE RESOLUCIÓN (16,5% T, 3% C)	
Acril-Bis (49,5:3)	3,3 ml
Buffer del gel	3,3 ml
AD c.s.p.	3,4 ml
PSA 10%	0,04 ml
TEMED	0,007 ml

2.2.1.2.4.2.2.1.3 Aplicación de muestras y condiciones de corrida

Se aplicó la muestra y en los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Tabla 2.1.27: Preparación de buffer anódico 2M.

BUFFER ANÓDICO 2M	
Tris	24,2 g
Llevar a pH 8,9 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	1000 ml

Tabla 2.1.28: Preparación de buffer catódico 1M.

BUFFER CATÓDICO 1M	
Tris	12,1 g
Tricina 0,1 M	17,9 g
SDS 0,1%	1 g
AD, c.s.p.	1000 ml

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.

2.2.1.2.4.2.2.1.4 Fijación y Tinción

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

Tabla 2.1.29: Preparación de solución fijadora.

SOLUCION FIJADORA	
Ácido acético glacial	100 ml
Metanol	400 ml
AD, c.s.p.	1000 ml

Tabla 2.1.30: Preparación de solución colorante.

SOLUCION COLORANTE	
Ácido acético glacial	100 ml
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg

AD, c.s.p.	1000 ml
------------	---------

Tabla 2.1.31: Preparación de solución decolorante.

SOLUCION DECOLORANTE	
Ácido acético glacial	100 ml
AD, c.s.p.	1000 ml

2.2.1.2.4.2.2.2 Digestión trípica

La banda seleccionada de la electroforesis anterior se cortó en trozos pequeños que se colocaron en un tubo *ependorf*, se lavaron con agua MilliQ y acetonitrilo al 50% varias veces para remover el colorante, y se secaron al vacío. Los fragmentos del gel se cubrieron con una solución de DTT 20 mM por 20 min a 60 °C, se centrifugaron y lavaron con acetonitrilo durante 5 min. Los fragmentos se incubaron en una solución de iodoacetamida 25 mM por 15 min a 37 °C y oscuridad, y se lavaron con agua MilliQ y acetonitrilo alternativamente. La digestión trípica se realizó con tripsina (4 ng/μl) en buffer NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,5 durante 12 h a 37 °C. Los péptidos resultantes se recuperaron por extracción con acetonitrilo al 50% (v/v) y luego fueron secados en un SpeedVac, y fueron finalmente redisoluertos en TFA al 0,2% (v/v).

2.2.1.2.4.2.2.3 Determinación de la huella peptídica

El inhibidor recombinante purificado se analizó por huella peptídica (*peptide mass fingerprinting*, PMF), previa digestión trípica de una banda electroforéticamente homogénea (Obregón et al., 2009). Los péptidos se disolvieron en 5 ml de TFA 0,1% (v/v) y analizaron por MALDI-TOF MS usando una matriz de HCCA. La identificación del mapa trípico se analizó usando el programa MASCOT (<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 m.2; (4) Taxonomía, *Viridiplantae*; (5) Modificaciones variables, Metilcarbamida (C), Oxidación (M); (6) Valores de masas, monoisotópico; (7) Tolerancia del peso de la proteína, ± 100 ppm; (8) Carga de la proteína, +1.

Adicionalmente, la secuencia correspondiente al cDNA del nuevo inhibidor se sometió a digestión trípica teórica empleando el software SequenceEditor 3.1 (Bruker Daltonics, Biotoools 3.1) y comparó con la obtenida empíricamente.

2.2.1.2.4.2.3 Secuenciación de péptido interno e identificación por PMF-MALDI-TOF/TOF

Para realizar la espectrometría MS/MS, los iones generados por el proceso de PMF-MALDI-TOF/MS se aceleraron a 8 kV a través de una red a 6,7 k. Los iones pasan a través de un dispositivo temporizado ion-selector (*time-ion-selector*) que es capaz de seleccionar un péptido a partir de una mezcla de péptidos a diferentes valores de m/z para su posterior fragmentación en la celda de colisión. En este caso fue seleccionado por el *timed-ion-selector* el péptido con m/z 1596,7 Da; el mismo pasa a través de una lente de retardo donde se desaceleran los iones y luego pasa a la celda de colisión, que se hizo funcionar a 7 kV. La fragmentación se realiza en el modo de descomposición metaestable sencilla (sin gas de colisión y con el conjunto de la energía de colisión a 1 kV). De esta manera se obtiene un espectro de fragmentación utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF/ MS-MS. Finalmente, se procedió al análisis de los espectros de fragmentación de los péptidos mediante comparación con la información disponible en la base de datos utilizando la herramienta de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Los algoritmos matemáticos usados por este servicio comparan todos los espectros de todas las proteínas que estén disponibles.

2.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.2.1 Clonado y secuenciamiento del nuevo PCI

2.2.2.1.1 Aislamiento del cDNA

Se extrajo el RNA total a partir de brotes de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada con el propósito de obtener el cDNA que codifica para el Inhibidor de Carboxipeptidasa de Papa (PCI_a) mediante Transcripción Reversa (RT) y 3' RACE-PCR.

En primer término se obtuvo la primera cadena de cDNA por RT empleando el primer R₀R₁polidT. Luego, utilizando como molde la cadena de cDNA obtenida en el paso anterior y los *primers* específicos de secuencia Fw1 y Rv1, se obtuvieron por PCR productos del tamaño esperado para moléculas de cDNA de unos 360 pares de bases aproximadamente (120 residuos de aminoácidos, ver Figura 2.1.2), que codifican para los últimos 7 aminoácidos de la región pre y para el proPCI_a completo, denominada a partir de ahora “secuencia parcial de preproPCI_a”.

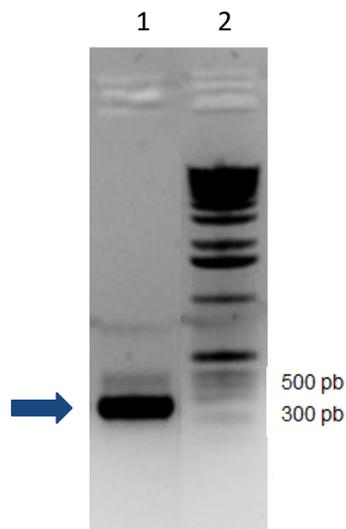


Figura 2.1.4: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT, mediante empleo de *primers* Fw1 y Rv1. Calle 1: cDNA amplificado de muestra de brote de *S. tuberosum* ssp. *Andigenum* var. Imilla morada. Calle 2: Patrón de peso molecular Roche X.

La Figura 2.1.4 corresponde a la electroforesis en agarosa 1,5% de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT. En la calle 1 se observan bandas de 300 – 400 pb que corresponden al tamaño esperado para el cDNA que codifica para el preproPCl_a parcial.

2.2.2.1.2 Clonado del cDNA del preproPCl_a parcial

El cDNA proveniente de las bandas seleccionadas de la electroforesis anterior fue extraído del gel y purificado. Posteriormente fue ligado al vector de clonado pGEM-T Easy empleando T4 DNA ligasa, para luego realizar la transformación de células *E. coli* XL1-“Blue” competentes.

En la Figura 2.1.5 se esquematiza el procedimiento de clonado empleado.

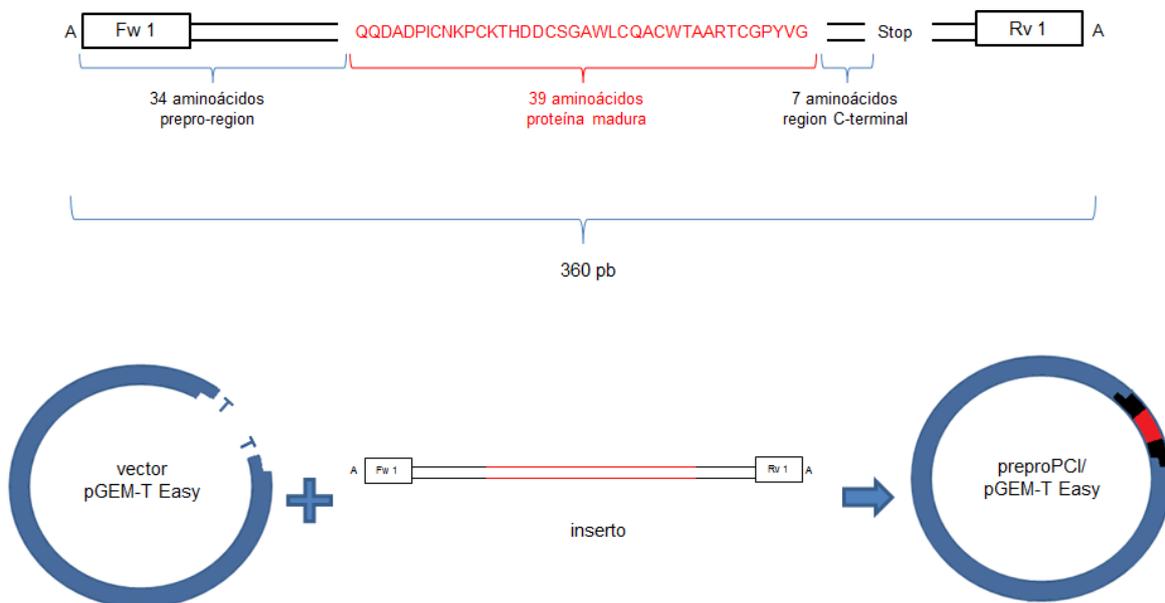


Figura 2.1.5: Esquema del inserto del cDNA de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, purificado previamente a su incorporación en el vector pGEM-T Easy (Promega) e inserción del mismo en el vector para la obtención del plásmido de clonación.

La inserción del cDNA de interés en los plásmidos de los clones que dan colonias blancas fue confirmada realizando una digestión enzimática con NotI (Fermentas), seguida de una electroforesis en gel de agarosa 1,5% para visualizar los productos de reacción.

Además, con el fin de obtener el DNA plasmídico en cantidad suficiente para poder ser secuenciado, se prepararon cultivos de cada uno de estos clones y se realizó la extracción del mencionado material plasmídico.

2.2.2.1.3 Análisis de secuencia

La secuencia del cDNA se obtuvo utilizando *primers* específicos de los promotores T7 y SP6, ambos incluidos en el vector pGEM-T Easy. La misma se analizó empleándose el programa PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>, Altschul et al., 1997, revelando elevado grado de identidad con secuencias de miembros pertenecientes a la familia de inhibidores de metalocarboxipeptidasas (base de datos MEROPS, cfr. 1.1.2.1). El mayor porcentaje de identidad encontrado (98%) corresponde al inhibidor de metalocarboxipeptidasa de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (PCI_t, *accession number*: AF060551.1).

La secuencia consenso del cDNA clonado se obtuvo luego de analizar y procesar las secuencias de los clones mencionados en el punto anterior con el software de alineamiento Clustal-W. Para traducir la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos se utilizó la herramienta de Internet del sitio <http://expasy.org/tools/dna.html>, la cual a partir de una secuencia de nucleótidos encuentra marcos de lectura en las 6 alternativas posibles y proporciona secuencias de aminoácidos que son luego analizadas. Dicho análisis consiste en tratar de identificar en cada secuencia la presencia de motivos que estén altamente conservados en el PCI ya estudiado.

La Figura 2.1.6 muestra la secuencia consenso del cDNA correspondiente a la secuencia parcial del preproPCI_a con su respectiva secuencia aminoacídica. Se muestra en color rojo el sitio de hibridación del *primer* Fw1 y en color amarillo el sitio de hibridación del *primer* Rv1, ambos utilizados en la fase de amplificación del clonado (cfr. 2.2.1.2.1.1). Además se resalta en color fucsia el sitio de hibridación del *primer* Fw2 y en color verde el sitio del *primer* Rv2, cuyo diseño será explicado más adelante en la sección de expresión de la proteína (PCI_a). Se observa dentro del recuadro la secuencia correspondiente a la proteína madura y remarcados en negrita los residuos N- y C-terminal.



Figura 2.1.6: Alineamiento de la secuencia consenso del cDNA del nuevo PCI con su correspondiente secuencia aminoacídica. Se indica con una flecha el sitio de corte entre la región pre y el proPCI_a. Se muestra en color rojo el sitio de hibridación del *primer* Fw1 y en color amarillo el sitio de hibridación del *primer* Rv1. En color violeta y verde se resaltan los sitios de hibridación para los *primers* Fw y Rv de expresión, respectivamente.

2.2.2.1.3.1 Análisis de la secuencia nucleotídica

Adicionalmente, la secuencia nucleotídica obtenida para el preproPCI_a parcial fue comparada con la secuencia nucleotídica del preproPCI_t utilizando el servidor Clustal-W. El alineamiento obtenido se analizó con el programa Gene Doc y se marcaron tanto las mutaciones como las inserciones en el PCI_a respecto al PCI_t (Figura 2.1.7). En forma similar al esquema anterior, se resalta en color rojo el sitio de hibridación para el *primer* Fw1 y en color verde el sitio de hibridación para el *primer* Rv1 que, como era de esperar, al ser diseñados en base a esas secuencias, no presentan modificaciones en dichas bases.

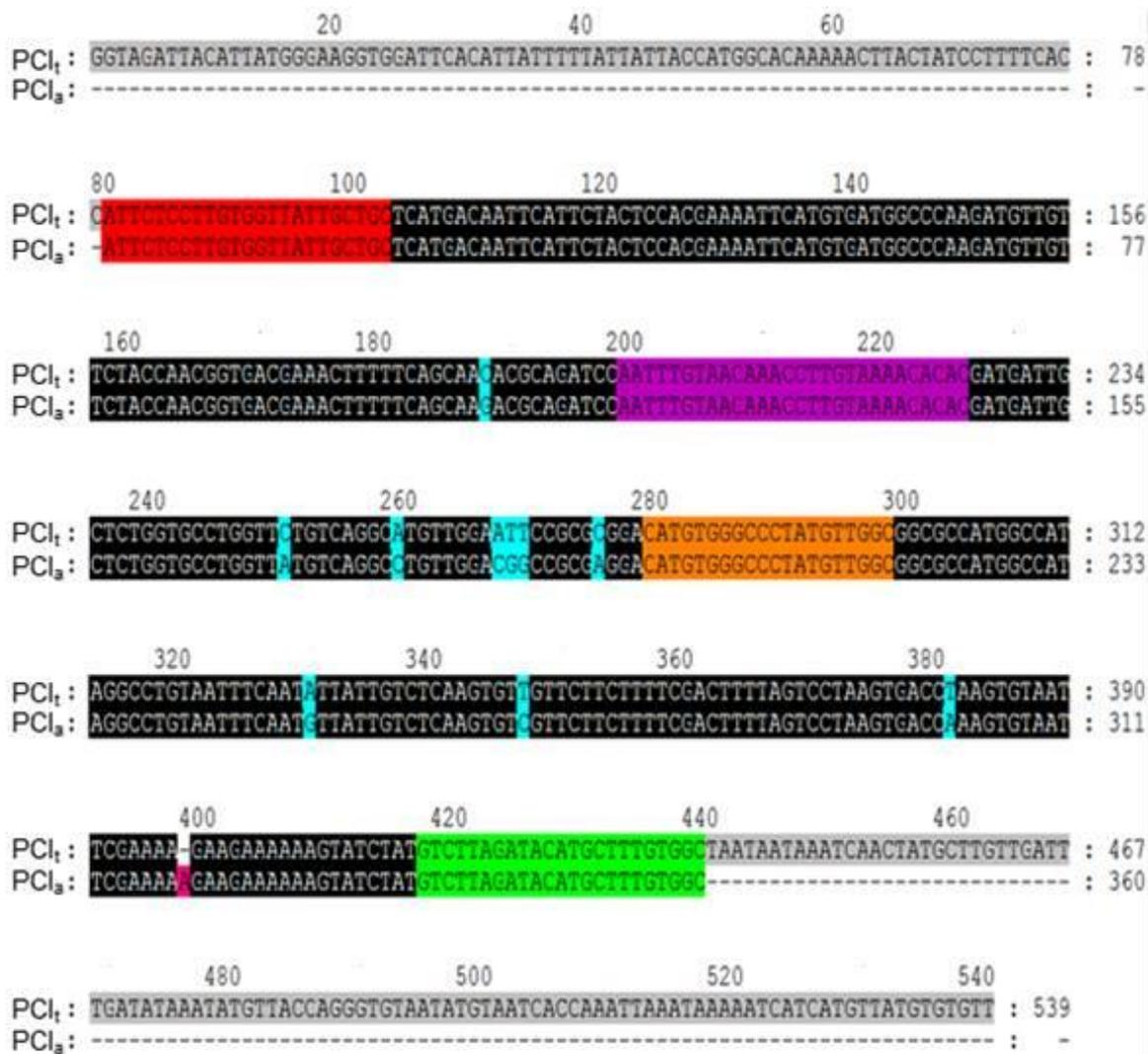


Figura 2.1.7: Alineamiento entre la secuencia nucleotídica del PCI_a y la secuencia del PCI_t. Los nucleótidos mutados en el preproPCI_a parcial se muestran resaltados en celeste, mientras que las inserciones se resaltaron en rosado.

A su vez, se muestran los sitios de diseño de *primers* para la expresión de la proteína recombinante (en color violeta el sitio de hibridación para el *primer* Fw2 y en color naranja el sitio de hibridación para el *primer* Rv2), que serán explicados más adelante. Finalmente se resaltan en color celeste los nucleótidos que presentan diferencias entre ambas secuencias, y en color rosa la inserción.

2.2.2.1.3.2 Análisis de la secuencia aminoacídica

La secuencia aminoacídica obtenida para el preproPCI_a parcial fue comparada con la secuencia del preproPCI_t, miembro más estudiado dentro del grupo de inhibidores de metalocarboxipeptidasas, con el fin de identificar regiones y residuos característicos, utilizando la herramienta bioinformática PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Como era de esperar, se observa un elevado grado de conservación de los residuos aminoacídicos en toda la secuencia, presentándose la típica organización para esta clase de inhibidores; esto es, una región N-terminal de propéptido formada por 27 aminoácidos, seguida de 39 residuos correspondientes a la proteína madura y una extensión de 7 residuos C-terminales. Más aún, encontramos conservadas las seis cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro (Cys8-Cys12; Cys24-Cys27 y Cys18-Cys34).

En la Figura 2.1.8 se destacan los aminoácidos no conservados entre ambas secuencias y se observan los residuos de cisteínas que forman parte de los puentes disulfuro. La numeración superior corresponde a la secuencia parcial de los preproPCIs, mientras que la inferior corresponde a las proteínas maduras.

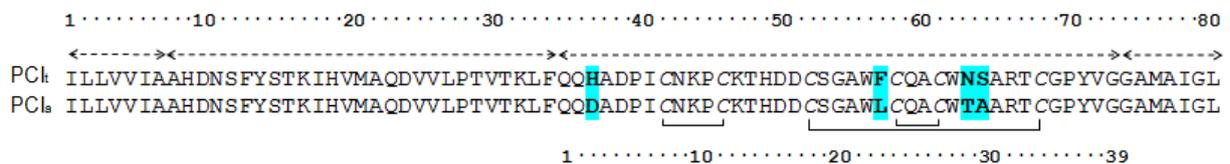


Figura 2.1.8: Alineamiento entre la secuencia aminoacídica del PCI_a y la secuencia del PCI_t. Los residuos no conservados se destacan en celeste y las cisteínas se muestran unidas por puentes disulfuro. La numeración superior corresponde a la secuencia parcial de los preproPCIs mientras que la inferior corresponde a las proteínas maduras.

Si bien hay un alto porcentaje de similitud entre las secuencias proteicas del PCI_a y del PCI_t (89%), es importante destacar que las principales diferencias se encuentran localizadas en la región conocida como *sitio secundario de unión*. Dichas diferencias son especialmente interesantes, ya que esta región contribuye energéticamente con aproximadamente la mitad de la energía libre de disociación del complejo proteasa-inhibidor (Marino-Buslje et al., 2000). Esto aumenta el interés de la purificación del PCI_a para su caracterización en estudios comparativos con las moléculas ya estudiadas (ej. PCI_t) que, como mencionamos al principio de este

trabajo, poseen importantes acciones terapéuticas en diversas patologías entre las cuales podemos citar a la malaria, el cancer, las coagulopatías (cfr. 2.1.2.3)

De lo dicho anteriormente, podemos afirmar que en esta Tesis Doctoral se ha logrado clonar un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A, a partir de tubérculos de *S. tuberosum tuberosum* variedad Imilla morada. Para facilitar la redacción de los estudios siguientes y otorgar un nombre al nuevo inhibidor, de ahora en adelante al PCI_a lo denominaremos **imaPCI**.

2.2.2.2 Expresión del nuevo PCI

2.2.2.2.1 Diseño y estrategia de expresión de la proteína madura

Como nombráramos anteriormente, la expresión de una proteína nativa (sin las regiones –prepro-) requiere solo de la inserción de las secuencias que expresan para la proteína madura. Para ello es necesario hacer diseños de “*primers*” con secuencias que permitan insertar el gen en el plásmido de expresión de manera tal que la lectura de síntesis proteica del mRNA en los ribosomas sea la de la proteína de interés.

En nuestro laboratorio ya se disponía de una construcción de expresión pIN-III-OmpA3_ PCI_t (Figura 2.1.9). Debido a esto basamos nuestra estrategia en el reemplazo de la secuencia correspondiente al PCI_t , por la secuencia del nuevo imaPCI clonado. Este reemplazo fue realizado en sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, cuyas secuencias de corte fueron tenidas en cuenta para el diseño de los *primers* de expresión, Fw2 y Rv2.

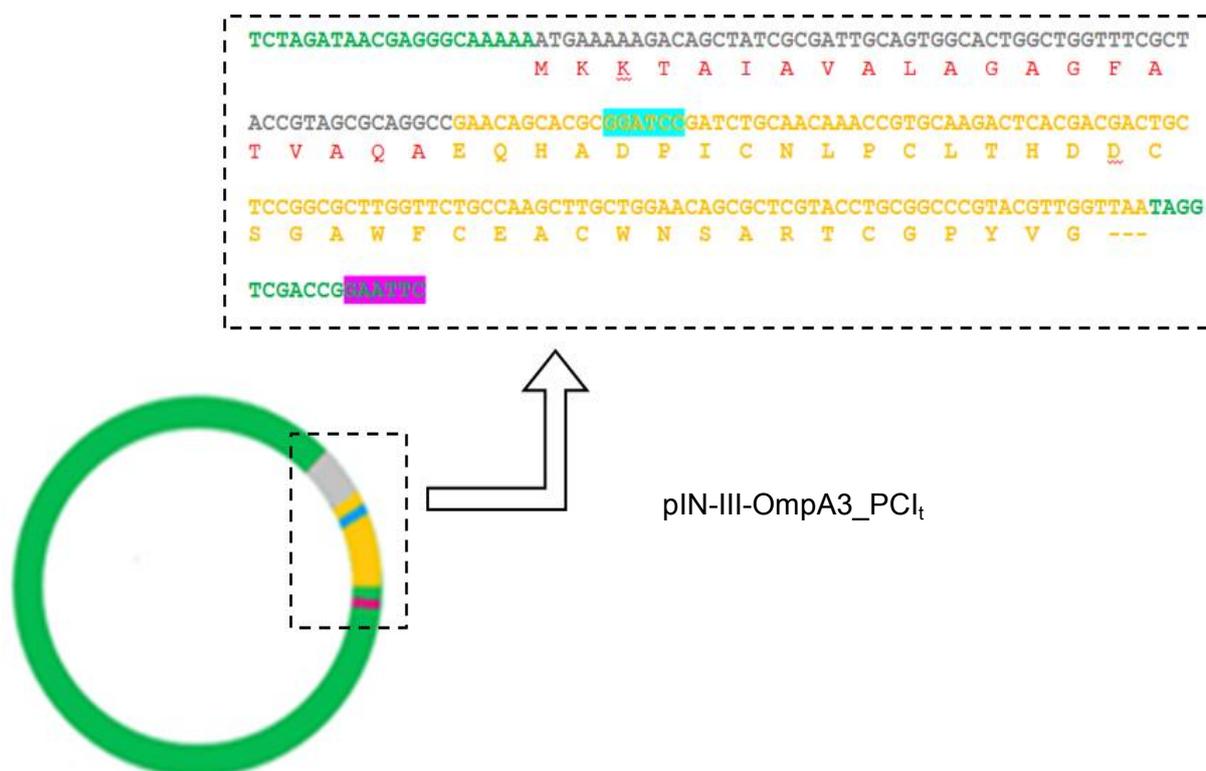


Figura 2.1.9: Construcción pIN-III-OmpA3_PCI_t. En verde se muestra la secuencia del vector pIN-III-OmpA3, en gris la secuencia del péptido señal OmpA3 y en amarillo la secuencia del PCI_t. Resaltado en turquesa se observa el sitio de restricción para BamHI mientras que en fucsia se observa el sitio para EcoRI.

En este sentido, partiendo de la construcción de clonado pGEM-T Easy_preproimaPCI parcial se procedió al aislamiento del cDNA que codifica para el nuevo PCI, realizando una PCR con los *primers* Fw2 y Rv2 (Tabla 2.1.18). Estos *primers* se diseñaron a partir de la secuencia nucleotídica obtenida para el preproimaPCI parcial, de manera tal que el *primer* Fw2 tuviese como sitio de hibridación a la región N-terminal de la proteína madura y un sitio de corte para la enzima de restricción BamHI. El *primer* Rv2 fue diseñado en base a la región C-terminal de la proteína madura, añadiendo un codón stop y un sitio de corte para la enzima de restricción EcoRI. De este modo, al realizar la amplificación de la construcción pGEM-T Easy_preproimaPCI con *primers* Fw2 y Rv2, fue posible la inserción de la secuencia codificante para la proteína madura del imaPCI en el vector de expresión pIN-III-OmpA3 (digerido previamente con BamHI y EcoRI), para su posterior expresión en *E. coli* BL21.

Finalmente, la estrategia de expresión anterior incluyó un detalle adicional dado que las principales diferencias entre el PCI_t y el imaPCI se encuentran en el

sitio secundario de unión, el imaPCI constituye una variante natural del PCI_t que puede ser útil para el estudio de la importancia del sitio secundario de unión en la inhibición de la enzima carboxipeptidasa. Es por este motivo, y por simplicidad para el análisis posterior, que la estrategia para el clonado y la expresión del imaPCI se basó en mantener las diferencias naturales observadas para el sitio secundario de unión, pero sin contar con la diferencia en el N-terminal respecto a la secuencia del PCI_t. Es así que se expresó una variante del imaPCI (conteniendo sólo las mutaciones naturales en el sitio secundario de unión), a la cual denominamos rimaPCI.

2.2.2.2.2 Clonado y expresión heteróloga de imaPCI

2.2.2.2.2.1 Clonado preliminar de pGEM-T Easy_imaPCI en *E. coli*

Mediante PCR de pGEM-T Easy_preproimaPCI parcial, empleando los *primers* Fw2 y Rv2, se obtuvieron productos de amplificación de tamaño esperado para el cDNA que codifica para el nuevo PCI de unos 100 pares de bases aproximadamente (33 residuos de aminoácidos). A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y el producto amplificado correspondiente a la secuencia del imaPCI flanqueada por los sitios de restricción para BamHI y EcoRI, fue purificado del mismo (cfr. 2.2.1.2.1.4) y ligado al vector de clonado pGEM-T Easy (cfr. 2.2.1.2.1.6.1) para su posterior transformación en *E. coli* XL1-Blue. Este paso se realizó para disponer de suficiente cantidad de clones de la secuencia codificante de imaPCI, utilizando bacterias y vectores de clonación adecuados para este fin (Bacteria: *E. coli* XL1-Blue y Vector: pGEM-T Easy).

En la electroforesis en agarosa al 1,5% de la Figura 2.1.10 se pudo observar una banda correspondiente a 100 pb proveniente de la PCR realizada a la construcción de clonado pGEM-T_imaPCI utilizando los *primers* Fw2 y Rv2, verificando de este modo la correcta inserción de imaPCI en el vector de clonado.

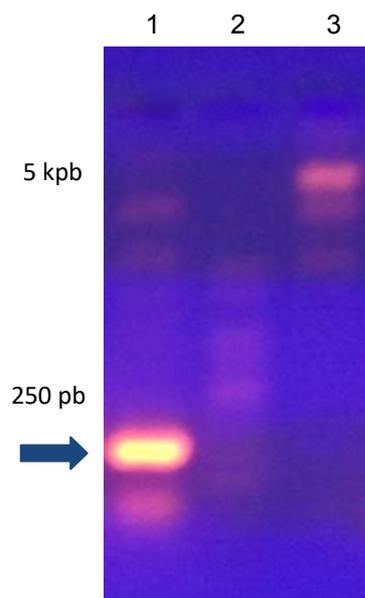


Figura 2.1.10: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR de la construcción de clonado imaPCI/pGEM-T, mediante empleo de *primers* Fw2 y Rv2. Calle 1: cDNA que codifica para el imaPCI. Calle 2: Patrón de peso molecular 50 pb (BioRad). Calle 3: Patrón de peso molecular 1 kpb (BioRad).

2.2.2.2.2 Expresión de imaPCI en *E. coli* BL21 (DE3)

Luego de la selección de los clones recombinantes y el aislamiento del DNA plasmídico se procedió a liberar el fragmento de imaPCI del vector de clonado, por medio de una digestión doble con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. A continuación, el producto de aproximadamente 100 bp obtenido en dicha digestión fue purificado desde el gel de agarosa y ligado con T4 DNA Ligasa (Promega) al vector de expresión pIN-III-OmpA3, el cual fue sometido previamente a digestión doble con las mismas enzimas para liberar el fragmento de PCI_t.

Todos los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% para confirmar la obtención de los productos correctos en cada instancia del protocolo (cfr. 2.2.1.2.1.3).

En la Figura 2.1.11 se esquematizan los pasos seguidos para la obtención de la construcción de expresión. En la construcción inicial pIN-III-OmpA3_PCI_t se resalta en gris la secuencia correspondiente al péptido señal y en amarillo la correspondiente al PCI_t, siendo ésta reemplazada luego de las digestiones dobles con posterior ligación, por la secuencia roja correspondiente al imaPCI.

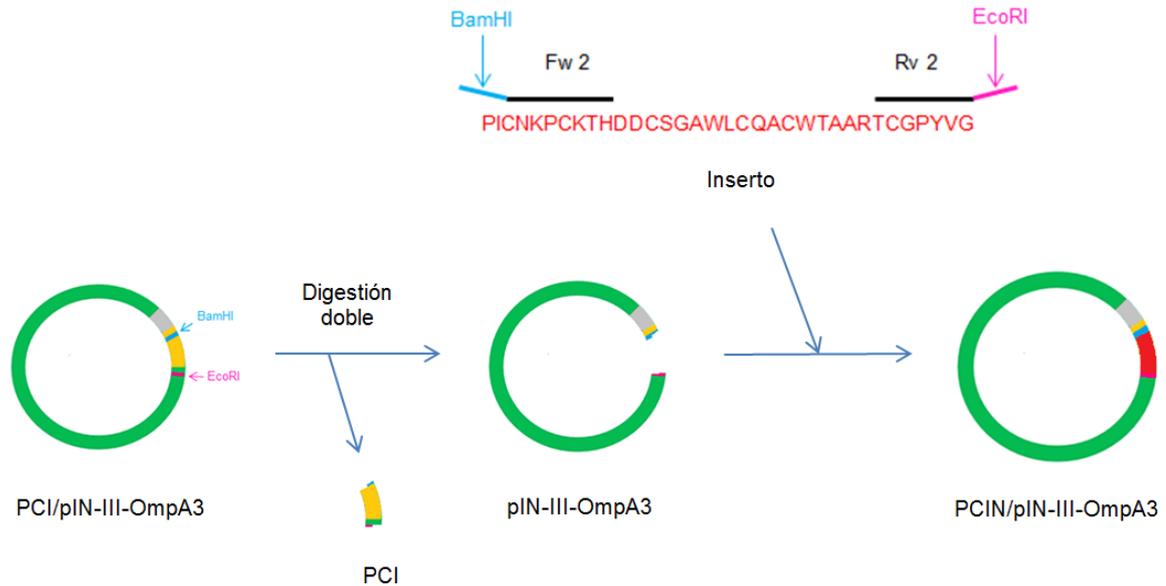


Figura 2.1.11: Esquema del inserto del cDNA de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Imilla morada, previamente a su incorporación en el vector pIN-III-OmpA3. Se muestra la construcción inicial pIN-III-OmpA3_PCI_t, su digestión doble y la inserción del imaPCI.

El producto de ligación pIN-III-OmpA3_PCI_a fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) para proceder a la producción de la proteína recombinante a partir de los clones seleccionados.

2.2.2.2.3 Expresión de la proteína recombinante

Para una posterior caracterización del nuevo PCI, se efectuó la expresión de la proteína recombinante. Para ello se seleccionó una de las colonias obtenidas previamente y se creció en medio mínimo de expresión BAT induciéndose la expresión de la proteína con IPTG (0,2 mM). Una vez transcurrido el tiempo de expresión, la proteína recombinante fue separada de los restos celulares mediante centrifugación durante 20 min a 6000 rpm. El péptido señal OmpA3 incluido en el vector de expresión es responsable de dirigir a la proteína en cuestión hacia el medio extracelular, por lo tanto, luego de la centrifugación se obtuvo el imaPCI en la fracción sobrenadante.

En la Figura 2.1.12 se muestra, a la izquierda, el crecimiento de *E. coli* BL21 transformada con la construcción PIN-III-OmpA3_imaPCI en medio mínimo BAT y a la derecha el sobrenadante producto de la centrifugación, una vez transcurridas las

condiciones de expresión. En este sobrenadante se encuentra la proteína madura, que será objeto de posteriores pasos de purificación y caracterización.



Figura 2.1.12: Expresión de la proteína recombinante imaPCI. A la izquierda se muestra el crecimiento de BL21 transformada con la construcción PIN-III-OmpA3_imaPCI en medio mínimo BAT. A la derecha se observa el sobrenadante producto de la centrifugación, una vez transcurridas las condiciones de expresión.

Una vez finalizada la colecta del sobrenadante se procedió al reordenamiento de los puentes disulfuro mediante agregado de cistina (concentración final 2 mM) y cisteína (concentración final 4 mM), siguiendo la técnica descrita en cfr. 2.2.1.2.2.3.3. De este modo obtuvimos la proteína madura con los puentes disulfuro formados correctamente.

2.2.2.3 Purificación del nuevo PCI

Cada paso de purificación fue monitoreado por HPLC con medidas de absorbancia a 280 nm, comenzando por el producto de expresión sometido a *reshuffling*.

En la Figura 2.1.13 vemos que existe una pequeña fracción proteica que eluye con un tiempo de retención cercano a los 20 minutos, siendo éste un valor característico para el PCI ya estudiado (Villanueva et al., 1998). Como método de control del seguimiento se realizó la misma cromatografía utilizando PCI_t recombinante como patrón. Por otro lado, se hizo un espectro de masas MALDI-TOF a la fracción eluida al tiempo de retención 20,5 minutos para verificar su presencia y finalmente, para confirmar su identidad, se determinó actividad inhibitoria de CPA (estos ensayos serán explicados en la sección de caracterización de la proteína recombinante).

Observamos que el producto de expresión requirió la aplicación de múltiples pasos de purificación, ya que no se observó un cromatograma limpio, sino distintas fracciones eluidas a distintos tiempos de retención.

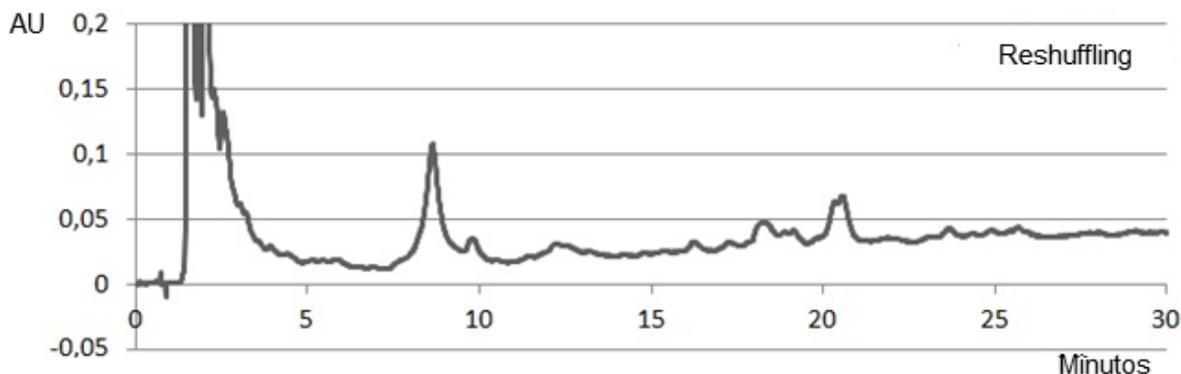


Figura 2.1.13: HPLC del producto de expresión sometido a reshuffling.

2.2.2.3.1 Cromatografía de intercambio iónico

Como primer paso de purificación de la muestra proveniente del *reshuffling* se realizó un cromatoenfoco desde pH 4 a pH 8,5 empleando una columna de intercambio iónico con una resina HST-*Streamline*, tal como se describió en cfr. 2.2.1.2.3.1. En dicha cromatografía se observaron una fracción no retenida, pequeñas fracciones a lo largo del cromatograma y una gran fracción que eluyó a pH 5. Esta última fracción fue sometida a HPLC para corroborar la presencia del inhibidor, tal como se describió en la sección anterior.

En la Figura 2.1.14 se muestra el HPLC de seguimiento de la cromatografía de intercambio iónico. Se observó un incremento en el pico correspondiente a la fracción proteica que eluye con un tiempo de retención de 20,5 minutos, y a su vez, una disminución en los picos correspondientes a fracciones con tiempos de retención distintos al del inhibidor.

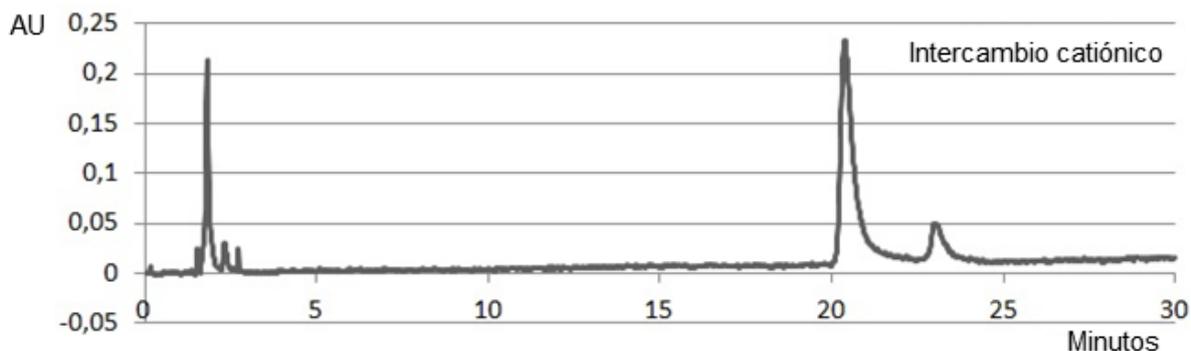


Figura 2.1.14: HPLC del producto de expresión sometido a intercambio iónico.

Estos resultados concuerdan con lo esperado debido a que el diseño de la expresión se realizó de manera tal que la proteína recombinante fuese dirigida al espacio periplásmico. De este modo, trabajamos sobre una muestra que contenía mayoritariamente el producto de expresión deseado por lo cual, con cada paso de purificación se incrementó su presencia en el tiempo de retención característico.

2.2.2.3.2 Cromatografía en fase reversa a presión normal

El siguiente paso de purificación se realizó empleando una resina de C18 (Sep-Paks C18, Waters) activada con 100% de acetonitrilo, continuando con el procedimiento descrito en cfr. 2.2.1.2.3.2. Una vez más se monitoreó la purificación por HPLC con lecturas de absorbancia a 280 nm, observando en este caso la presencia de un gran pico a los 20,5 min de tiempo de retención sin apreciarse fracciones significativas eluidas en otros tiempos de retención (Figura 2.1.15).

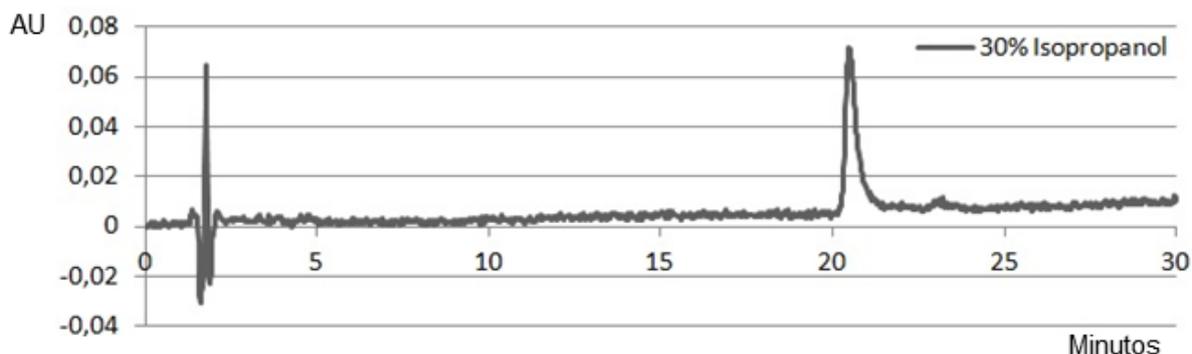


Figura 2.1.15: HPLC del producto de expresión sometido a cromatografía en fase reversa a presión normal.

2.2.2.4 Caracterización del nuevo PCI

2.2.2.4.1 Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A

La actividad de carboxipeptidasa A (metalocarboxipeptidasa) 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, como resultado de su hidrólisis.

Al incorporar la muestra del inhibidor purificado se determinó la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A estimada como la disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción, respecto a la obtenida en ausencia del inhibidor (control positivo de CPA). En la Figura 2.1.16 se observa que la presencia de imaPCI produce una disminución del 92% en la actividad de carboxipeptidasa A, por lo cual pudimos confirmar que la proteína expresada presentaba actividad inhibitoria más allá de las diferencias encontradas en su secuencia respecto al PCI_t.

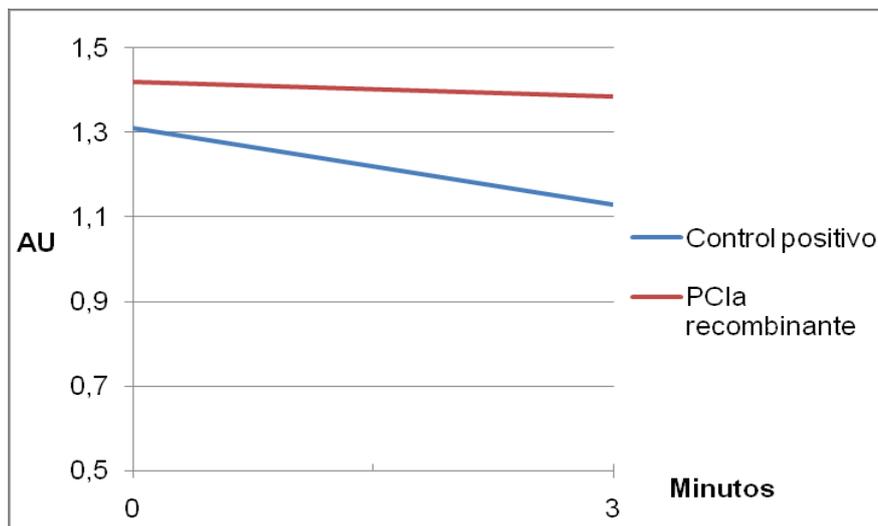


Figura 2.1.16: Medida de actividad inhibitoria de CPA por absorbancia a 350 nm.

2.2.2.4.2 Determinación de la constante cinética de inhibición (K_i) para MCPs tipo A/B

Las propiedades inhibitoras del imaPCI recombinante (rimaPCI) fueron evaluadas frente a cuatro MCPs de tipo A/B, y se compararon con las respectivas capacidades del PCI recombinante (rPCI).

Los valores de K_i de rimaPCI y rPCI contra bCPA, hCPA1, hCPA2 y pCPB fueron evaluados siguiendo un protocolo basado en el estado pre-estable, según el modelo de Morrison para inhibidores de unión fuerte. Todos los valores de K_i determinados para rimaPCI, resumidos en la Tabla 2.1.32, se encontraron en el intervalo nanomolar, característica de inhibidores de unión fuerte de MCPs. En comparación con el rPCI, los valores de K_i obtenidos para rimaPCI frente a bCPA, hCPA1 y hCPA2 fueron aproximadamente 2-2,5 veces mayores que los valores de K_i obtenidos para rPCI, y 4 veces mayor cuando pCPB era la enzima diana. Estos resultados sugieren que los residuos Leu23, Thr29 y Ala30 presentes en rimaPCI (en lugar de Phe23, Asn29 y Ser30 en la secuencia de rPCI) producen una disminución global de la eficacia de la inhibición de MCPs en comparación con rPCI.

Tabla 2.1.32: Constantes cinéticas de inhibición (K_i) del rPCI y rimaPCI para bCPA, hCPA1, hCPA2 y pCPB.

Enzima	rPCI K_i (nM)	rimaPCI K_i (nM)
bCPA ^a	1,60 ± 0,29	4,05 ± 0,29
hCPA1 ^a	0,73 ± 0,09	1,71 ± 0,48
hCPA2 ^a	5,30 ± 0,66	14,40 ± 4,20
pCPB ^b	2,40 ± 0,24	9,81 ± 2,90

^a Las medidas fueron realizadas usando el sustrato sintético N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH.

^b Las medidas fueron realizadas usando el sustrato sintético N-(4-metoxifenilazoformil)-Arg-OH.

2.2.2.4.3 Caracterización proteómica

2.2.2.4.3.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF

El producto de expresión purificado fue analizado utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF en el Laboratorio de Proteómica y Bioingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), España. La aplicación de esta técnica permite realizar el análisis del peso molecular del inhibidor con mayor resolución a la estimada por SDS-PAGE.

Como se aprecia en la Figura 2.1.17, el espectro de masas MALDI-TOF mostró un pico correspondiente a un peso molecular de **4234,8 Da**, resultado que concuerda con el valor teórico (4234 Da) obtenido al analizar la secuencia aminoacídica estimada a partir del cDNA que codifica para el nuevo PCI.

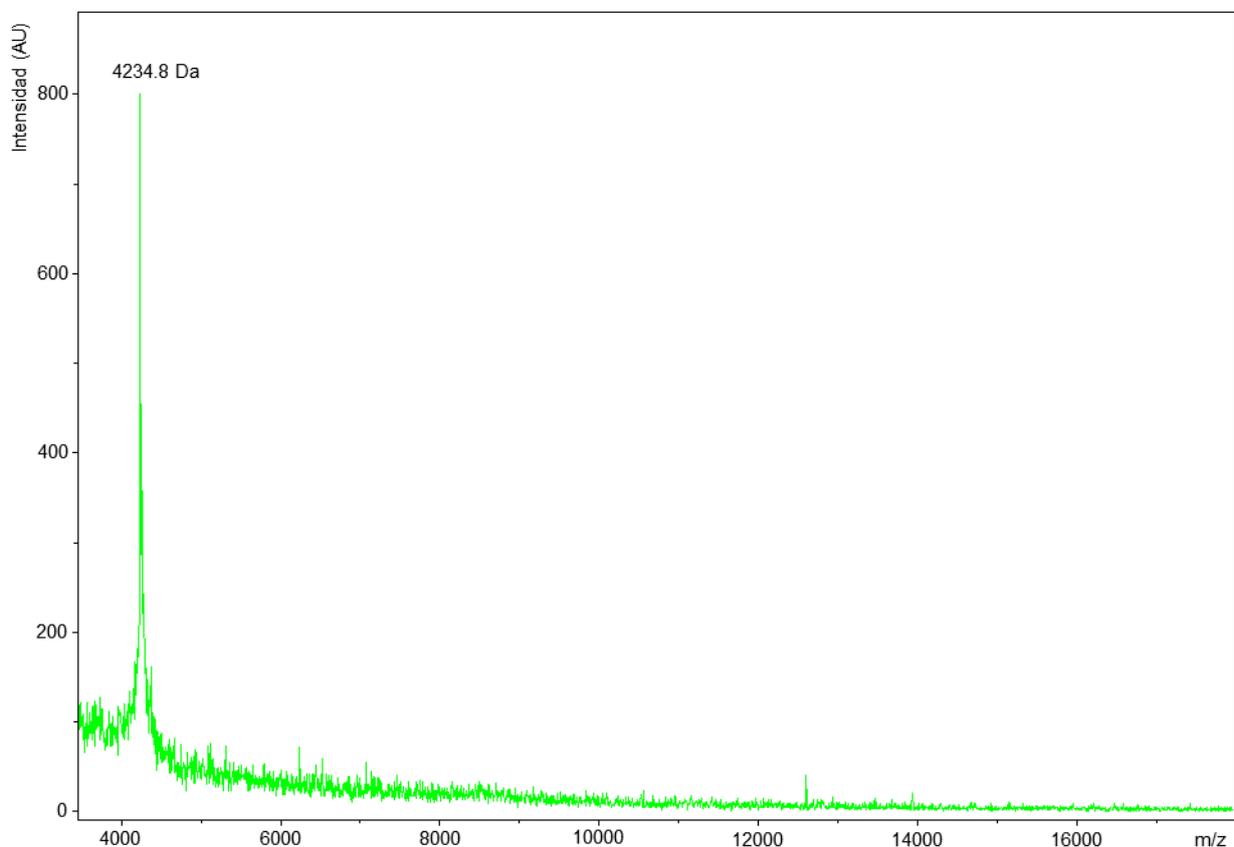


Figura 2.1.17: Análisis MALDI-TOF MS del producto de expresión purificado.

2.2.2.4.3.2 PMF MALDI-TOF

Se realizó también una electroforesis SDS-PAGE del producto de expresión purificado, visualizándose una banda de bajo peso molecular concordante con el peso molecular aparente esperado para el inhibidor.

Para realizar un estudio de identificación, la banda fue cortada y sometida a digestión trípica. 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 MASCOT de acuerdo a lo explicado en cfr. 2.2.1.2.4.2.2.

El análisis de la huella peptídica utilizando la base de datos mencionada no pudo determinar la identidad del inhibidor encontrado, por lo cual podríamos confirmar que se trata de un nuevo inhibidor no estudiado hasta el momento (Figura 2.1.18).

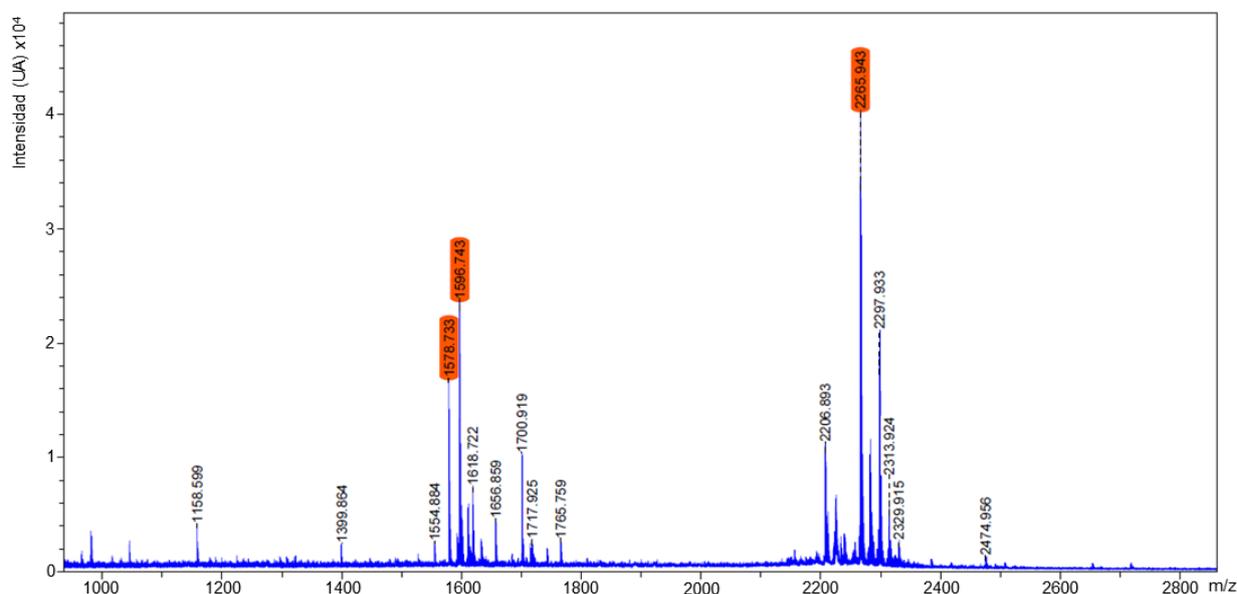


Figura 2.1.18: Espectro de masas obtenido luego de la digestión trípica del producto de expresión purificado.

2.2.2.4.3.3 PMF MALDI-TOF/TOF

En el último paso de caracterización se procedió al análisis de los espectros de fragmentación. De esta manera, los péptidos con m/z 1578,7 Da, 1596,7 Da y 2265,9 Da fueron seleccionados por el *timed-ion-selector* y analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.2.1.2.4.2.3.

Dicho análisis sólo permitió determinar una secuencia de 13 residuos de aminoácidos que identifican al nuevo inhibidor de CPA en el péptido con m/z 1596,7 Da (Figura 2.1.19).

La secuencia (**EQHADPICNKPCK**) corresponde parcialmente a la secuencia del inhibidor de CPA (PCI_i) depositada en la base de datos MEROPS.

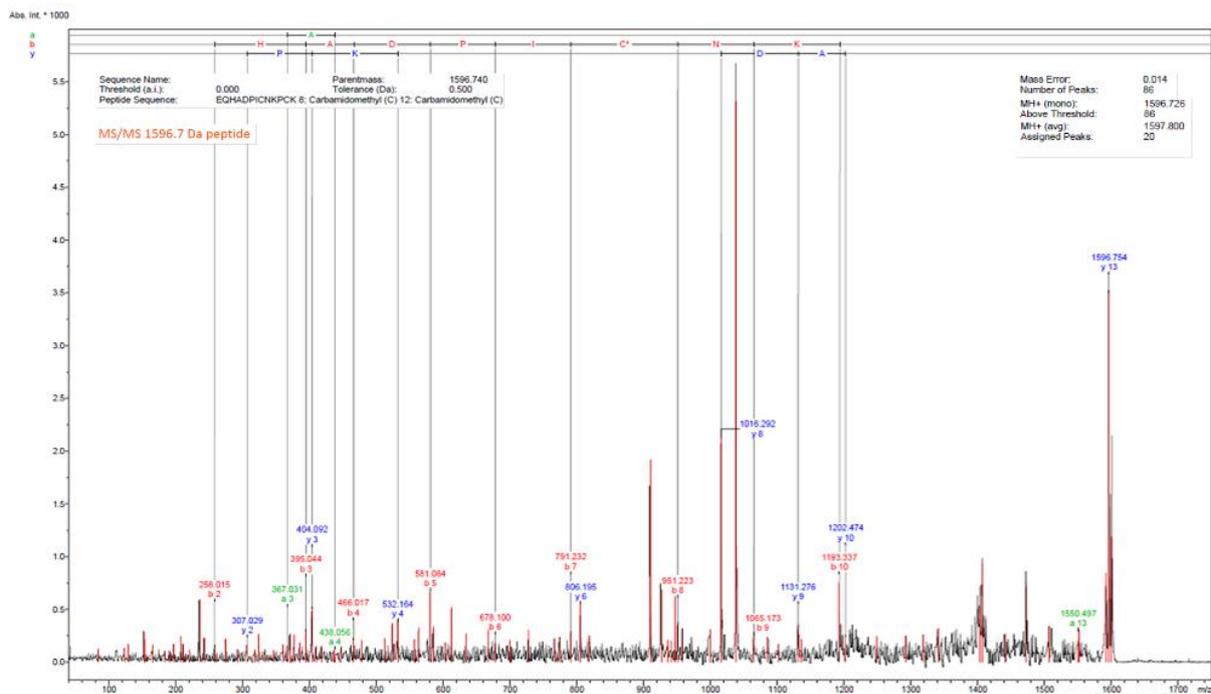


Figura 2.1.19: PMF MALDI-TOF/TOF del péptido fragmentado de m/z 1596.7 Da.

2.2.3 CONCLUSIONES

En este capítulo se logró clonar, expresar y purificar un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A (CPA) de papas andinas al que hemos denominado **imaPCI**. La naturaleza del inhibidor es peptídica y dicha molécula fue clonada, expresada y caracterizada bioquímicamente.

El nuevo inhibidor (imaPCI) posee un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos en toda la secuencia, respecto al ya conocido y estudiado inhibidor de carboxipeptidasa A proveniente de papa común, al que denominamos PCI_t. En la secuencia aminoacídica teórica de la molécula clonada (imaPCI) se observó la típica organización de los inhibidores de metalocarboxipeptidasa, que consiste en una región N-terminal de propéptido formada por 27 aminoácidos, seguida de 39 residuos correspondientes a la proteína madura y una extensión de 7 residuos C-terminales. Más aún, encontramos conservados los seis restos de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro (Cys8-Cys12; Cys24-Cys27 y Cys18-Cys34). Si bien se encontró un alto porcentaje de similitud entre ambas secuencias proteicas (89%), imaPCI y PCI_t, es importante destacar que las principales diferencias se localizaron en la región conocida como sitio secundario de unión. Dichas variaciones observadas fueron especialmente interesantes, ya que esta región contribuye energéticamente con aproximadamente la mitad de la energía libre de disociación del complejo proteasa-inhibidor. Esto resultó de interés para abordar su purificación y caracterización para comparar dicha molécula con el PCI_t.

Por otro lado, mediante estrategias de biología molecular se logró subclonar el cDNA del imaPCI en un vector adecuado para su posterior expresión como proteína recombinante en una cepa de *E. coli*. El imaPCI recombinante (rimaPCI) obtenido fue caracterizado por cinética de inhibición y técnicas proteómicas. La caracterización por actividad inhibitoria de CPA mostró que el producto de expresión producía una disminución del 92% en la actividad de CPA, por lo tanto se trató de una molécula inhibitoria funcional. Por análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF corroboramos la presencia de un pico correspondiente a un peso molecular de 4234,8 Da, resultado que concuerda con el valor teórico (4234 Da) obtenido al analizar la secuencia aminoacídica estimada a partir del cDNA clonado que codifica

para el nuevo PCI. El análisis de la huella peptídica utilizando la base de datos MEROPS no permitió identificar al inhibidor encontrado. Por este motivo podríamos asegurar que se trata de un nuevo inhibidor no descrito hasta el momento. Finalmente, logramos secuenciar por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF un péptido interno de 13 residuos aminoacídicos que corresponde parcialmente a la secuencia del inhibidor de CPA (PCI_t) depositada en la base de datos.

Así, todos los ensayos realizados son consistentes con la obtención de una molécula recombinante inhibitoria de CPA, similar al PCI_t, cuyas propiedades teóricas predichas se corresponden con las obtenidas experimentalmente.

Capítulo 2 – Parte 2:

Purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de pimiento amarillo (*Capsicum annuum* L.)

*En la segunda parte del capítulo 2 se abordará el estudio de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A aislado en su forma nativa a partir de pimiento amarillo (*Capsicum annuum* L.). Dicha investigación arrojó resultados interesantes en lo que respecta a la estabilidad fisicoquímica de este tipo de inhibidores, dando lugar a una publicación en la revista internacional *Protein Expression and Purification* (“Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annuum* L). A novel contribution to the knowledge of miniproteins stability”. Juliana Cotabarren, Mariana Tellechea, Francesc Xavier Avilés, Julia Lorenzo, Walter David Obregón. *Protein expression and purification*, 144, 2018, 55-61).*

El trabajo fue complementado con la ayuda del Laboratorio de Proteómica e Ingeniería de Proteínas del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona a través de una pasantía de la Dra. Mariana Tellechea, integrante de nuestro grupo de investigación, en el cual se realizaron los estudios proteómicos necesarios para la caracterización del nuevo inhibidor.

2.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1.1 Material vegetal

Como material de partida se utilizaron semillas de morrón amarillo (*Capsicum annuum* L.), provenientes de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina (Figura 2.2.1).

El género *Capsicum annuum* (morrón/pimiento) fue inicialmente domesticado en México, norte de centroamérica y en la región andina de Sudamérica, siendo Argentina el principal productor en Sudamérica de frutos de morrón con un cultivo de unas nueve mil hectáreas de pimiento por año, lo que representa una producción aproximada de 300,000 toneladas.

Las variedades de *Capsicum annuum* presentan diversos usos como productos alimenticios, ya sea como vegetal fresco o procesado, especias o hasta medicinas y control de plagas (Cichewicz & Thorpe, 1996; Diz et al., 2006), lo cual hace a este cultivo de inmensa importancia cultural y económica. *Capsicum annuum* L. presenta un gran número de variedades dependiendo las características del fruto (pimiento alargado, cuatro cascós, ají vinagre, pimiento amarillo, anaranjado, violeta, entre otros) de las cuales unas pocas han sido estudiadas hasta el momento.



Figura 2.2.1: Fruto y planta de *C. annuum* L.

2.3.1.2 Metodología

2.3.1.2.1 Preparación de extracto crudo

Se pesaron 30 g de semillas de pimiento amarillo, se lavaron repetidas veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente por 16 – 20 h. Se trituraron de manera discontinua en multiprocesadora con el agregado de 100 ml de buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4 manteniendo bajas temperaturas. La mezcla se incubó por 3 h a 4 °C con agitación a 120 rpm, luego se filtró con gasa y se centrifugó por 30 min a 4 °C y 9000 rpm, se colectó el sobrenadante y se obtuvo de este modo el extracto crudo de morrón amarillo, al cual denominamos MAEC.

2.3.1.2.2 Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976)

La estimación del contenido proteico se realizó por el método de Bradford (1976). Este método se basa en la unión del colorante *Coomassie Blue G-250* a las proteínas. Dicha unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma marrón 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 (Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, 1951).

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 10-1000 µg/ml. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura de absorbancia en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro). Se realizó el blanco correspondiente utilizando el reactivo de Bradford. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 2.2.1: Mezcla de reacción para la cuantificación por el método de Bradford.

MEZCLA DE REACCIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN POR BRADFORD	
Muestra	5 μ l
Reactivo de Bradford	250 μ l
Incubación de 10 min a 25 °C	
Lectura de absorbancia a 595 nm	

2.3.1.2.3 Screening para la búsqueda de inhibidores de proteasas de distintos tipos mecanísticos por métodos bioquímicos

Se realizó un ensayo de screening para la búsqueda de actividad inhibitoria de proteasas al extracto crudo MAEC. Para ello se evaluaron la actividad inhibitoria de tripsina y de carboxipeptidasa A, empleando los sustratos cromogénicos específicos.

2.3.1.2.3.1 Determinación de actividad inhibitoria de tripsina

La actividad de tripsina fue determinada por el incremento en la absorbancia a 410 nm producto de la hidrólisis del sustrato BAPNA (N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida), mediante lecturas en intervalos de 30 segundos durante 10 min a 37 °C. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro) en un volumen final de 200 μ l.

La inhibición de tripsina causó disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 2.2.2: Mezcla de reacción para la medida de actividad de tripsina.

MEZCLA DE REACCIÓN DE ACTIVIDAD DE TRIPSINA	
Buffer Tris-HCl 0,1M, CaCl ₂ 50 mM, pH 8	160 µl
Tripsina 2,8x10 ⁻⁷ M, Sigma	10 µl
Muestra	20 µl
Incubación de 15 min a 37 °C	
BAPNA 20 mM, Sigma	10 µl

2.3.1.2.3.2 Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A

La actividad de carboxipeptidasa A (CPA) fue registrada por la disminución de la absorbancia a 340 nm producto de la hidrólisis del sustrato N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, mediante medidas continuas durante 10 min a 37 °C. Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro) en un volumen final de 200 µl (Tellechea, García-Pardo, Cotabarren, Lufrano, Avilés, Obregón, Lorenzo, & Tanco, 2016).

La inhibición de CPA causó disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 2.2.3: Mezcla de reacción para la medida de actividad de CPA.

MEZCLA DE REACCIÓN DE ACTIVIDAD DE CPA	
Buffer Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,2 M; pH 7,4	160 µl
CPA 50 nM, Sigma	10 µl
Muestra	20 µl
Incubación de 15 min a 37 °C	
N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH 10 mM, Sigma	10 µl

2.3.1.2.3.2.1 Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta

Se realizó una curva dosis respuesta a partir de la cual se determinó la IC₅₀.

La IC₅₀ se define como la concentración a la cual se produce una inhibición del 50% en la actividad enzimática (IC₅₀) y fue determinada midiendo la actividad inhibitoria de los diferentes extractos vegetales a distintas concentraciones proteicas, hasta que la actividad enzimática disminuyó completamente. En este caso fueron ensayadas concentraciones desde 0 a 275 µg/ml, en total 6 concentraciones proteicas (MAEC) diferentes: 0, 55, 110, 165, 220 y 275 µg/ml. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

Con la finalidad de determinar el valor de IC₅₀ se normalizaron las pendientes relativas a la pendiente obtenida sin extracto y expresadas en porcentaje. Luego se utilizó el programa GraphPad para ajustar los datos a la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \log IC_{50})}}$$

Dónde X es el log de la concentración proteica ensayada e Y es la actividad de CPA normalizada (relativa a la condición control expresada como porcentaje de máxima actividad).

2.3.1.2.4 Purificación

2.3.1.2.4.1 Purificación parcial mediante tratamiento térmico

Tal como se describió en la introducción, 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 (Bártová & Bárta, 2008; Obregón et al., 2012).

En base a esta premisa, se realizó una purificación parcial de las muestras o de los extractos por aplicación de tratamiento térmico. Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C y 100 °C durante 5 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

2.3.1.2.4.2 Purificación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad

2.3.1.2.4.2.1 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa

Se realizó una cromatografía de afinidad por inmovilización de proteasas de distinto tipo mecanístico. El soporte utilizado para la inmovilización de proteasas fue agarosa 10 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoacídicos de la enzima. Para ello, tal como se muestra en la Figura 2.2.2, se utilizó un protocolo de activación con glicidol, el cual permite la interacción covalente con la agarosa en un extremo y la incorporación de un grupo aldehído en el otro extremo para la interacción mediante reacción de Schiff con la proteína a inmovilizar.

Se prepararon 180 ml de una solución de agarosa (conteniendo 105 g de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución que contenía 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH₄. Se agregó luego glicidol (36 ml) gota a gota. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 h aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Posteriormente 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 de gliceril-agarosa. Los pasos siguientes consistieron en la oxidación del gel para completar el proceso de activación: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO₄ en 240 ml de agua destilada (NaIO₄ 100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel de glioxil-agarosa con abundante agua destilada de igual forma a la descrita previamente.

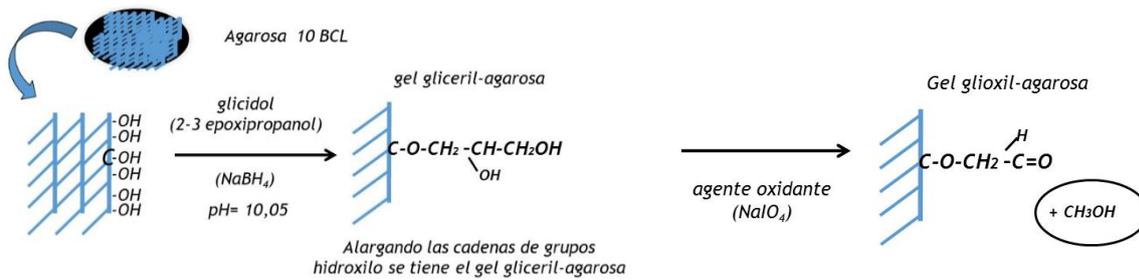


Figura 2.2.2: Activación de la Agarosa 10 BCL con glicidol. Alargamiento de la cadena y generación de un grupo aldehído para reacción de Schiff.

La inmovilización de la enzima se realizó a pH 10 y 25 °C empleando 250 ml de una solución conteniendo bicarbonato de sodio 100 mM, el 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 y previniendo el desplegamiento de la proteína. A dicha solución se le adicionó una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 3 horas. A lo largo de este período de tiempo se obtuvieron muestras a cada hora, y se determinó actividad enzimática.

La reacción entre el grupo aldehído de la glioxil agarosa y el grupo amino de un resto de Lys de la enzima se produce cuando el grupo amino se encuentra en forma no ionizada. El pKa de la Lys es 10,8 con lo cual a pH 10 existe una alta proporción de moléculas en forma no ionizada (a pH > pKa existen en la forma no ionizada), por esta razón es que la reacción se realizó a pH 10.

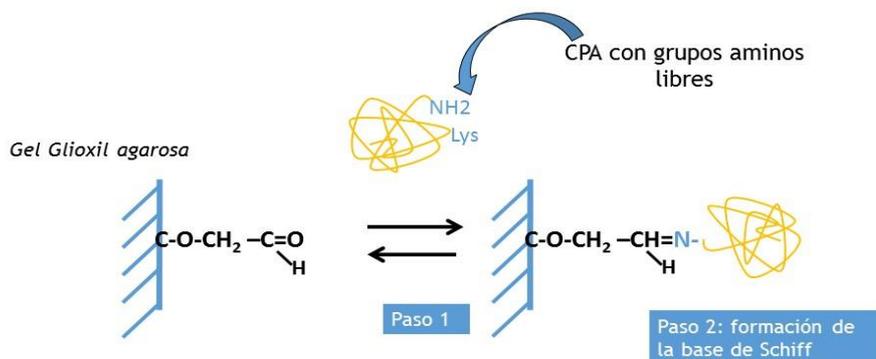


Figura 2.2.3: Unión de la enzima a glioxil agarosa y formación de base de Schiff.

La formación de una Base de Schiff produce 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, es conveniente que la unión entre el soporte y la enzima se produzca al menos en 2 sitios, para asegurar que en el equilibrio se produzca al menos un punto de unión. Además, desde el punto de vista dinámico-estructural es conveniente que la enzima se encuentre unida al soporte en un único enlace, para presentar la movilidad necesaria para interactuar correctamente.

Transcurridas las 3 horas de agitación, se incorporó borohidruro de sodio y se mantuvo la agitación durante 30 min con el recipiente destapado para permitir la salida del H₂ producido en la reacción.

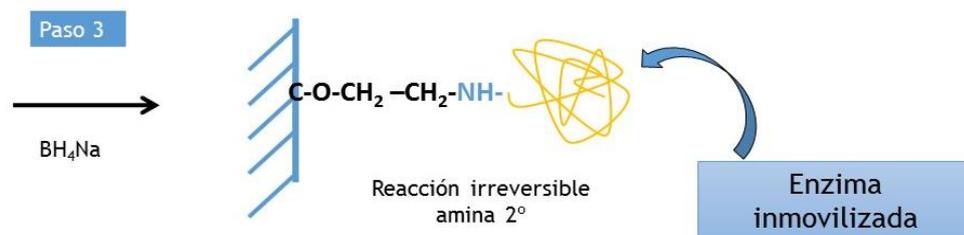


Figura 2.2.4: Reducción del enlace del enlace de la base de Schiff entre la enzima y la glioxil-agarosa.

El NaBH₄ reduce el doble enlace reversible de la base de Schiff, obteniendo un enlace amina, con desprendimiento de hidrógeno por contacto con el agua. Los grupos glioxilo que no han reaccionado con la enzima son reducidos a grupo alcohol.

Se lavó luego con abundante agua destilada en embudo de vidrio fritado y posteriormente con el buffer de elección, adecuado para mantener la enzima en condiciones óptimas.

El soporte producido que contiene la enzima inmovilizada mediante uniones covalentes, puede ser reutilizado en varios ciclos de reuso ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa (Obregón et al., 2012).

2.3.1.2.4.2.2 Desarrollo de la cromatografía de afinidad

2.3.1.2.4.2.2.1 Cromatografía de afinidad a tripsina

La muestra a ser purificada por cromatografía de afinidad a tripsina se sembró en una columna cromatográfica con tripsina inmovilizada en soportes de glioxil-agarosa. Las fracciones no retenidas fueron eluidas con buffer Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 50 mM, pH 8 a una velocidad de 0,7 ml/min y midiendo la absorbancia a 215 nm y 280 nm hasta llegar a cero. Finalmente la fracción retenida fue eluida con un descenso progresivo del pH, cambiando el buffer de elución por HCl 0,01 M para lograr la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor. Para conservar la columna, la misma fue lavada con Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 50 mM, pH 8 y posteriormente etanol 20%.

A cada una de las fracciones eluidas se les determinó actividad inhibitoria de tripsina y concentración de proteínas mediante el método de Bradford (cfr. 2.3.1.2.2). Se empleó la técnica de liofilización para concentrar las fracciones proteicas (cfr. 2.3.1.2.5).

2.3.1.2.4.2.2.2 Cromatografía de afinidad a CPA

La muestra a ser purificada por cromatografía de afinidad a CPA se sembró en una columna cromatográfica con CPA inmovilizada en glioxil-agarosa. Se eluyó a una velocidad de 0,7 ml/min con buffer de reacción de CPA (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 8) recolectando la fracción no retenida y midiendo la absorbancia a 215 nm y 280 nm hasta llegar a 0. Finalmente la fracción retenida fue eluida con un descenso progresivo del pH, cambiando el buffer de elución por HCl 0,01 M para lograr la desestabilización del complejo CPA-inhibidor. Para conservar la columna, la misma fue lavada con Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 8 y posteriormente etanol 20%.

A cada una de las fracciones eluidas se les determinó actividad inhibitoria de CPA y concentración de proteínas mediante el método de Bradford (cfr. 2.3.1.2.2). Se empleó la técnica de liofilización para concentrar las fracciones proteicas (cfr. 2.3.1.2.5).

2.3.1.2.5 Método para concentración de proteínas: liofilización

La liofilización es un proceso que consiste en deshidratar un producto previamente congelado, y posterior sublimación del hielo a presión reducida gracias a condiciones de vacío y baja temperatura. Este proceso evita la desnaturalización de las proteínas y permite obtener un producto seco, esponjoso, de mayor estabilidad y fácil disolución en agua.

El proceso se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, por lo tanto, 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. 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 mucho tiempo (dependiendo de las características de cada producto), constituyendo productos de larga estabilidad.

2.3.1.2.6 Caracterización

2.3.1.2.6.1 Electroforesis SDS-PAGE

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.2.1.2.4.2.2.1.

2.3.1.2.6.2 Caracterización proteómica

2.3.1.2.6.2.1 Determinación de peso molecular por MALDI-TOF

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.2.1.2.4.2.1.

2.3.1.2.6.2.2 PMF MALDI-TOF

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.2.1.2.4.2.2.

2.3.1.2.6.3 Ensayos de estabilidad

2.3.1.2.6.3.1 Efecto del pH en la estabilidad del inhibidor

Se determinó la estabilidad del inhibidor de CPA a valores extremos de pH. Para ello se incubó la muestra a pH 2 y pH 12 durante 1 h a 37 °C, con agitación de 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se neutralizó y se determinó la actividad inhibitoria residual de CPA.

La cantidad de muestra utilizada en cada ensayo fue de 20 µl, independientemente de la cantidad de proteínas que haya quedado soluble luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo es, justamente, verificar la población de proteínas estables que permanecen activas luego de cada tratamiento.

2.3.1.2.6.3.2 Efecto de la concentración de NaCl en la estabilidad del inhibidor

Se determinó el efecto del cambio de concentración de NaCl sobre la estabilidad del inhibidor. Se incubó la muestra durante 1 h a 37 °C y 150 rpm luego de agregar NaCl hasta concentración final de 0,5 M y una segunda fracción a concentración final 2 M. Para este ensayo se empleó una muestra 10 veces concentrada de extracto parcialmente purificado, del cual se tomaron 10 µl para llevar a 1 ml final de la

concentración establecida de NaCl, de manera tal que no interfieran las sales propias del buffer de extracción en el ensayo en cuestión.

La cantidad de muestra utilizada en cada ensayo fue de 20 μ l, independientemente de la cantidad de proteínas que haya quedado soluble luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo es, justamente, verificar la población de proteínas estables que permanecen activas luego de cada tratamiento.

2.3.1.2.6.3.3 Ensayo de simulación de la digestión gástrica

La muestra proteica a ensayar (inhibidor de carboxipeptidasa de morrón amarillo) fue sometida a un ensayo de simulación gástrica con el fin de evaluar la resistencia del inhibidor de CPA frente al proceso digestivo simulado (Hernández-Ledesma, Del Mar Contreras, & Recio, 2011; Miguel et al., 2007). Para ello se tomó 1 ml de muestra y se ajustó a pH 2 con HCl 1 M, se agregó pepsina (Sigma, 3400 UI/mg) en relación de 182 UI por cada mg de inhibidor y se incubó dos horas a 37 °C y 200 rpm. Se ajustó a pH 5,3 con NaHCO₃ 0,5 M y luego a pH 7,5 con NaOH 2 M, se agregó pancreatina (Sigma) en relación de 35 UI por cada mg de péptido y se incubó 3 horas a 37 °C y 200 rpm para luego detener la reacción enzimática mediante calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Finalmente se determinó la actividad inhibitoria residual de CPA, realizando los controles correspondientes.

La cantidad de muestra utilizada en cada ensayo fue de 20 μ l, independientemente de la cantidad de proteínas que haya quedado soluble luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo es, justamente, verificar la población de proteínas estables que permanecen activas luego de cada tratamiento.

2.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.2.1 Screening o búsqueda de actividades inhibitorias de proteasas de diferentes tipos mecanísticos

2.3.2.1.1 Actividad Inhibitoria de tripsina del Extracto Crudo

Se realizó un ensayo de actividad inhibitoria de tripsina utilizando el extracto como primera prueba para verificar la presencia de inhibidores en dicha muestra. Los ensayos fueron realizados por triplicado, con el cálculo respectivo de la desviación estándar en cada punto.

Si definimos a una unidad de tripsina (UT) como la cantidad de enzima que produce un aumento de 0,1 unidades de absorbancia a 410 nm por minuto, empleando BAPNA como sustrato a 37 °C y a pH 8, entonces observamos que la curva control sin agregado de inhibidor presenta 0,020 UT, mientras que la curva con agregado de extracto (concentración final 40 µg/ml) posee una actividad menor, cuyo valor es de 0,014 UT, representando así un 30% de inhibición. Tal como se observa en la Figura 2.2.5, el agregado de MAEC produce una disminución en la pendiente de la curva de inhibición, evidenciándose la presencia de un inhibidor de tripsina (YBPTI).

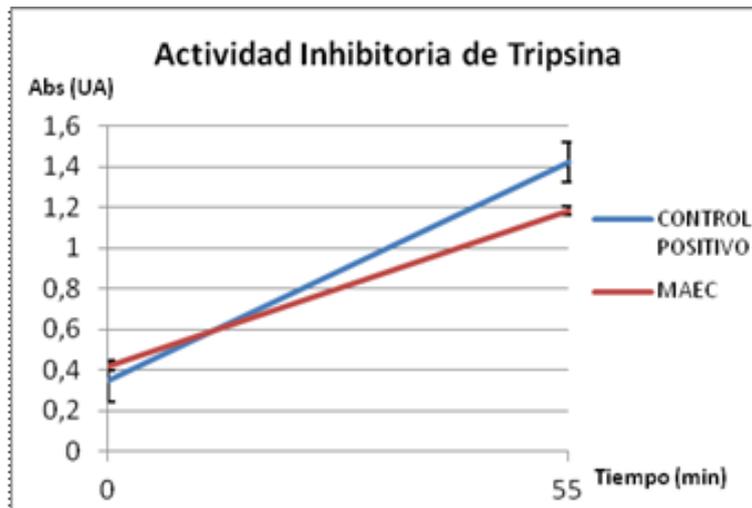


Figura 2.2.5: Actividad inhibitoria de tripsina del extracto crudo de morrón amarillo. En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de tripsina con el sustrato sin inhibidor (Control Positivo). El rojo muestra la curva correspondiente a la actividad de tripsina con sustrato y con inhibidor (MAEC).

2.3.2.1.2 Actividad Inhibitoria de carboxipeptidasa A del Extracto Crudo

Se realizó un ensayo de actividad inhibitoria de CPA utilizando el extracto (Figura 2.2.6), donde se observó que el agregado de MAEC produce una disminución en la pendiente de la curva de inhibición, evidenciándose la presencia de un inhibidor de CPA (YBPCI).

Si definimos a una unidad de CPA (UCPA) como la cantidad de enzima que produce una disminución de 0,1 unidades de absorbancia a 340 nm por minuto, empleando N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH como sustrato a 37 °C y a pH 7,4, entonces observamos que la curva control sin agregado de inhibidor presenta 0,013 UCPA, mientras que la curva con agregado de inhibidor (concentración final 200 µg/ml) posee una actividad menor, cuyo valor es de 0,003 UCPA, representando así un 76% de inhibición.

Se observó en general, un aumento significativo en los valores de absorbancia con el agregado de muestra (valor de inicio de 0,9 UA) respecto a los de la curva control (valor de inicio de 0,6 UA), debido a que el extracto crudo presentaba una leve coloración inicial y, además, los volúmenes agregados para hacer significativa la inhibición de CPA fueron mayores a los del ensayo anterior (inhibición de tripsina).

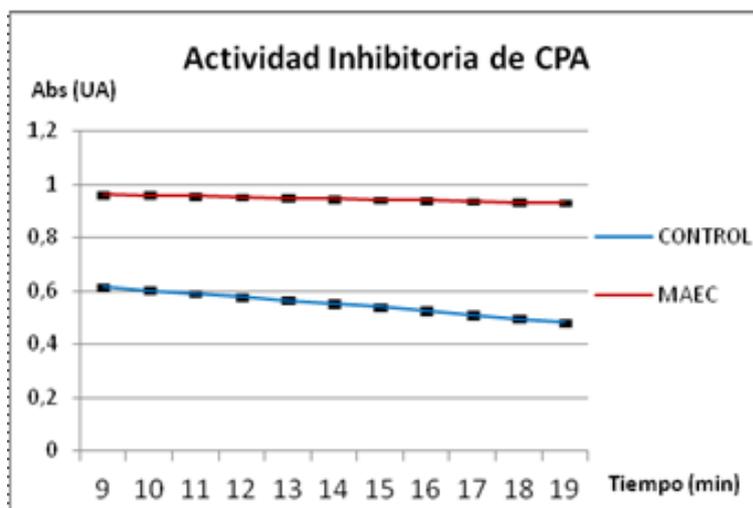


Figura 2.2.6: Actividad inhibitoria de CPA del extracto crudo de morrón amarillo. En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de CPA con el sustrato sin inhibidor (Control Positivo). El rojo muestra la curva correspondiente a la actividad de CPA con sustrato y con inhibidor (MAEC).

2.3.2.2 Purificación parcial de inhibidores mediante tratamiento térmico

Estudios previos sugieren que los IPPs son moléculas termoestables debido a enlaces disulfuro que estabilizan su estructura. En base a estos resultados, propusimos un método de purificación simple y rápido que consistió en la evaluación de la actividad inhibitoria después de tratar el extracto crudo a diferentes temperaturas. El extracto crudo de morrón amarillo (MAEC) fue sometido a 60 °C, 80 °C y 100 °C durante 5 min, en cada caso. Luego se procedió a centrifugar cada muestra a una velocidad de 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en tubos eppendorf y se continuó con el ensayo de determinación de la concentración proteica.

A cada una de las muestras se le estimó la concentración proteica mediante la técnica de Bradford (cfr. 2.3.1.2.2). Se pudo observar de esta manera el efecto del aumento de temperatura sobre las proteínas solubles contenidas en la muestra (Tabla 2.2.4).

Tabla 2.2.4: Concentración de proteínas solubles luego de cada tratamiento térmico.

Muestra	Concentración proteica (µg/ml)
MAEC	400
MATT60	350
MATT80	230
MATT100	200

MAEC: extracto crudo de morrón amarillo; MATT60: tratamiento térmico a 60 °C; MATT80: tratamiento térmico a 80 °C; MATT100: tratamiento térmico a 100 °C.

Como puede apreciarse en la tabla, los tratamientos térmicos produjeron una reducción en la concentración de proteínas, lo cual es consistente con la pérdida de solubilidad de las proteínas termolábiles. Dado que este ensayo no permite determinar si las proteínas solubles mantienen su actividad o no, el paso siguiente consistió en determinar la actividad inhibitoria de proteasas remanente luego de cada tratamiento.

2.3.2.2.1 Actividad inhibitoria de proteasas

A las muestras sometidas a cada tratamiento térmico (MAEC, MATT60, MATT80 Y MATT100) se les determinó la actividad inhibitoria residual de proteasas. Se observó que tanto para el ensayo de actividad inhibitoria de tripsina (Figura 2.2.7) como para el de actividad inhibitoria de CPA (Figura 2.2.8), el tratamiento a 80 °C (MATT80) durante 5 min generaba un producto con mayor actividad que el tratamiento a 60 °C (MATT60). Sorprendentemente, el tratamiento a 100 °C (MATT100) permitió obtener un producto con actividad inhibidora tan alta como el tratamiento a 80 °C (MATT80), indicando que los inhibidores de tripsina y de carboxipeptidasa A de semillas de morrón amarillo son moléculas muy estables.

Cabe aclarar que la cantidad de muestra de extracto crudo y de los distintos tratamientos térmicos utilizada en cada ensayo fue de 20 µl, independientemente de la cantidad de proteínas que hayan quedado solubles luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo es, justamente, verificar la población de proteínas termoestables que permanecen activas luego de cada tratamiento.

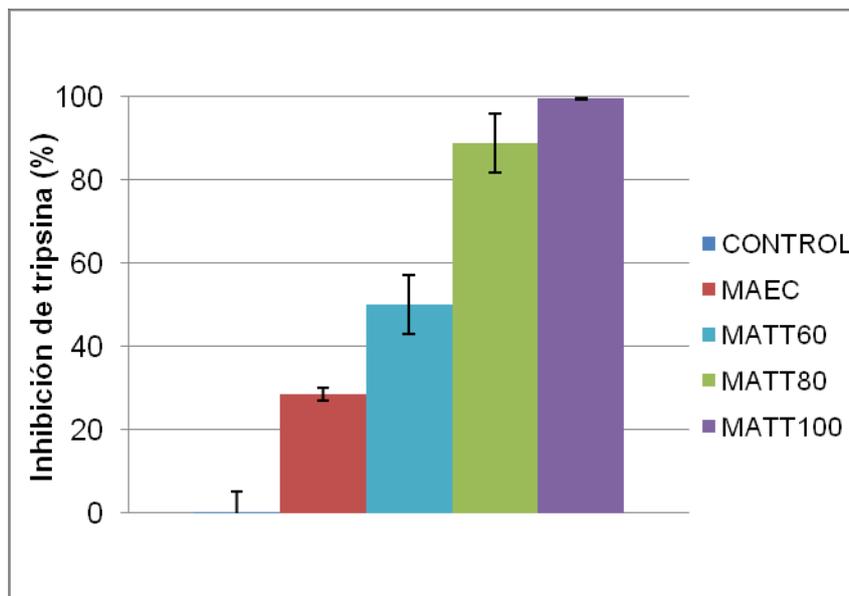


Figura 2.2.7: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad inhibitoria de tripsina. MAEC: Extracto crudo de morrón amarillo; MATT60: tratamiento térmico a 60 °C; MATT80: tratamiento térmico a 80 °C; MATT100: tratamiento térmico a 100 °C.

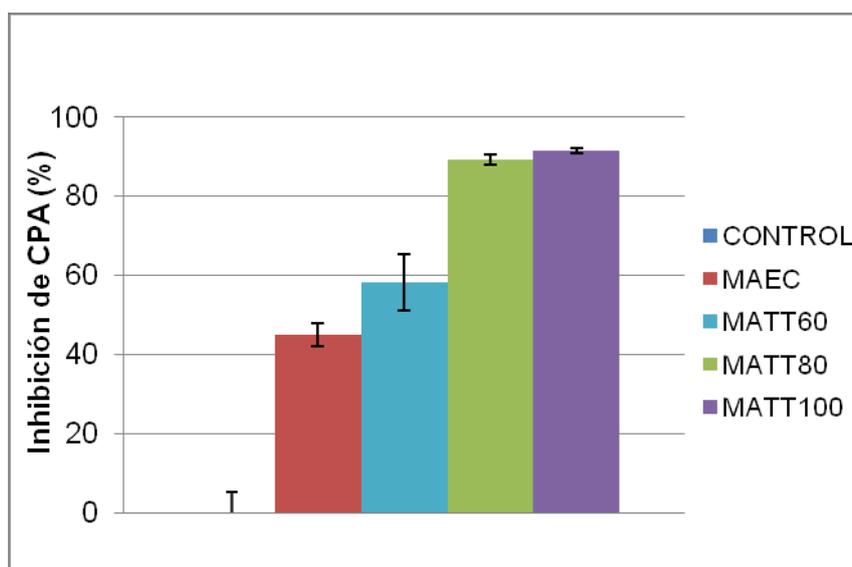


Figura 2.2.8: Efecto del tratamiento térmico a diferentes temperaturas en la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A. MAEC: Extracto crudo de morrón amarillo; MATT60: tratamiento térmico a 60 °C; MATT80: tratamiento térmico a 80 °C; MATT100: tratamiento térmico a 100 °C.

Existen numerosos informes de IPPs termoestables (cfr. 1.1.3.4), atribuyendo dicha propiedad a su estructura compacta, resultado de un bajo peso molecular y la presencia de múltiples puentes disulfuro. La mayoría de los IPPs termoestables informados pertenecen a la familia de inhibidores de serín proteasas (dentro de este grupo se halla el inhibidor de tripsina aquí estudiado), mientras que no fue posible el hallazgo de inhibidores de metaloproteasas con dicha característica. Adicionalmente, es destacable el comportamiento de ambos inhibidores al resistir el tratamiento térmico a 100 °C, dado que esta temperatura por lo general produce una inactivación total de la actividad inhibitoria. Además fue posible observar que la actividad inhibidora de tripsina y de CPA no solo se mantuvo con el aumento de temperatura; sino que también se incrementó gradualmente en los diferentes tratamientos térmicos. Se esperaba también que, debido a la gran estabilidad de estos inhibidores, la misma actividad inhibidora observada en el extracto crudo se mantenga después de los tratamientos térmicos. Sin embargo, en este caso se observó que la actividad inhibidora aumentó considerablemente. Estos resultados podrían indicar la presencia en el extracto crudo de:

- a) biomoléculas activadoras de tripsina y de CPA que son afectadas por los tratamientos térmicos, o
- b) la presencia de biomoléculas termolábiles que inactivan reversiblemente los inhibidores en cuestión, o
- c) la posibilidad de que en el extracto crudo una población del inhibidor esté en una isoforma inactiva que se revierte por tratamiento térmico.

Son muy pocos los reportes referidos a estabilidad térmica de proteínas a 100 °C, y mucho menos aun los referidos a estabilidad de inhibidores de proteasas a dicha temperatura.

En el caso del inhibidor de CPA de morrón amarillo se trata del primer estudio para este tipo de moléculas que presenta esta notable estabilidad térmica.

2.3.2.2.2 Análisis del patrón proteico mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF

Las proteínas obtenidas luego de cada tratamiento térmico se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras y luego se tiñeron con azul de Coomassie (Figura 2.2.9). En base al perfil proteico de las muestras comparadas con los patrones de peso molecular empleados, observamos que el extracto crudo contenía una variedad de proteínas con diferentes pesos moleculares. El tratamiento térmico a 60 °C (MATT60) no produjo cambios significativos en los perfiles de proteína respecto al MAEC. Las proteínas con un peso molecular de alrededor de 20 y 30 kDa y con un peso molecular superior a 60 kDa se eliminaron en gran parte mediante incubación a 80 °C. Después del tratamiento térmico a 100 °C (MATT100), se logró eliminar un gran porcentaje de las proteínas con peso molecular superior a 6 kDa, presumiendo que las proteínas que desaparecieron por tratamiento térmico son proteínas termolábiles. Estos resultados, sumados a la presencia de elevada actividad inhibidora en las muestras sometidas a tratamiento a 100 °C, concuerdan con estudios previos que indican que los IPPs son moléculas termoestables. En este caso particular, se propone un tratamiento a 100 °C como primer paso de purificación ya que a esta temperatura se eliminó un alto porcentaje de proteínas (que permanecen intactas en el tratamiento a 80 °C como se observa en la Figura 2.2.9) preservando la actividad inhibidora de las proteasas ensayadas.

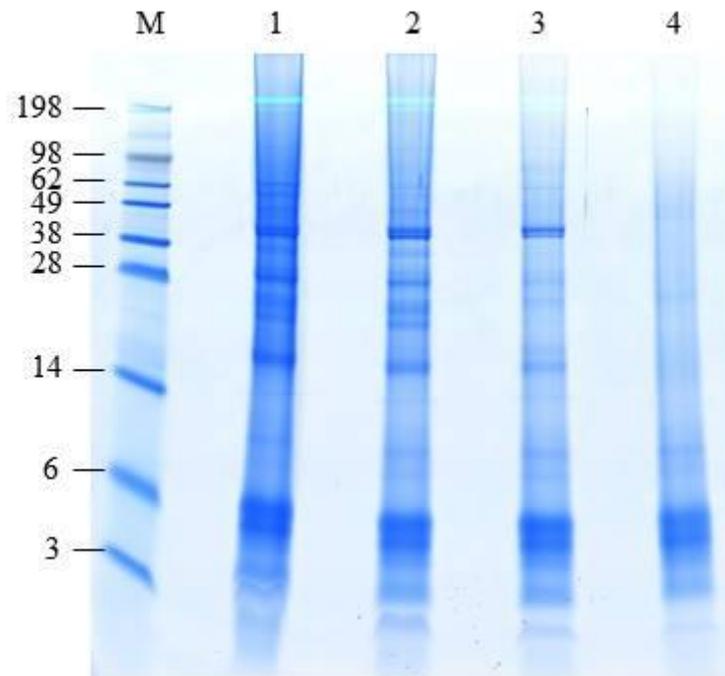


Figura 2.2.9: SDS-PAGE para fracciones correspondientes a los diferentes tratamientos térmicos. M, marcador de peso molecular (kDa); 1: Extracto crudo (MAEC); 2: tratamiento térmico a 60 °C (MATT60); 3: tratamiento térmico a 80 °C (MATT80); 4: tratamiento térmico a 100 °C (MATT100).

Si bien la electroforesis es una herramienta útil para dilucidar el cambio en el perfil proteico de las distintas fracciones tratadas térmicamente, la resolución de dicha técnica sólo permitió apreciar la desaparición de proteínas con un peso molecular mayor a 10 kDa, sin poder observar fehacientemente que sucedía con las proteínas de menor peso molecular. Para resolver este inconveniente, se aplicó espectrometría de masas MALDI-TOF a las diferentes fracciones y, a pesar de haber verificado que la actividad inhibitoria permanecía luego de cada tratamiento térmico, mediante esta técnica se pudo observar qué sucedía con todas las proteínas de bajo peso molecular constituyentes de cada fracción.

En la Figura 2.2.10 se observa que las proteínas/péptidos de peso molecular menor a 10 kDa permanecieron estables en cada tratamiento térmico, lo cual demostraría, al igual que la actividad inhibitoria, que el tratamiento térmico no afecta a las estructuras de estas proteínas. Este efecto no es visualizable por electroforesis.

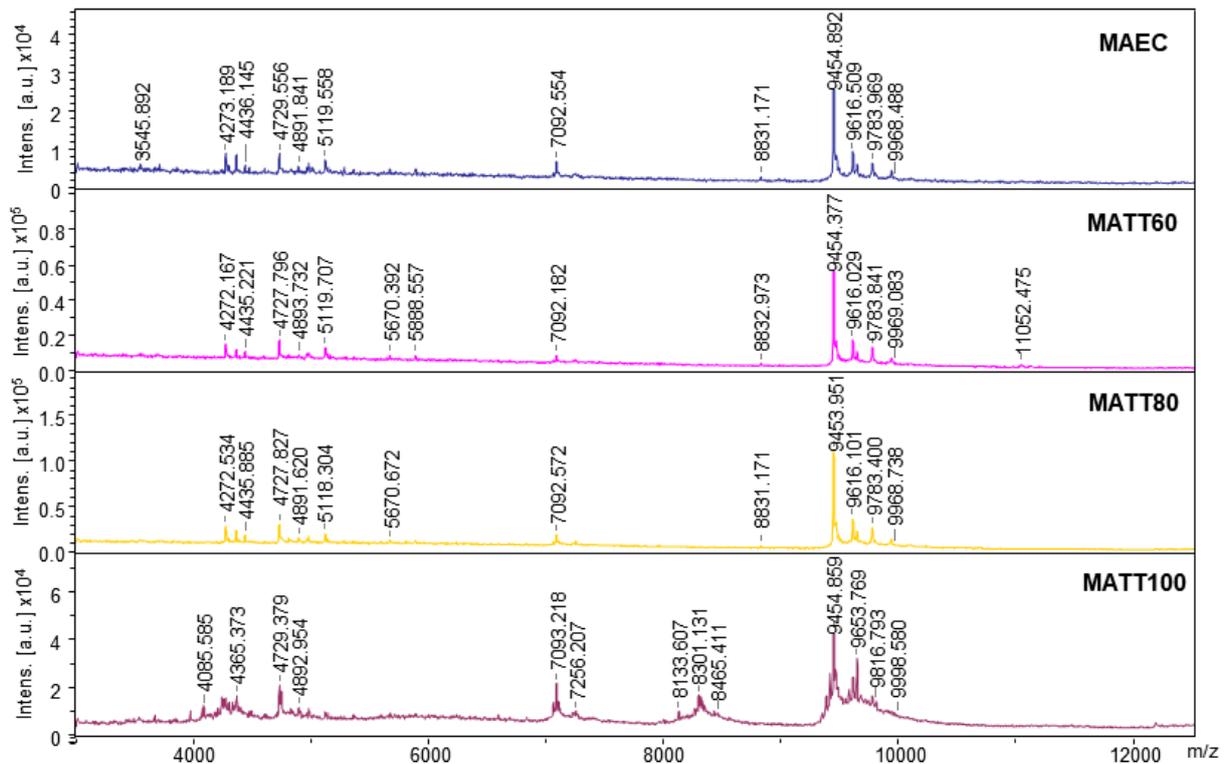


Figura 2.2.10: Espectros de masas entre 3 y 12 kDa obtenidos para el extracto de morrón amarillo y los tratamientos térmicos. MAEC: Extracto crudo de morrón amarillo; MATT60: tratamiento térmico a 60 °C; MATT80: tratamiento térmico a 80 °C; MATT100: tratamiento térmico a 100 °C.

Como conclusión se puede decir que los tratamientos térmicos en general afectan a las proteínas de mayor tamaño, pero no afectan en gran medida a las de menor tamaño molecular. No obstante, el mantenimiento de la solubilidad en esas drásticas condiciones no implica conservación de la actividad biológica. En el caso de los inhibidores de tripsina y de carboxipeptidasa A, la conservación de actividad fue demostrada en este trabajo. No podemos afirmar lo mismo para el resto de los péptidos/proteínas de menor tamaño, de función desconocida para nuestro estudio, que permanecen en solución luego de los tratamientos.

2.3.2.3 Caracterización parcial del inhibidor de tripsina de morrón amarillo (YBPTI)

2.3.2.3.1 Purificación del inhibidor de tripsina aislado a partir de pimiento amarillo

Con el objeto de purificar el inhibidor de tripsina se empleó para la siembra cromatográfica el extracto crudo sometido a tratamiento térmico a 80 °C durante 5 minutos (MATT80) y se realizó una cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada como soporte (Figura 2.2.11). La elución se realizó a pH 2, obteniendo una fracción con actividad inhibitoria de tripsina. Dicha fracción presentó una concentración de 37,7 µg/ml y se denominó YBPTI (inhibidor de tripsina de morrón amarillo).

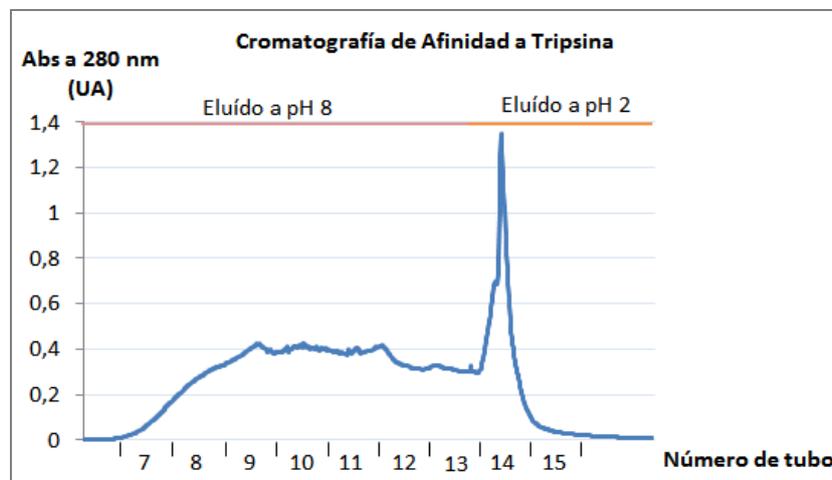


Figura 2.2.11: Cromatografía de afinidad a tripsina. El cromatograma nos muestra una fracción no retenida que es eluida a pH 8 y una fracción retenida que es eluida a pH 2.

2.3.2.3.2 Determinación de la IC_{50} : curva dosis-respuesta

La presencia de inhibidores en las fracciones retenidas por la cromatografía de afinidad fue comprobada realizando un ensayo de actividad inhibitoria. En la Figura 2.2.12 se observa la curva dosis-respuesta correspondiente al inhibidor de tripsina, donde se evaluó la actividad de tripsina residual con el agregado de distintas concentraciones de inhibidor. En función de estos datos, y contando con la concentración proteica estimada previamente por Bradford, se determinó un valor de IC_{50} de 3.9 $\mu\text{g/ml}$.

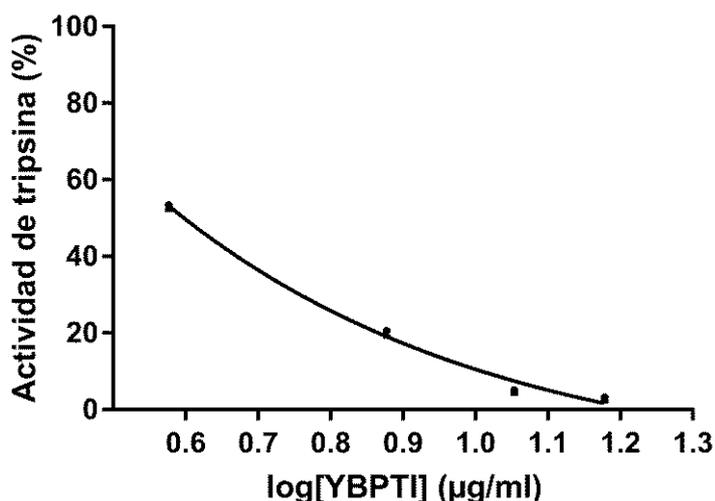


Figura 2.2.12: Curva que corresponde a la actividad de tripsina con el agregado de distintas concentraciones de inhibidor.

2.3.2.3.3 Determinación de la masa molecular

Por espectrometría de masas MALDI-TOF se verificó que en la fracción eluida a pH 2 proveniente de la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada, se obtuvo un inhibidor de tripsina con una masa molecular de alrededor de **5903 Da** (Figura 2.2.13). Este dato podría indicar que el YBPTI forma parte de la familia de inhibidores de serín proteasas tipo Bowman-Birk (BBI), dado su peso molecular pequeño, contrario a los inhibidores tipo Kunitz que generalmente oscilan entre los 18 y 24 kDa (Bendre et al., 2018; Qi et al., 2005).

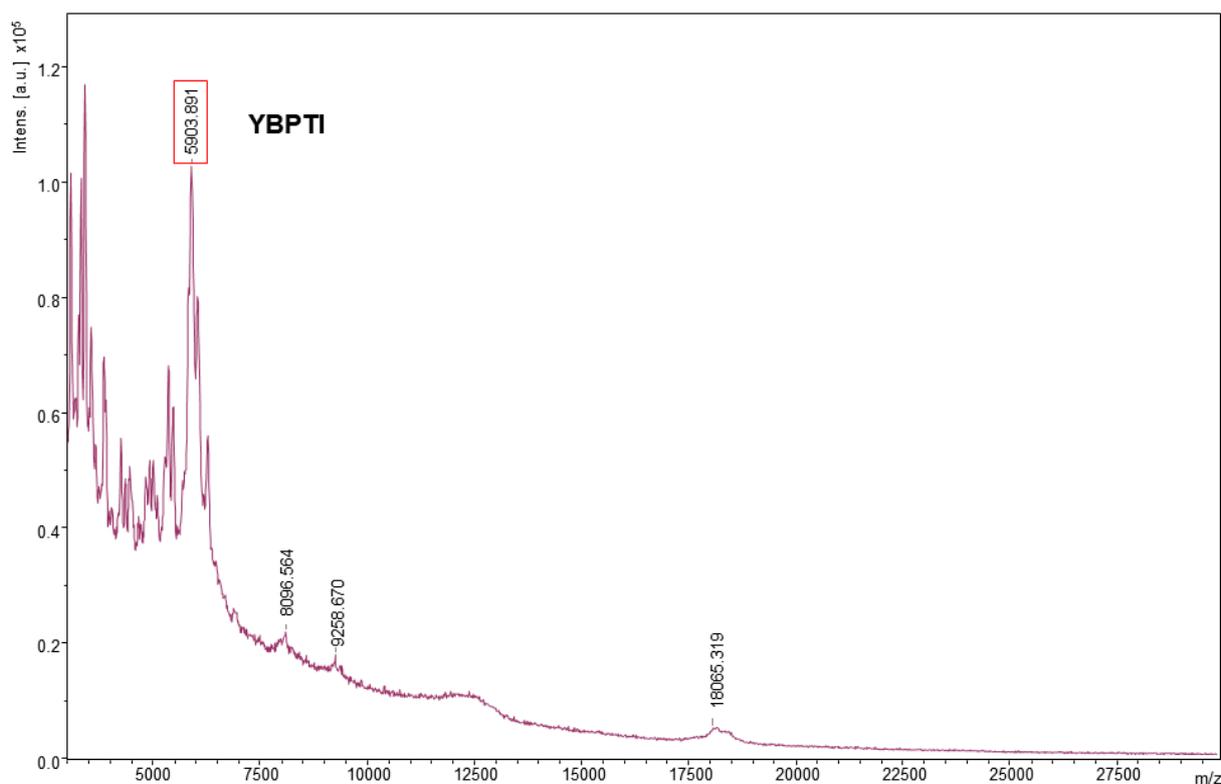


Figura 2.2.13: Espectrometría de masas MALDI-TOF realizada sobre la muestra de inhibidor de tripsina de morrón amarillo (YBPTI).

Algunos de los inhibidores tipo Bowman-Birk de origen vegetal encontrados en bibliografía que presentan estabilidad térmica al igual que el YBPTI son: el inhibidor de *Hyptis suaveolens* (HSTI, 8,7 kDa) (Aguirre, Valdés-Rodríguez, Mendoza-Hernández, Rojo-Domínguez, & Blanco-Labra, 2004), el inhibidor de *Cajanus cajan* (C11PI, 8,3 kDa) (Swathi et al., 2014), el inhibidor de *Clitoria fairchildiana* (CFPI, 7,9 kDa) (Dantzger et al., 2015), el inhibidor de *Maclura pomífera* (MpBBI, 6,6 kDa) (Indarte et al., 2017), el inhibidor de *Luetzelburgia auriculara* (LzaBBI, 14,3 kDa) (Martins et al., 2018), el inhibidor de *Rhynchosia sublobata* (RsBBI1, 9,97 kDa) (Mohanraj, Tetali, Mallikarjuna, Dutta-Gupta, & Padmasree, 2018), y el inhibidor de *Capsicum annuum* var. chilli pepper (CaTI, 6 kDa) (Ribeiro et al., 2012). Este último pertenece a la misma especie que el inhibidor de tripsina aquí estudiado (*Capsicum annuum*) pero de la variedad “chilli pepper”, diferente a la variedad de morrón amarillo elegida para nuestro ensayo. Sin embargo, dada la proximidad entre sus pesos moleculares y al hecho de que ambos son inhibidores termoestables, decidimos continuar con la caracterización del inhibidor de carboxipeptidasa A, dejando el estudio del YBPTI para ser continuado a futuro.

Decidimos priorizar la naturaleza única del inhibidor de carboxipeptidasa A por sobre el estudio de un nuevo inhibidor de serín proteasas, ya que éstos son los más estudiados de todas las familias de IPPs.

2.3.2.4 Purificación y caracterización parcial del inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo (YBPCI)

2.3.2.4.1 Purificación del inhibidor de carboxipeptidasa A aislado a partir de morrón amarillo

Para la purificación del inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo, el extracto crudo sometido a tratamiento térmico a 100 °C durante 5 minutos (MATT100) se sembró en una columna de afinidad especialmente diseñada por inmovilización de carboxipeptidasa A en gel de glioxil-agarosa. Esta metodología permite una alta purificación específica basada en la interacción molecular entre la matriz de CPA-glioxil-agarosa y el inhibidor de CPA, que otorga un rendimiento elevado de purificación del inhibidor.

En la Figura 2.2.14 se puede observar la presencia de una fracción eluida a pH 3, con elevada actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A, a la que denominamos YBPCI (inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo).

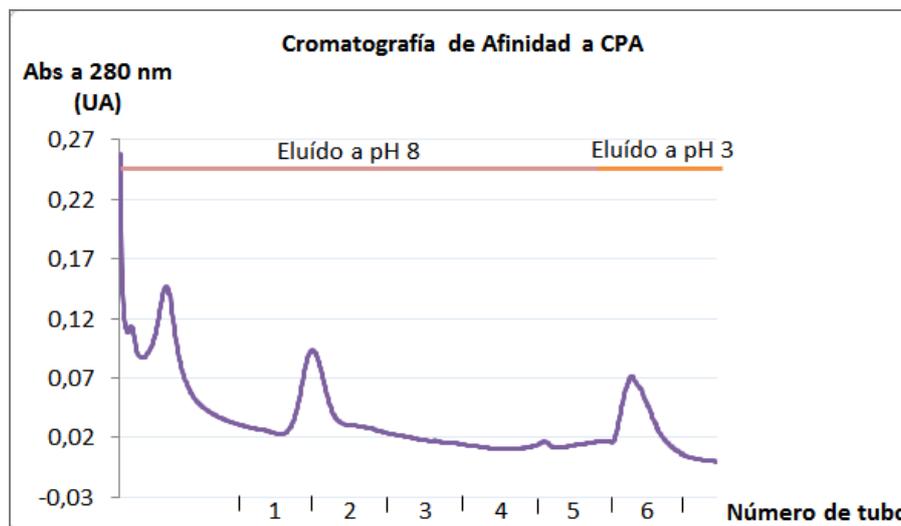


Figura 2.2.14: Cromatografía de afinidad a carboxipeptidasa A. El cromatograma nos muestra una fracción no retenida que es eluida a pH 8 y una fracción retenida que es eluida a pH 3.

Los resultados obtenidos en el proceso de purificación muestran que con el tratamiento térmico (MATT100) se obtuvo una preparación parcialmente purificada con un rendimiento del 85%, mientras que la fracción obtenida por cromatografía de afinidad alcanzó un grado de purificación de 115 veces con respecto al extracto crudo con un rendimiento del 29% respecto del extracto crudo de partida (Tabla 2.2.5).

Tabla 2.2.5: Purificación del inhibidor de CPA de morrón amarillo.

Paso de Purificación	Volúmen (ml)	Proteínas totales (mg)	CP (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	AI total (mU)	AIE (mU/mg)	Pureza	Rendimiento (%)
Extracto (MAEC)	100	40	400	46,4	756	19	1	100
Tratamiento a 100 °C (MATT100)	25	5	200	6,7	647	129	6,8	85
Cromatografía de afinidad (YBPCI)	6,2	0,1	16	0,9	218	2180	114,7	29

CP: Concentración proteica

AI: Actividad inhibitoria

AIE: Actividad inhibitoria específica

2.3.2.4.2 Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta

Se realizó también una curva dosis-respuesta para determinar la potencia de la inhibición de carboxipeptidasa A, y los valores de IC₅₀ se calcularon de acuerdo con (Tellechea, García-Pardo, Cotabarren, Lufrano, Avilés, Obregón, Lorenzo, & Tanco, 2016) (Figura 2.2.15).

Se encontró que el tratamiento térmico a 100 °C del extracto de morrón amarillo producía un valor de **IC₅₀ de 6,7 µg/ml** debido a la eliminación de proteínas lábiles al calor, provocando una mayor actividad inhibidora específica.

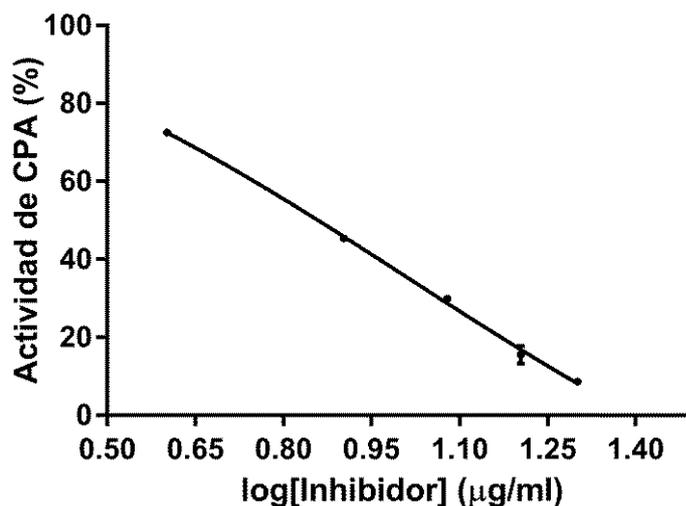


Figura 2.2.15: Relación dosis-respuesta para el inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo parcialmente purificado.

2.3.2.4.3 Ensayos de estabilidad

2.3.2.4.3.1 Estabilidad a valores extremos de pH

A valores de pH extremos, la fuerte repulsión electrostática intramolecular causada por una alta carga neta da como resultado el desplegamiento y desnaturalización de las moléculas proteicas. Los puentes disulfuro intramoleculares son presumiblemente responsables de la estabilidad funcional de algunos IPPs en presencia de diversos agentes desnaturalizantes físicos y químicos, como el pH, la temperatura y los agentes reductores. La estabilidad del extracto tratado a 100 °C frente a las variaciones de pH se investigó mediante incubación de las muestras a valores extremos de pH (Figura. 2.2.16). Se observó que el YBPCI parcialmente purificado presentaba una alta estabilidad a valores de pH extremos, siendo ligeramente menos estable a pH 2.

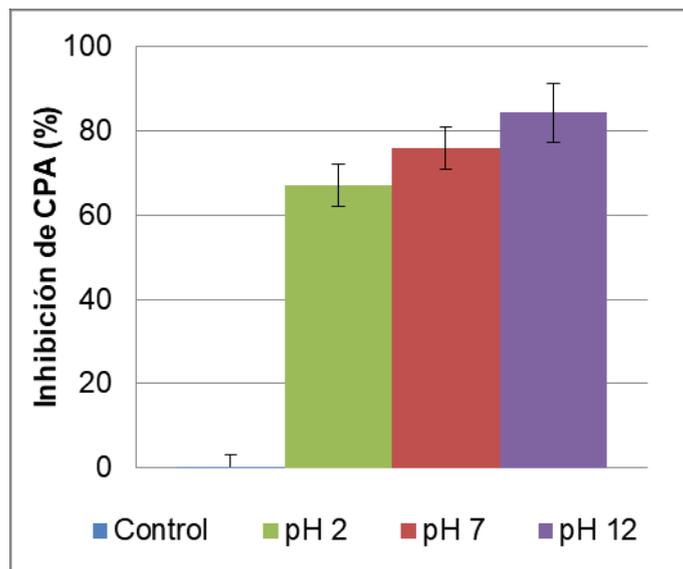


Figura 2.2.16: Efecto del pH en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.

Resultados similares fueron informados para inhibidores de serín proteasas, sin embargo, no fue posible encontrar datos publicados referidos a la estabilidad al pH de los inhibidores de CPA, por lo tanto este trabajo representa la primera contribución al estudio sobre la estabilidad de los inhibidores de CPA frente al pH.

2.3.2.4.3.2 Estabilidad a concentraciones de NaCl

Se evaluó también el efecto del NaCl sobre la actividad inhibidora del extracto tratado a 100 °C. Como se observa en la Figura 2.2.17, no se encontraron cambios marcados en la actividad inhibidora cuando se añadió NaCl a concentraciones de 0,5 M y 2 M. Estos resultados mostraron que el YBPCI parcialmente purificado presentaba una alta estabilidad salina, siendo esta una nueva prueba de la gran estabilidad de esta molécula.

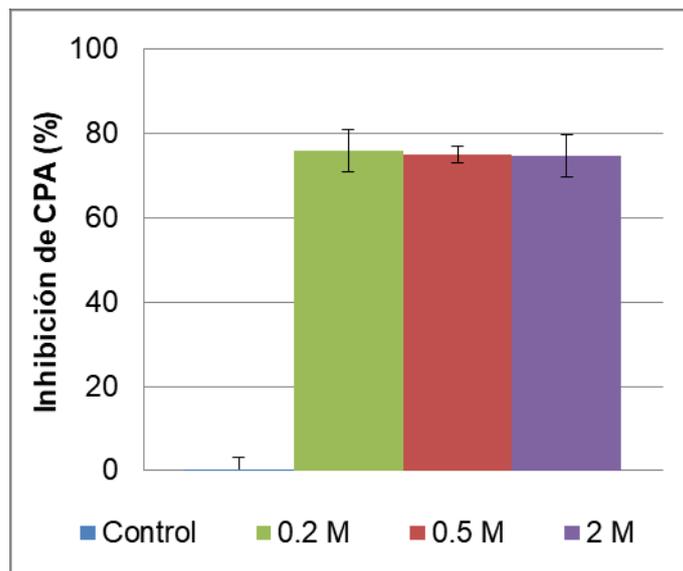


Figura 2.2.17: Efecto de la adición de NaCl en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.

2.3.2.4.3.3 Efecto de la digestión gastrointestinal en la estabilidad del inhibidor

Se ha reconocido que las proteínas y los péptidos de la dieta son susceptibles a la hidrólisis durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal, es decir, la ingestión, la digestión y la absorción (Vermeirssen, Van Camp, & Verstraete, 2004). Una vez ingeridos, estas proteínas y péptidos se someten a hidrólisis por diferentes enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, como pepsina, tripsina, quimotripsina y peptidasas de la superficie de las células epiteliales para liberar péptidos de diferentes longitudes (Tobey, Heizer, Yeh, Huang, & Hoffner, 1985). Algunos de estos péptidos pueden ejercer una función directa en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, otros péptidos se pueden absorber para alcanzar los órganos y tejidos diana a través de la circulación sistémica (Shimizu, 2004).

Con el fin de examinar el efecto de las proteasas gastrointestinales sobre la estabilidad de YBPCI, se llevó a cabo la digestión simulada con pepsina y pancreatina de acuerdo con (Hernández-Ledesma, Quirós, Amigo, & Recio, 2007) (Figura 2.2.18).

Se encontró una elevada actividad inhibitoria luego de la simulación gastrointestinal en las muestras sometidas a tratamiento a 100 °C, sugiriendo que YBPCI podría llegar al colon en forma intacta. Los experimentos con miniproteínas tipo cysteín-knot (Treggiari et al., 2017) y el inhibidor de Bowman-Birk de soja

(Losso, 2008) mostraron que estas moléculas entraban en la circulación a través de las células epiteliales intestinales o el mecanismo paracelular, abriendo nuevas perspectivas sobre posibles aplicaciones clínicas para la administración oral de IPPs, sobre todo aquellos que no interfieren con la acción digestiva de las principales proteasas involucradas en dicho proceso (tripsina y quimotripsina).

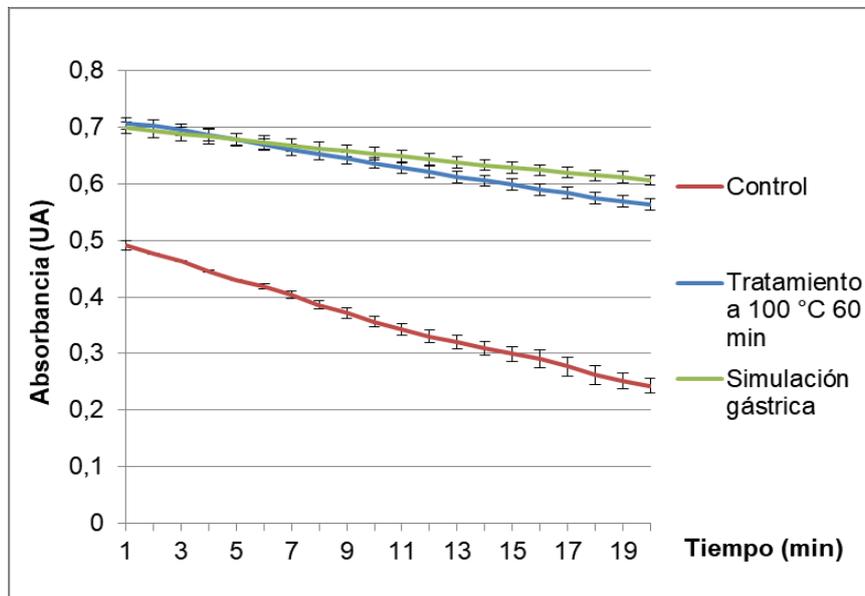


Figura 2.2.18: Efecto de la simulación gástrica *in vitro* en la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado.

En nuestro trabajo, demostramos la estabilidad del YBPCI parcialmente purificado frente a la digestión gastrointestinal simulada, a través de ensayos de inhibición cinética y curvas dosis-respuesta en YBPCI digerido. Aunque la digestión gastrointestinal *in vitro* se ha evaluado en otras miniproteínas tipo cysteín-knot (Treggiari et al., 2017), nuestro trabajo representa la primera evidencia de actividad inhibidora de proteasa intacta de una miniproteína tipo cysteín-knot después de la simulación gastrointestinal, en nuestro caso YBPCI, aportando nueva información y datos que se suman a los conocimientos previos reportados de estabilidad fisicoquímica de IPPs.

2.3.2.5 Caracterización del YBPCI purificado

2.3.2.5.1 Determinación de la masa molecular

La masa molecular del inhibidor de carboxipeptidasa A purificado por cromatografía de afinidad se estimó basándose en el análisis de SDS-PAGE (aproximadamente 4 kDa).

La espectrometría de masas MALDI-TOF/MS se utilizó para la determinación de la masa molecular exacta del inhibidor (Figura 2.2.19). Por lo tanto, el peso molecular se confirmó y se determinó con precisión (4057 Da) y fue del orden de las masas de inhibidores de la carboxipeptidasa ya estudiados (imaPCI: 4234 Da; PCI: 4295 Da; NvCI: 5945 Da; LCI: 7326 Da; ACI: 7724 Da; TCI: 7935 Da; H1TCI: 8400 Da).

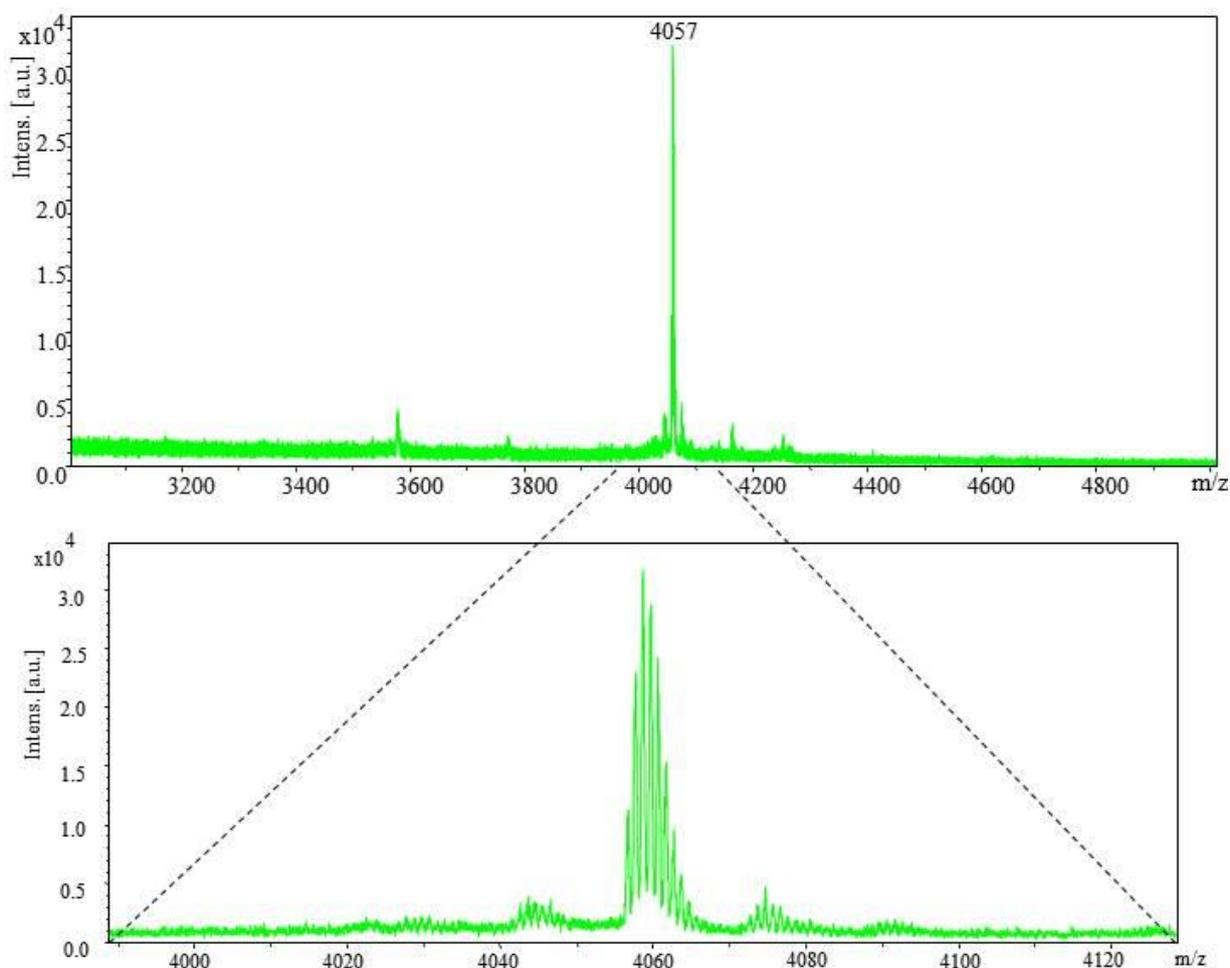


Figura 2.2.19: Espectrometría de masas MALDI-TOF realizada sobre la muestra de inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo (YBPCI).

2.3.2.5.2 Identificación proteica mediante PMF-MALDI-TOF

La digestión con tripsina del YBPCI purificado se analizó mediante MALDI-TOF MS. La herramienta de búsqueda MASCOT (URL <http://www.matrixscience.com>) se usó para la identificación de mapas trípticos. El rango de pesos moleculares empleados para el análisis de la huella digital de masa peptídica (PMF) de péptidos digeridos con tripsina de YBPCI, fue entre 1000 Da y 4000 Da. No se encontraron coincidencias con otros inhibidores de plantas, con lo que se confirma la naturaleza única de YBPCI y representa el primer inhibidor de metaloproteasas aislado de *Capsicum annuum*. La identificación y diferenciación de proteínas mediante PMF se ha adoptado en nuestro grupo de investigación como una excelente herramienta para diferenciar, de manera rápida e inequívoca, las proteasas y los inhibidores de la proteasa con propiedades fisicoquímicas y funcionales muy similares.

2.3.2.5.3 Determinación de la IC_{50} : curva dosis-respuesta

Se realizó una curva dosis-respuesta para determinar la potencia de la inhibición de la carboxipeptidasa A, y el valor de IC_{50} se calculó de acuerdo con Tellechea, García-Pardo, Cotabarrén, Lufrano, Avilés, Obregón, Lorenzo, & Tanco, 2016 (Figura 2.2.20). El valor de IC_{50} obtenido para el YBPCI purificado fue de **0,9 $\mu\text{g/ml}$** , lo que da como resultado una actividad inhibidora específica mayor que la del YBPCI parcialmente purificado.

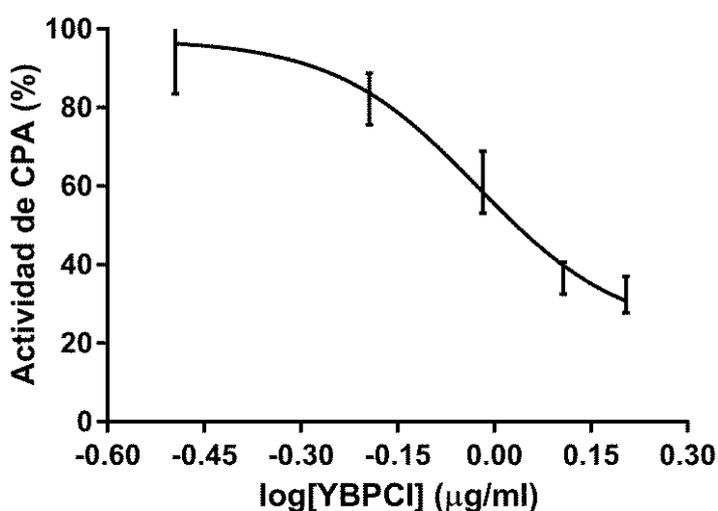


Figura 2.2.20: Relación dosis-respuesta para el inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo.

2.3.3 CONCLUSIONES

El descubrimiento de inhibidores de proteasas naturales representa un desafío importante para las investigaciones en medicina y en la ciencia de los alimentos.

En este trabajo de tesis doctoral informamos el primer inhibidor de metaloproteasas aislado de *Capsicum annuum*, y demostramos la estabilidad del inhibidor a altas temperaturas, elevadas concentraciones salinas y valores extremos de pH. Aunque esta característica se ha estudiado en otros péptidos tipo *knot*, principalmente en ciclótidos de otro tipo mecanístico, los resultados de este trabajo representan el primer estudio publicado sobre miniproteínas estables de tipo MCPI. Además, es el primer informe sobre la estabilidad de estas moléculas frente a la digestión gastrointestinal simulada, lo que sugiere que dichos IPs podrían alcanzar el colon y ser absorbidos en forma intacta, fomentando así el estudio de posibles aplicaciones farmacéuticas como formulaciones antiparasitarias y/o antibacterianas naturales. Nuestro trabajo además, contribuye a la comprensión de la estabilidad de IPs, representando la primera demostración de una miniproteína tipo cisteín *knot* que conserva la actividad inhibidora intacta después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Investigaciones previas han demostrado que algunos IPs llegan a la circulación sistémica a través de las células epiteliales intestinales utilizando mecanismos de transporte paracelular y transcelular. En base a esto se propone el desarrollo de formulaciones orgánicas o la ingesta controlada de vegetales ricos en MCPIs como una estrategia natural para el tratamiento de múltiples patologías: angiogénesis, trombosis, cáncer, malaria, parásitos. También podría representar una forma natural de control de la salud en la población general.

Para determinar si el consumo de alimentos ricos en MCPIs es compatible con la actividad biológica de estas miniproteínas *in vivo* tal como la encontramos *in vitro*, se requiere una evaluación experimental adicional y específica. Estos estudios podrán ser desarrollados a futuro, en el marco de la Beca Posdoctoral CONICET que me sido otorgada recientemente.

Capítulo 3:

Purificación y caracterización bioquímica del primer inhibidor de papaína aislado a partir de semillas de Moringa (*Moringa oleifera* L.)

En el presente capítulo se abordará el estudio de fracciones proteicas obtenidas a partir de semillas de Moringa oleifera. Dicha investigación dio lugar a la publicación de resultados parciales en la Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias perteneciente al Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana (“Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana y anticoagulante de extractos peptídicos de semillas de Moringa oleifera L.”. Juan Abreu Payrol, Walter D. Obregón, Santiago Claver, Juliana Cotabarren. ECFA, 2017, ISSN 2411-927X, Vol. 3, pp 236) y en el Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research (“Isolation and purification of a novel antimicrobial and heat-resistant cysteine protease inhibitor from Moringa oleifera L. seeds”. Gonzalo Cabrerizo, Maria Luz Baffico, Santiago Claver, Juan Abreu Payrol, Walter David Obregón, Juliana Cotabarren. Fapronatura, 2018, ISSN 0719-4250, en prensa), recibiendo en este último caso un certificado de reconocimiento por su calidad científica y excelente presentación. Tanto los ensayos de actividad anticoagulante, como los de actividad antimicrobiana fueron realizados en colaboración con el Bioq. Santiago Claver, a quien agradecemos su participación técnica y asesoramiento. Adicionalmente, estudios bibliográficos realizados para el desarrollo de este capítulo permitieron la publicación de un capítulo del libro “Phytochemistry” (“Cysteine proteases from plants and its applications”. Juan Abreu

*Payrol, Walter David Obregón, Juliana Cotabarren, T. B. Mutsauri, I. Rubio Vargas.
Phytochemistry, Vol. 3, Cap. 9, 2018, ISBN: 978-1-77188-761-8).*

INDICE CAPITULO 3

3.1 Introducción.....	185
<i>Importancia de la búsqueda de péptidos con actividad anticoagulante y/o antimicrobiana.....</i>	<i>185</i>
3.1.1 Cisteín proteasas.....	187
3.1.1.1 <i>Clasificación de las cisteín proteasas.....</i>	<i>187</i>
3.1.1.2 <i>Función general de las cisteín proteasas de plantas.....</i>	<i>188</i>
3.1.1.3 <i>Patologías asociadas a las cisteín proteasas.....</i>	<i>188</i>
3.1.2 Inhibidores de cisteín proteasas.....	191
3.1.2.1 <i>Clasificación de las cistatinas.....</i>	<i>192</i>
3.1.2.1.1 <i>Familia estefina (cistatinas tipo 1).....</i>	<i>193</i>
3.1.2.1.2 <i>Familia cistatina (cistatinas tipo 2).....</i>	<i>193</i>
3.1.2.1.3 <i>Familia quinínogeno (cistatinas tipo 3).....</i>	<i>193</i>
3.1.2.1.4 <i>Familia fitocistatinas (cistatinas tipo 4).....</i>	<i>194</i>
3.1.2.1.4.1 <i>Rol biológico de las fitocistatinas.....</i>	<i>195</i>
3.1.2.1.4.2 <i>Potenciales aplicaciones generales de las fitocistatinas.....</i>	<i>195</i>
3.1.2.1.4.2.1 <i>Fitocistatinas como agentes biopesticidas.....</i>	<i>196</i>
3.1.2.1.4.2.2 <i>Fitocistatinas como nutraceuticos.....</i>	<i>198</i>
3.2 Materiales y métodos.....	201
3.2.1 <i>Material vegetal.....</i>	<i>201</i>
3.2.2 <i>Metodología.....</i>	<i>202</i>
3.2.2.1 <i>Preparación de extracto crudo.....</i>	<i>202</i>
3.2.2.2 <i>Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976).....</i>	<i>202</i>
3.2.2.3 <i>Determinación de actividad inhibitoria de papaína.....</i>	<i>202</i>
3.2.2.3.1 <i>Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta.....</i>	<i>203</i>
3.2.2.4 <i>Purificación.....</i>	<i>204</i>
3.2.2.4.1 <i>Purificación parcial mediante tratamiento térmico.....</i>	<i>204</i>
3.2.2.4.2 <i>Purificación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad.....</i>	<i>204</i>

3.2.2.4.2.1 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa.....	204
3.2.2.4.2.2 Desarrollo de la cromatografía de afinidad a papaína...	204
3.2.2.5 Caracterización.....	205
3.2.2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	205
3.2.2.5.2 Caracterización de actividades biológicas.....	205
3.2.2.5.2.1 Actividad anticoagulante.....	205
3.2.2.5.2.1.1 Determinación del tiempo de Protrombina.....	205
3.2.2.5.2.1.2 Determinación del tiempo de Tromboplastina Parcial activado.....	206
3.2.2.5.2.2 Actividad antimicrobiana.....	206
3.2.2.5.2.2.1 Ensayo de difusión en agar.....	206
3.2.2.5.2.2.2 Ensayo de resazurina en microplaca (viabilidad celular).....	207
3.3 Resultados y discusión.....	208
3.3.1 Actividad inhibitoria de papaína del Extracto Crudo.....	208
3.3.2 Purificación del inhibidor de papaína aislado a partir de <i>Moringa oleifera</i>	209
3.3.2.1 Purificación parcial mediante tratamiento térmico.....	209
3.3.2.1.1 Actividad inhibitoria de papaína.....	210
3.3.2.2 Purificación mediante cromatografía de afinidad.....	212
3.3.3 Caracterización del inhibidor de papaína de <i>Moringa oleifera</i> (MoPI).....	214
3.3.3.1 Determinación de la masa molecular.....	214
3.3.3.2 Determinación de la IC ₅₀ : curva dosis-respuesta.....	214
3.3.3.3 Evaluación preliminar de actividades biológicas.....	215
3.3.3.3.1 Actividad anticoagulante.....	215
3.3.3.3.2 Actividad antimicrobiana.....	216
3.3.3.3.2.1 Ensayo de difusión en agar.....	216
3.3.3.3.2.2 Ensayo de resazurina en microplaca (viabilidad celular).....	221
3.4 Conclusiones.....	223

3.1 INTRODUCCIÓN

Importancia de la búsqueda de péptidos con actividad anticoagulante y/o antimicrobiana

La coagulación de la sangre es un proceso complejo y delicadamente equilibrado que resulta de una serie ordenada de reacciones bioquímicas, en el cual existe participación e interacción entre células y proteínas (factores de coagulación), para formar un coágulo insoluble en los sitios de lesión vascular. Aunque este proceso dinámico representa una respuesta ventajosa después de un traumatismo vascular localizado, la formación de coágulos también puede ser indeseable. Por ejemplo, la trombosis dentro de los lechos coronarios o cerebrovasculares es la causa próxima de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular isquémico, respectivamente. Además, los procedimientos comunes como la intervención coronaria percutánea, la hemodiálisis, la aféresis de la sangre, el reemplazo de válvulas cardíacas y los sistemas de soporte circulatorio extracorpóreo incitan a la coagulación. En consecuencia, el desarrollo de agentes farmacológicos que atenúen la formación de coágulos de manera segura y efectiva es un objetivo atractivo para los clínicos y la industria farmacéutica (Weitz, Howard, Becker, Rusconi, & Becker, 2007).

Entre los fármacos utilizados con mayor frecuencia para la prevención y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades cardiovasculares, se encuentran los anticoagulantes y antiplaquetarios. Los anticoagulantes disponibles actualmente están limitados por los beneficios terapéuticos modestos, las aplicaciones clínicas limitadas, el aumento del riesgo de sangrado y la trombofilia inducida por fármacos (Weitz et al., 2007).

Se han identificado varios compuestos proteicos anticoagulantes y antiplaquetarios de diversas fuentes naturales (Chen et al., 2015). En los últimos años se han hecho notables avances para desarrollar nuevos medicamentos antitrombóticos (Res, Zhou, & Guo, 2018). Los anticoagulantes naturales encontrados en los sistemas biológicos se han desarrollado bajo control genético con secuencias estructurales particulares para regular los eventos de coagulación. A pesar de los medios tradicionales para identificar compuestos anticoagulantes ya

existentes a partir de diferentes fuentes, sólo se han realizado algunos esfuerzos para desarrollar nuevos anticoagulantes a partir de recursos biológicos naturales (Rajapakse, Jung, Mendis, Moon, & Kim, 2005).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, antimicrobial peptides) de plantas han sido foco de investigación por años, alcanzando un 12% de los péptidos depositados en la base de datos APD (Antimicrobial peptide database, <http://aps.unmc.edu/AP>). Los AMPs de plantas se clasifican en siete familias en función de su similitud de secuencia y los motivos cisteínicos. En la Tabla 3.1 se presenta una versión actualizada de dicha clasificación, donde los ciclótidos y las snakinas fueron agregadas como dos nuevos grupos. Adicionalmente, el descubrimiento y caracterización de nuevos péptidos tipo MBP (myelin basic protein) llevó al nombramiento de una nueva familia, los péptidos tipo horquilla. A diferencia de la mayoría de los AMPs de plantas, los péptidos tipo horquilla presentan una estructura distintiva, donde las dos hélices se encuentran juntas y estabilizadas por puentes disulfuro (Ryazantsev et al., 2014).

Tabla 3.1: Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMPs) de plantas. Basada en la base de datos Antimicrobial Peptide Database (APD, <http://aps.unmc.edu/AP>) de Julio 2016.

Grupo	Péptidos de plantas	Cantidad	Número de cisteínas	Ejemplos
1	Defensinas	78	4, 6 o 8	NaD1, PhD1, Rs-AFP1
2	Tioninas	13	4, 6 o 8	Tu-AMP1, Cp-tionina II
3	Proteínas de transferencia de lípidos	3	2, 4 o 8	Cc-LTP1, LTP110
4	Péptidos tipo Heveína	6	8 o 10	Pn-AMP1, WAMP-1
5	Péptidos tipo knot	4	6	PAFP-S; Mj-AMP2
6	Péptidos ricos en glicina	5	0, 1 o 6	Sheperina I, Pg-AMP1
7	Péptidos tipo horquilla	3	4	MBP-1, EcAMP1
8	Ciclótidos	160	6	Kalata B1, Cliótido 20
9	Snakinas	6	12	Snakina-1; Snakina-Z

En los últimos años se han reportado numerosos péptidos y proteínas con actividad inhibitoria de proteasas, que además presentan actividad antimicrobiana. Esto sugiere un rol adicional a dichas moléculas en la inmunidad innata de las plantas, profundizando esta acción en la germinación de semillas. Podríamos considerar de esta manera a algunos IPPs de plantas como nuevos compuestos pertenecientes al grupo 10 de la tabla de clasificación de AMPs.

3.1.1 CISTEIN PROTEASAS

Las cistein proteasas (CPs), también conocidas como tiol-proteasas, se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos, siendo encontradas tanto en procariontas como eucariotas. En esta clase de enzimas proteolíticas se incluyen las proteasas vegetales más extensamente estudiadas, tales como papaína, quimiopapaína, ficina, actinidina, bromelina; varias catepsinas de mamíferos (catepsina B, H, L, S y K), calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma* (Turk et al., 1997).

La mayoría de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína (Grudkowska & Zagdańska, 2004), que es la enzima cisteínica más estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la enzimología en general. Ha sido la primera proteinasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth et al., 1971), por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas. Si bien las CPs han sido extensamente caracterizadas en *Arabidopsis*, sólo unas pocas han sido investigadas en otras especies vegetales (Parisi, Moreno, & Luja, 2002; Beyene, Foyer, & Kunert, 2006).

3.1.1.1 Clasificación de las cisteín proteasas

Las CPs (EC 3.4.22), endopeptidil hidrolasas con un residuo de cisteína en su centro activo, son usualmente identificadas basándose en el efecto de sus inhibidores en el sitio activo (yodoacetato, yodoacetamida y E-64) y en la activación de las enzimas por compuestos de tipo tiol o compuestos tiólicos.

Rawlings y colaboradores (Rawlings et al., 2018), quienes basaron la clasificación de las proteinasas en la relación estructural y evolutiva, han agrupado

las enzimas en familias y clanes. La clasificación propuesta por estos autores se actualiza continuamente en la base de datos MEROPS. Las CPs se marcan con el prefijo C y comprenden más de 40 familias de peptidasas agrupadas en al menos seis superfamilias o clanes. La mayoría de las CPs vegetales pertenecen a las familias de la papaína (C1) y las leguminasas (C13). Los miembros de las cisteín proteasas: caspasas (familia C14) y calpaínas, las proteasas dependientes de calcio (familia C2), ubiquitina hidrolasas C-terminales (familia C12) y proteinasas específicas de ubiquitina (C19), los componentes de la vía dependiente de ubiquitina-proteasoma que catalizan la desubiquitinación de proteínas, también se han detectado en plantas (Vierstra, 2003).

3.1.1.2 Función general de las cisteín proteasas de plantas

En las plantas, las CPs están involucradas en la maduración, degradación y reconstrucción de proteínas en respuesta a diversos estímulos externos y también desempeñan una función de regulación interna para eliminar proteínas defectuosas mal plegadas. Se ha demostrado que las CPs están implicadas en la proteólisis durante la senescencia (Diaz-mendoza et al., 2016), durante la sequía (Botha et al., 2017) y durante la muerte celular programada (Lemos Rocha et al., 2017). También desempeñan un papel en la acumulación de proteínas de almacenamiento en semillas y en la movilización de proteínas de reserva (Gruis, Schulze, & Jung, 2004). Por lo tanto, participan tanto en procesos anabólicos como catabólicos y participan en las vías de señalización, así como en la maduración, degradación y reconstrucción de proteínas en respuesta a diferentes estímulos externos (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

3.1.1.3 Patologías asociadas a las cistein proteasas

Las cisteín proteasas participan en diversos procesos biológicos (Malgorzata, Dorota, & Justyna, 2004; Vasiljeva et al., 2007). Las catepsinas solas están involucradas en la descomposición de proteínas en los lisosomas, presentación de antígenos, procesamiento proteolítico de proenzimas y prohormonas, fertilización, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Reiser, Adair, & Reinheckel, 2010; Cocchiaro et al., 2016; Pezhman, Hosseini, Ostadhosseini, Varnosfaderani, & Sefid, 2017). Se ha informado que el desequilibrio en la actividad de las CPs endógenas

puede conducir a numerosas patologías como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, los trastornos neurológicos, los tumores y la osteoporosis (I Berdowska & Siewinski, 2000) (Tabla 3.2). Las CPs producidas por bacterias patógenas se consideran factores importantes de virulencia y se ha postulado su papel en el desarrollo de muchas enfermedades, p. ej. paradontosis (Grzegorz Dubin, 2002; Pires et al., 2016; Memmert et al., 2017). Las proteasas cisteínicas tipo papaína han sido identificadas como claves en patologías relacionadas con desórdenes degenerativos, invasivos y del sistema inmune (Honey & Rudensky, 2003; Stoch & Wagner, 2008; Deal, 2009). La catepsina K tiene como principal acción la degradación del hueso en los osteoclastos y su inhibición selectiva puede ser beneficiosa en el tratamiento de la osteoporosis y en ciertas formas de artritis (Dung et al., 2016; Drake, Clarke, Oursler, & Khosla, 2017; Yamashita et al., 2018). Se ha demostrado también que la catepsina S desempeña un rol fundamental en la presentación de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) ya que la inhibición de la catepsina S disminuye significativamente la respuesta a antígenos, hecho que convierte a esta enzima en un nuevo blanco para drogas contra el asma y ciertas enfermedades autoinmunes (Zhou, 2016; Edman et al., 2018). Las catepsinas han sido también relacionadas en procesos de invasión tumoral y en las metástasis (Tamhane, Lu, Maelandsmo, Haugen, & Brix, 2016).

Tabla 3.2: Niveles alterados de CPs en patologías humanas. (↑) Expresión incrementada de CPs comparada con los niveles normales, (↓) Expresión disminuida de CPs comparada con los niveles normales, (=) Sin diferencias significativas en la expresión de CPs respecto a los niveles normales. Tabla tomada de Izabela Berdowska, 2004.

Patología	CP	Material	Nivel de expresión
<i>Cáncer</i>			
Cáncer de mama	CatB, L	Tejidos y líneas celulares	↑
	CatH	Tejidos y suero	↑
Cáncer de ovario	CatB	Tejidos	↑
	CatB	Suero	↑
	CatL	Suero	↑
Cáncer de cuello uterino	CatB	Tejidos y suero	↑
Cáncer de próstata	CatB, H, S	Tejidos y líneas celulares	↑
	CatB, L	Tejidos	↓
	CatH	Tejidos	=
	CatB, L, H	Cultivos celulares	↑

Cáncer de vejiga	CatB	Plasma y orina	↑
	CatB	Orina	=
	CatL	Orina	↑
Cáncer colorectal	CatB	Tejidos	↑
	CatH, L	Tejidos	↑
Cáncer gástrico	CatB, L	Tejidos	↑
Cáncer de páncreas	CatB	Tejidos	↑
	CatH	Células SK-PC-1	↑
Cáncer de hígado	CatB	Tejidos	=
Cáncer de pulmón	CatB, L	Tejidos	↑
	CatC	Tejidos	=
	CatH	Tejidos	↓
	CatH	Suero	↑
	CatS	Tejidos	↑
	CatS	Suero	=
Cáncer de cerebro	CatB, L, H	Tejidos	↑
Cáncer de cabeza y cuello	CatB, L	Tejidos	↑
	CatH	Tejidos	↓
Melanoma	CatB, H	Suero	↑
	CatB	Tejidos	↑
	CatL	Tejidos	↑
	CatB, L, H	Tejidos	↑
	CatH	Tejidos	↓
Cáncer de riñón	CatB, C, H, L, S	Tejidos	↓
Cáncer de útero	CatL	Suero	=
	CatL	Tejidos	↓
Cáncer de tiroides	CatB	Tejidos	↑
<i>Otras patologías</i>			
Aterosclerosis	CatK, S	Arterias	↑
Miopatías inflamatorias	CatB, L, H, S	Músculo	↑
Sarcoidosis	CatB	Músculo	↑
Alzheimer, demencia	CatB, L, H, S	Cerebro	↑
Artritis reumatoide	CatB, L	Membrana y fluido sinovial	↑
	CatB, L, H, C	Plasma	=
Osteoartritis	CatB	Cartílago	↑
Periodontitis	CatB, L	Tejido	↑
Asma	CatH	Suero	↑
	CatB, L	Suero	=

También se ha observado con gran interés la participación de las proteasas cisteínicas en un amplio rango de enfermedades parasitarias como la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis (Rosenthal, 2011; Ndao et al., 2013). Las proteasas cisteínicas tipo papaína cumplen en los organismos parásitos roles indispensables en el crecimiento, diferenciación celular, señalización e invasión al huésped y actúan frecuentemente como factor de virulencia, atacando al sistema inmune del huésped (Sajid & McKerrow, 2002).

Por lo expuesto anteriormente, el control preciso de los procesos proteolíticos es esencial para el funcionamiento apropiado de células y organismos completos. Esto se logra en muchos niveles, desde la regulación de la expresión de la proteasa, la secreción y la maduración, a través de la degradación específica de las enzimas maduras, hasta el bloqueo de su actividad por inhibición.

Debido a las posibles aplicaciones de los inhibidores selectivos de proteasas como agentes terapéuticos, los mecanismos que subyacen a la inhibición están siendo investigados a fondo.

3.1.2 INHIBIDORES DE CISTEÍN PROTEASAS

Los inhibidores de cisteín proteasas se denominan cistatinas. Las cistatinas comprenden una superfamilia de proteínas relacionadas evolutivamente ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se producen en los Dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eukaryota* (Kordis & Turk, 2009).

Estas proteínas son inhibidores competitivos, capaces de inhibir de manera reversible las cisteínas proteinasas de las familias tipo C1A y tipo C13 de legumina (Alan J Barrett, 1987; Vito Turk & Turk, 2008; van Wyk et al., 2016). Las cistatinas actúan como pseudo-sustratos, se unen estrechamente a la hendidura del sitio activo de las cisteín proteasas e inactivan sus enzimas blanco. Los miembros de esta superfamilia tienen el típico pliegue de cistatina, que se caracteriza por una hélice- α N-terminal envuelta por una lámina- β antiparalela de cinco cadenas (Vito Turk & Turk, 2008). Los puntos de contacto de la cistatina con la proteasa diana similar a la papaína involucran una estructura tripartita en forma de cuña, que incluye uno o dos residuos de Gly conservados, ubicados en la región N-terminal flexible, y dos bucles de horquilla, el primer bucle que contiene el motivo QxVxG y el segundo un residuo aromático conservado (Trp o His) (M T Stubbs et al., 1990; Jenko et al., 2003; Renko et al., 2010) (Figura 3.1).

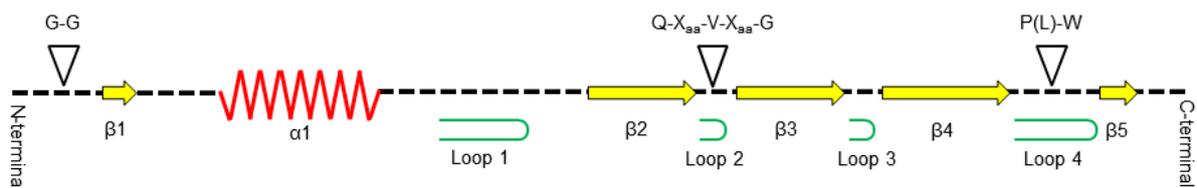


Figura 3.1: Esquema de la estructura característica de las cistatinas. Las flechas amarillas representan las láminas beta (1-5), el zigzag rojo representa la hélice alfa y los segmentos verdes representan los "Loops" (1-4). Las regiones señaladas contienen residuos aminoacídicos involucrados en la interacción con la proteasa target. X_{aa} refiere a cualquier aminoácido.

La primera cistatina que se aisló fue un inhibidor de papaína y ficina caracterizado para la clara de huevo de gallina (Sen & Whitaker, 1973). El nombre "cistatina" fue propuesto por primera vez por Alan J Barrett en 1987 y luego se usó para describir proteínas homólogas en la misma superfamilia (Barrett et al., 1986).

3.1.2.1 Clasificación de las cistatinas

La superfamilia de las cistatinas abarca proteínas que contienen múltiples secuencias tipo cistatina. Algunos de los miembros son inhibidores activos de cisteín proteasas, mientras que otros han perdido o quizás nunca han adquirido esta actividad inhibitoria.

En los últimos años, se han caracterizado varios miembros nuevos de la superfamilia, incluyendo proteínas de insectos y plantas. Los miembros de la superfamilia cistatina se han encontrado a lo largo de la evolución y miembros de cada familia de la superfamilia están presentes en los mamíferos en la actualidad (V Turk & Bode, 1991). Las proteínas que forman colectivamente la superfamilia de cistatinas se han subdividido en tres familias, a saber, las estefinas (Familia 1), las cistatinas (Familia 2) y los quinínógenos (Familia 3). Las secuencias de proteínas determinadas recientemente indican que la clasificación podría extenderse para incluir familias adicionales. En los tiempos actuales, se ha incluido una cuarta familia que se conoce como fitocistatina e incluye todos los inhibidores de CPs aislados de plantas (T. N. Shamsi et al., 2016).

3.1.2.1.1 Familia estefina (cistatinas tipo 1)

Los miembros de este grupo presentan una única cadena polipeptídica y masas moleculares alrededor de 11 kDa (Habib & Fazili, 2007), con ausencia de puentes disulfuro. Las estefinas son estables a pH neutro y alcalino, presentando además estabilidad térmica. Inhiben papaína y catepsinas B, H y L formando fuertes complejos. Pertenecen al grupo de proteínas precursoras de la envoltura celular cornificada en los queratinocitos y desempeñan un papel en el desarrollo y mantenimiento epidérmico. Además son consideradas como herramientas de diagnóstico para el cáncer (K. D. Kennedy, Anithachristy, Buie, & Borra, 2012).

3.1.2.1.2 Familia cistatina (cistatinas tipo 2)

La principal característica de los inhibidores pertenecientes a esta familia es que presentan dos puentes disulfuro localizados cerca del extremo C-terminal. Consisten en proteínas de masas moleculares entre 13.4-14.4 kDa (Habib & Fazili, 2007) las cuales son sintetizadas conteniendo un péptido señal de 20 aminoácidos, lo cual sugiere que las cistatinas presentan una actividad extracelular (Freije et al., 1991). Los miembros de esta familia presentan en la región central de la secuencia, un segmento conservado "Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly" (donde Xaa es cualquier aminoácido) conocido como "motivo cistatina". Su actividad inhibitoria es similar a la Cys-A e inhiben la papaína, varias cisteín proteasas relacionadas como la papaína, las catepsinas humanas B, H y L, y la dipeptidil peptidasa (Green, Kembhavi, Davies, & Barrett, 1984).

3.1.2.1.3 Familia quinínogeno (cistatinas tipo 3)

La tercer familia de cistatinas se encuentra categorizada en tres clases: quinínógenos de alto peso molecular (HK), con masas moleculares alrededor de 120 kDa; quinínógenos de bajo peso molecular (LK), con masas moleculares de 60-80 kDa y quinínógenos tipo T, con masas moleculares de 68 kDa (Habib & Fazili, 2007). Estas proteínas presentan una repetición en tándem de tres dominios tipo cistatina, con un total de ocho puentes disulfuro. Son marcadores moleculares de disfunción renal y juegan roles esenciales en numerosos sistemas celulares, como propiedades antivirales y antibacterianas, proliferación celular y crecimiento (Filler et al., 2005).

3.1.2.1.4 Familia fitocistatina (cistatinas tipo 4)

Las cistatinas de plantas o fitocistatinas son proteínas pequeñas con masas moleculares alrededor de 12-16 kDa, que tienen la propiedad de inhibir cisteín proteasas de la familia C1A tipo papaína. Estos inhibidores contienen el motivo cistatina en la región central de la cadena polipeptídica, un motivo Pro-Trp (o Leu-Trp) en la región C-terminal y un residuo conservado de Gly en la región N-terminal (Barrett et al., 1986; Turk & Bode, 1991). En estudios realizados del inhibidor de arroz, *oryzacistatin* y sus formas mutantes, se han identificado al motivo Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly como la secuencia primaria de interacción entre el inhibidor y la enzima. Se cree que el motivo Pro-Trp (o Leu-Trp) podría favorecer la interacción secundaria entre el inhibidor y la enzima (Arai, Watanabe, Kondo, Emori, & Abe, 1991). Las propiedades inhibitorias de las fitocistatinas son consecuencia de su unión estrecha y reversible con la enzima “*target*”, que implica una cuña tripartita conservada formada por el extremo N-terminal parcialmente flexible -que contiene uno o dos residuos de glicina- y dos horquillas que llevan un motivo QxVxG conservado y un residuo de triptófano, respectivamente (Benchabane et al., 2010; A. Shamsi & Bano, 2017) (Figura 3.2).

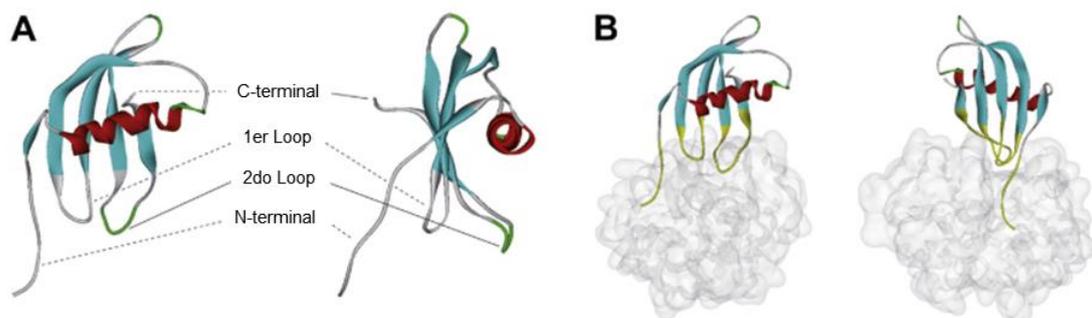


Figura 3.2: Modelos estructurales característicos de las fitocistatinas. (A) En rojo se esquematiza la hélice- α y se señala la región N-terminal, el 1er loop y el 2do loop. (B) Esquema de interacción entre la fitocistatina y la papaína, representada en gris.

3.1.2.1.4.1 Rol biológico de las fitocistatinas

Varios estudios de expresión génica han establecido una clara correlación entre las proteínas de reserva o almacenamiento, la biosíntesis de cistatinas y la regulación negativa de la actividad de cisteín proteasas en los órganos de almacenamiento (Abe, Kondo, & Arai, 1987; Weeda, Mohan Kumar, & Richard Knowles, 2009). Se han descrito patrones de expresión específicos para el desarrollo de las plantas y los tejidos, que sugieren funciones múltiples y complementarias para diferentes variantes de cistatinas y CPs de las semillas de cereales (Corre-menguy, Cejudo, Mazubert, & Vidal, 2002; Massonneau, Condamine, Wisniewski, Zivy, & Rogowsky, 2005; Kiyosaki et al., 2009; Martinez, Cambra, Carrillo, Diaz-Mendoza, & Diaz, 2009), pero la hipótesis de un papel estabilizador de las cistatinas (al menos algunas) en las proteínas de almacenamiento ha surgido constantemente a lo largo de los años (Soichi Arai, Matsumoto, Emori, & Abe, 2002; Hwang et al., 2009; Martinez et al., 2009; Weeda et al., 2009).

La regulación transcripcional de la biosíntesis de cistatinas también desempeñaría un papel en las hojas y otros órganos metabólicamente activos, para el control de las CPs involucradas en diversos procesos, incluido el reciclaje de proteínas durante la senescencia y la activación de cascadas metabólicas protectoras en condiciones de estrés abiótico (Sugawara et al., 2002; Etienne et al., 2007; Zhang et al., 2008). El impacto positivo de las cistatinas expresadas ectópicamente en la aptitud general de las plantas transgénicas cultivadas en condiciones adversas (Van der Vyver et al., 2003; Prins, van Heerden, Olmos, Kunert, & Foyer, 2008; Zhang et al., 2008), junto con la expresión constitutiva de las proteínas normalmente inducibles por el estrés en las hojas de las plantas que expresan cistatina (Munger et al., 2012), sugieren un papel protector activo para las cistatinas en la planta.

3.1.2.1.4.2 Potenciales aplicaciones generales de las fitocistatinas

Fitocistatinas con actividad insecticida se han aislado de maíz, cebada, tomate, arroz, papaya, etc. (Kruger et al., 2002; Carrillo et al., 2011; Ishimoto et al., 2014). La inhibición de cisteín proteasas de insectos *in vitro* es la primera propiedad caracterizada de las fitocistatinas y está bien establecida, especialmente en el escarabajo de la papa de Colorado (Brunelle, Girard, Cloutier, & Michaud, 2005;

Goulet et al. 2008; Kiggundu & Vorster, 2010). Por otro lado, fitocistatinas aisladas de castaño, caña de azúcar, clavel, cebada, taro, fresa, trigo, cacao, amaranto y sésamo mostraron fuerte actividad inhibitoria frente a patógenos fúngicos de amplio rango (Soares-Costa et al., 2002; Martinez et al., 2005; Yang & Yeh, 2005; Petya Koeva Christova, Christov, & Imai, 2006; Pirovani et al., 2010; Valdes-Rodriguez et al., 2010; Cheng, Tzen, Shyu, & Chou, 2014). Se ha documentado su potencial para controlar algunos de los hongos fitopatógenos más importantes (Lima, dos Reis, & de Souza, 2015). Aunque la actividad antifúngica *in vitro* de las fitocistatinas aisladas es evidente, el mecanismo molecular de la inhibición aún no ha sido elucidado. Por el contrario, el efecto de las fitocistatinas sobre el crecimiento bacteriano ha sido ambiguo. La única cistatina conocida con actividad antibacteriana es una cistatina del kiwi que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia* y *Erwinia carotovora* (Popovic et al., 2013). Por otro lado, la cistatina de castaño no ha mostrado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Erwinia chrysanthemi* y *Clavibacter michiganensis* (Pernas, López-solanilla, Sánchez-monge, Salcedo, & Rodríguez-palenzuela, 1999) ni tampoco se ha encontrado actividad inhibitoria del crecimiento del patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* por la cistatina de clavel rDC-CPIn (P. K. Christova, Christov, Mladenov, & Imai, 2018).

3.1.2.1.4.2.1 Fitocistatinas como agentes biopesticidas

Varios estudios sugieren un papel para las cistatinas en mecanismos de defensa de las plantas contra los agentes bióticos o que generan estrés biótico. Se ha informado la sobre-regulación de los genes que codifican para cistatinas mediante señales relacionadas con el estrés biótico, tales como insectos herbívoros, heridas mecánicas, ácido jasmónico o elicitores fúngicos, así como la aparición de aminoácidos hipervariables, seleccionados positivamente entre las cistatinas inducibles por heridas, presumiblemente indicativos de una rápida diversificación funcional de estas proteínas en respuesta a los desafíos herbívoros que implican las CPs digestivas (Kiggundu et al., 2006; Goulet et al., 2008). Evidencias indirectas también apoyan el rol defensivo de las cistatinas de plantas, dada la ocurrencia de CPs digestivas en artrópodos herbívoros (Vinokurov et al., 2006; Kiggundu & Vorster, 2010) y nemátodos parásitos de raíz (Urwin, McPherson, & Atkinson, 1998), el fuerte potencial de numerosas cistatinas de plantas frente a CPs digestivas de

artrópodos y nematodos (Goulet et al., 2008), y los efectos perjudiciales de las cistatinas de plantas en la dieta contra una amplia gama de insectos fitófagos (Soichi Arai et al., 2002), nemátodos parásitos de raíz (Atkinson, Urwin, & McPherson, 2003) y patógenos fúngicos (Martinez et al., 2005; Yang & Yeh, 2005; Abraham, Martinez, Carbonero, & Diaz, 2006; Christova et al., 2018).

Varias publicaciones durante los últimos veinte años, informaron sobre el potencial de los inhibidores de proteasas de plantas, incluidas las cistatinas de plantas, como compuestos antidigestivos o antinutricionales eficaces para proteger los cultivos de las infecciones herbívoras o patógenas (Arai & Abe, 2000; Haq et al., 2004), y como una alternativa útil a los pesticidas químicos para el control de plagas herbívoras en parcelas agrícolas (Qiu, 2008; Huang et al., 2015). Después de la inhibición, las proteasas secretadas por las plagas diana para digerir los tejidos de la planta huésped ya no pueden romper los enlaces peptídicos, lo que resulta en una alteración perjudicial de la asimilación de proteínas en la dieta que conduce a retrasos en el crecimiento y mortalidad entre las poblaciones de plagas blanco (Arai & Abe, 2000; Brown et al., 2004).

Con el fin de ampliar el rango de actividad y mejorar la eficiencia general de estas proteínas contra herbívoros objetivo se han diseñado proteínas de fusión que integran secuencias de cistatina completas o parciales (Benchabane & Kiggundu, 2010; Brunelle et al., 2005; Outchkourov, de Kogel, Wiegers, Abrahamson, & Jongma, 2004; Zhu-Salzman & Zeng, 2015). Estas estrategias, que se suman a otros procesos que involucran cistatinas combinadas con inhibidores de proteasas de otras clases funcionales (Senthilkumar, Cheng, & Yeh, 2010), han establecido claramente el potencial práctico de estas proteínas en la protección de las plantas. Un desafío importante, en esta etapa, será implementar nuevas herramientas de protección de plantas en ecosistemas complejos sin comprometer procesos proteolíticos clave en organismos no específicos, incluida la propia planta (Goulet et al., 2008; van Wyk et al., 2016).

La tolerancia mejorada de las plantas que expresan cistatina a diferentes señales de estrés abiótico (Prins et al., 2008; Zhang et al., 2008) sugiere claramente, por ejemplo, el potencial de estas proteínas para modular los procesos mediados por CPs endógenas con el fin de mejorar los cultivos. La inhibición *in situ* de las proteasas cisteínicas con cistatinas recombinantes también podría ser de interés

para retrasar el inicio de la germinación en productos alimenticios almacenados (Hwang et al., 2009), o para proteger proteínas recombinantes, clínicamente útiles, expresadas en biofábricas de proteínas de plantas (Rivard et al., 2006; Goulet et al., 2008; Benchabane & Kiggundu, 2010).

Un objetivo claro, con un gran potencial, es el desarrollo de plantas modificadas genéticamente que expresen una cistatina única o incluso múltiples para el control de plagas. Esto es particularmente importante cuando se dirige a un proceso proteolítico clave específico en un organismo, pero no interfiere con organismos no objetivo. La inclusión de plantas transgénicas de cistatina en los enfoques de manejo integrado de plagas y la acción sinérgica con otros compuestos, como la toxina Cry extraída de *Bacillus thuringiensis* (o toxina Bt) (Perez et al., 2005) o los productos químicos, también es una opción interesante (Schluter et al., 2010). Esto puede disminuir la aplicación de pesticidas y también apoyar cualquier estrategia basada en la aplicación de un agente biológico para el control de plagas. Además, la dependencia de una estrategia importante para la resistencia a los insectos, por ejemplo, la toxina Bt, ha generado serias preocupaciones sobre el desarrollo de insectos resistentes (Tabashnik, Brevault, & Carriere, 2013). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas proteínas insecticidas adicionales para la protección de las plantas, que también incluye inhibidores de la proteasa, es una actividad reciente y en auge para amortiguar el desarrollo de la resistencia. Además, tales plantas transgénicas que expresan una cistatina exógena más potente y específica, también podrían ser menos susceptibles a la descomposición posterior a la cosecha debido al ataque de hongos y bacterias.

3.1.2.1.4.2.2 Fitocistatinas como nutraceuticos

Finalmente, las cistatinas modificadas por ingeniería genética también podrían actuar a largo plazo como compuestos nutraceuticos potentes en el desarrollo de un producto alimenticio diseñado a partir de un “derivado de plantas”, que permita prevenir la infección de patógenos en el sistema digestivo humano. Hasta el momento no hay evidencia de que las cisteín proteasas ausentes en el sistema intestinal humano tengan, en comparación con las serín proteasas, algún papel en la degradación de los alimentos humanos. Por lo tanto, las cistatinas de plantas tendrían características apropiadas para ser incorporadas como nutraceuticos

debido a sus propiedades antimicrobianas y antivirales ya que solo pueden interactuar con cisteín proteasas microbianas o víricas en el intestino humano, y no con cisteín proteasas en el sistema digestivo humano (Atkinson, Grimwood, Johnston, & Green, 2004). También hay indicios de que la industria se está preparando para una gran inversión en "alimentos de diseño" con beneficios para los seres humanos. Dichos alimentos, que en última instancia podrían disminuir la demanda de medicamentos, también podrían ayudar a controlar las enfermedades y los trastornos a menudo asociados con un cambio en el estilo de vida.

Las cistatinas de las plantas también podrían desempeñar otras funciones beneficiosas para la salud humana (Shah & Bano, 2009). Las alteraciones en la expresión y localización de la cistatina C humana están implicadas en varios procesos patológicos. Estos incluyen enfermedades inflamatorias de la piel y trastornos neurodegenerativos y diferentes formas de cáncer. En particular, se ha demostrado la asociación de cistatina C con la formación del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Los niveles bajos de cistatina aumentan la vulnerabilidad neuronal y afectan la capacidad neuronal para prevenir la neurodegeneración (Kaur & Levy, 2012). Aunque en el cáncer el efecto inhibitorio de las cistatinas contrarresta beneficiosamente la actividad proteolítica asociada al tumor, las cistatinas también pueden afectar las funciones de las catepsinas en la respuesta inmune antitumoral (Magister & Kos, 2013). Dado que la cistatina C humana tiene, con base en la espectroscopia de RMN, el mismo pliegue de cistatina que la cistatina de arroz OC-I (Nagata, Kudo, Abe, Arai, & Tanokura, 2000), se puede esperar una interacción con la cisteín proteasa expresada durante este proceso patológico. Sin embargo, actualmente no hay datos que muestren que los "alimentos de diseño" que contienen cistatinas recombinantes puedan realmente ayudar a prevenir el crecimiento de tumores y la malignidad.

Un objetivo particular de aplicación de las cistatinas podría ser en los crecimientos tumorales en el sistema digestivo, como el cáncer de colon, que actualmente es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en la población adulta. Sin embargo, aún no se ha investigado con mayor detalle cómo las cistatinas de las plantas podrían desempeñar un papel beneficioso y los métodos aplicables para una administración efectiva de dichos fármacos a base de cistatina. A este respecto, una opción interesante sería administrar cistatinas a través de células vegetales, por

ejemplo de zanahorias, que expresan una cistatina recombinante. Dado que las células vegetales tienen paredes celulares de celulosa que las hacen resistentes a la degradación de las enzimas cuando pasan a través del tracto digestivo, tales células vegetales podrían actuar como un vehículo. Una cistatina activa podría administrarse por vía oral, en lugar de una terapia intravenosa y, una vez liberada y absorbida, administrada al torrente sanguíneo (<http://www.protalix.com>).

En este capítulo reportamos el aislamiento y caracterización de un nuevo inhibidor de papaína que presenta actividad anticoagulante y antimicrobiana, con potencial aplicación terapéutica. Estas actividades representan el primer reporte para fitocistatinas, dando cuenta de la versatilidad de dichas moléculas en lo que respecta a su potencial biotecnológico.

Los resultados se encuentran en proceso de publicación, habiendo sido presentados algunos ensayos preliminares en actas de congresos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Como material de partida se utilizaron semillas de *Moringa oleifera* L., provenientes de áreas cercanas a la Universidad de La Habana, Cuba (Figura 3.3).

Moringa oleifera es un árbol de rápido crecimiento, pudiendo llegar a los 5 m de altura en su primer año mientras que de adulto llega a los 10 o 12 m de altura máxima. Tiene ramas colgantes quebradizas, con corteza suberosa, hojas color verde claro, compuestas, tripinnadas, de 30 a 60 cm de largo, con muchos folíolos pequeños de 1,3 a 2 cm de largo por 0,6 a 0,3 cm de ancho. Florece a los siete meses de su plantación. Las flores son fragantes, de color blanco o blanco crema, de 2,5 cm de diámetro. Produce vainas colgantes color marrón, triangulares, de 30 a 120 cm de largo por 1,8 cm de ancho, divididas longitudinalmente en 3 partes cuando se secan; cada una contiene aproximadamente veinte semillas incrustadas en la médula. Las semillas son de color marrón oscuro, con tres alas. Es un árbol de muy fácil cultivo gracias a su rusticidad y crecimiento aún en suelos de elevada aridez estacional.



Figura 3.3: Vainas, semillas y árbol de *M. oleifera* L.

3.2.2 Metodología

3.2.2.1 Preparación de extracto crudo

Se utilizó como material de partida semillas de *Moringa oleifera* L. Se pesaron 30 g de semillas, se lavaron repetidas veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente por 16–20 hs. Se trituraron de manera discontinua en multiprocesadora con el agregado de 450 ml de buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4 manteniendo bajas temperaturas y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación de 150 rpm. Luego se filtró con gasa, centrifugó por 30 min a 9000 rpm (4 °C) y se colectó el sobrenadante. Se obtuvo de este modo el extracto crudo de *Moringa oleifera* (MoEC).

3.2.2.2 Estimación del contenido proteico por el método de Bradford (1976)

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descripto en cfr. 2.3.1.2.2.

3.2.2.3 Determinación de actividad inhibitoria de papaína

La actividad de papaína fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm producto de la hidrólisis del sustrato PFLNA (L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-p-nitroanilida), mediante medidas continuas durante 10 min a 37 °C (Obregon et al., 2015). Los volúmenes fueron adaptados para la lectura en placa de 96 pocillos (Lector de placas Tecan Infinite 200 Pro) en un volumen final de 200 µl (Tabla 3.3).

La inhibición de la actividad de papaína produjo disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de hidrólisis. Se determinaron los blancos de enzima y sustrato. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado, con la estimación de la desviación estándar correspondiente.

Tabla 3.3: Mezcla de reacción para la medida de actividad de papaína.

MEZCLA DE REACCIÓN DE ACTIVIDAD DE PAPAÍNA	
Buffer fosfatos 0,1 M, KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM, Cys 3 mM, pH 6,5	160 μ l
Papaína $4,5 \times 10^{-8}$ M, Roche	10 μ l
Muestra	20 μ l
Incubación de 15 min a 37 °C	
PFLNA 1 mM, Sigma	10 μ l

La actividad inhibitoria fue estimada como la actividad proteolítica residual en presencia de inhibidor y expresada como porcentaje de inhibición (I%), respecto del ensayo control (donde el volumen de muestra se reemplazó por el buffer correspondiente), utilizando la siguiente ecuación:

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

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

3.2.2.3.1 Determinación de la IC₅₀: curva dosis-respuesta

La IC₅₀ fue determinada tal como se describió en el *cfr.* 2.3.1.2.3.2.1.

Se define la IC₅₀ como la concentración de extracto de IPPs de *Moringa oleifera* (MoEC) necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la enzima (papaína en este caso).

3.2.2.4 Purificación

3.2.2.4.1 Purificación parcial mediante tratamiento térmico

Como hemos expresado anteriormente, los inhibidores de proteasas han sido caracterizados por su estabilidad fisicoquímica (Bártová & Bárta, 2008; Walter D. Obregón et al., 2012). Es por ello que aplicamos tratamiento térmico a 100 °C al extracto crudo de *M. oleifera* durante 15, 60 y 120 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego remover las proteínas térmicamente desnaturalizadas y agregadas mediante centrifugación durante 30 min a 9000 rpm y 4 °C.

La actividad de papaína residual fue calculada para cada tratamiento y se determinó la IC₅₀ correspondiente de acuerdo a lo descrito en cfr. 3.2.2.3.1.

3.2.2.4.2 Purificación cromatográfica mediante cromatografía de afinidad

3.2.2.4.2.1 Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.3.1.2.4.2.1, empleando en este caso como enzima a inmovilizar, papaína comercial (Roche).

3.2.2.4.2.2 Desarrollo de la cromatografía de afinidad a papaína

Se empleó una columna de afinidad con papaína inmovilizada como relleno. Se sembraron 150 ml de extracto crudo tratado térmicamente a 100 °C durante 15 min, se ajustó el pH a 5,5 y se sembró en batch manteniendo en contacto durante 2 h a 37 °C y 100 rpm. Transcurrido ese tiempo se empaquetó el relleno en la columna y se eluyó la fracción no retenida con el buffer de reacción (Buffer fosfatos 0,01 M, pH 5,5) a una velocidad de 0,7 ml/min. Se realizaron medidas de absorbancia a 215 nm y 280 nm hasta llegar a cero. La fracción retenida se eluyó posteriormente por descenso brusco de pH mediante adición de HCl 0,01 M (pH 2,5) para producir la desestabilización del complejo papaína-inhibidor. Finalizada la corrida cromatográfica, se lavó la columna con buffer fosfatos 0,01 M, pH 6 y posteriormente se almacenó en etanol 20% a 4 °C para reuso.

Las fracciones eluidas se neutralizaron y se les determinó actividad inhibitoria y concentración de proteínas mediante el método de Bradford (cfr. 2.3.1.2.2). Se

empleó la técnica de liofilización para concentrar las fracciones proteicas (cfr. 2.3.1.2.5).

3.2.2.5 Caracterización

3.2.2.5.1 Electroforesis SDS-PAGE

Esta técnica se realizó de acuerdo a lo descrito en cfr. 2.2.1.2.4.2.2.1.

3.2.2.5.2 Caracterización de actividades biológicas

3.2.2.5.2.1 Actividad anticoagulante

Los ensayos de actividad anticoagulante se realizaron evaluando ambas vías de coagulación; la vía extrínseca mediante la determinación del tiempo de protrombina (PT) y la vía intrínseca mediante la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). En ambos casos se empleó como muestra un “pool” de plasmas sanguíneos proveniente de la mezcla, en partes iguales, de 5 individuos sanos, mantenidos a 37 °C con citrato de sodio 3,8% (relación muestra:anticoagulante 9:1). Los tiempos de coagulación fueron determinados con un coagulómetro Coatron M1.

3.2.2.5.2.1.1 Determinación del tiempo de Protrombina

Para el ensayo de PT se empleó el reactivo comercial Soluplastin (Lote 205090, Wiener Lab.) preparado en el momento de utilizar. Se procedió a incubar la muestra de inhibidor purificado con el plasma sanguíneo en partes iguales durante 2 min a 37 °C. Luego una alícuota de 25 µl fue mezclada con 50 µl de reactivo y se determinó el tiempo de coagulación. Los ensayos fueron realizados por triplicado con el control correspondiente, reemplazando el volumen de muestra a ensayar por la misma cantidad de agua bidestilada.

3.2.2.5.2.1.2 Determinación del tiempo de Tromboplastina Parcial activado

Para el ensayo de APTT una alícuota de 25 µl de mezcla inhibidor-plasma (incubada previamente 2 min a 37 °C) se puso en contacto con 25 µl de APTT (Lote 191690, Wiener Lab) durante 2 min. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 25 µl de CaCl₂ 50 mM tras lo cual se determinó el tiempo de coagulación. Los ensayos fueron realizados por triplicado con el control correspondiente, reemplazando el volumen de muestra a ensayar por la misma cantidad de agua bidestilada.

3.2.2.5.2.2 Actividad antimicrobiana

Con el objeto de determinar la capacidad inhibitoria en el crecimiento de diversas cepas bacterianas por parte del inhibidor, se realizaron dos ensayos: el ensayo de difusión en agar y el ensayo de resazurina en microplaca. Ambos ensayos consisten en poner en contacto la muestra en cuestión con una cepa bacteriana patógena, incubación durante un tiempo determinado y temperatura especificada y posterior evaluación del crecimiento.

3.2.2.5.2.2.1 Ensayo de difusión en agar

El ensayo de difusión en agar se basa en el test de Kirby-Bauer con leves modificaciones (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1966). Inicialmente se preparó un preinóculo de diversas cepas bacterianas (*Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras) a 37 °C durante 18-24 horas para luego ajustar la turbidez con solución fisiológica al 0,5 de la escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Los inóculos se sembraron con hisopo sobre placas de agar nutritivo Müller-Hinton, en las cuales se colocó una gota de 50 µl inhibidor y los controles correspondientes. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y a continuación se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (en milímetros).

3.2.2.5.2.2 Ensayo de resazurina en microplaca (viabilidad celular)

El ensayo de resazurina en microplaca se basa en la capacidad del compuesto resazurina (color azul) de reducirse irreversiblemente a la forma resorufina (color rosa), lo cual permite evaluar la viabilidad celular (Palomino et al., 2002) (Figura 3.4).

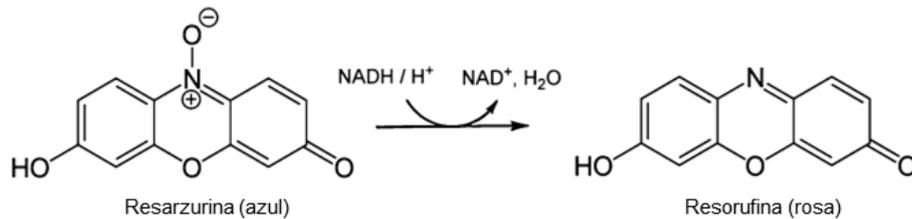


Figura 3.4: Mecanismo de reducción de la resazurina a resorufina.

Dentro de la célula, la resazurina experimenta una reducción enzimática debido a la actividad de enzimas tales como: flavín mononucleótido deshidrogenasa, flavín adenín dinucleótido deshidrogenasa, nicotinamida adenina deshidrogenasa y citocromos (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000). Luego, la resorufina es secretada fuera de las células hacia el medio extracelular, lo cual resulta en un visible cambio de color de azul a rosa. Es así como la tasa de reducción basada en el cambio colorimétrico, el cual puede ser cuantificado colorimétricamente o fluorométricamente, refleja el número de células viables.

Se colocaron 100 µl medio nutritivo Müller-Hinton en los pocillos de la placa de 96 pocillos, se agregaron 100 µl de la muestra a ensayar y 10 µl de inóculo de bacterias (previamente diluido hasta observar turbidez correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland). Luego de incubar durante 5 horas a 37 °C (con agitación), se agregaron 15 µl de resazurina 0,02% en cada pocillo y se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C y con agitación. Se observó el color en los pocillos de la placa.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Actividad inhibitoria de papaína del Extracto Crudo

Se evaluó la actividad inhibitoria de papaína en el extracto crudo obtenido a partir de semillas de *Moringa oleifera* L. de concentración 3,5 mg/ml (MoEC) como una medida de la disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato cromogénico específico. Se realizaron dos tipos de controles negativos; el primero 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.

La actividad de papaína fue estimada en función del incremento en los valores de absorbancia a 410 nm mediante el registro de lecturas continuas durante 180 segundos a 37 °C. Este aumento en la absorbancia se manifestó debido a la hidrólisis del sustrato específico PFLNA, ya que 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. Ante la incorporación de extracto a la mezcla de reacción, la falta de aumento en la absorbancia durante el tiempo de reacción es indicativa de la presencia de la actividad inhibitoria en el extracto.

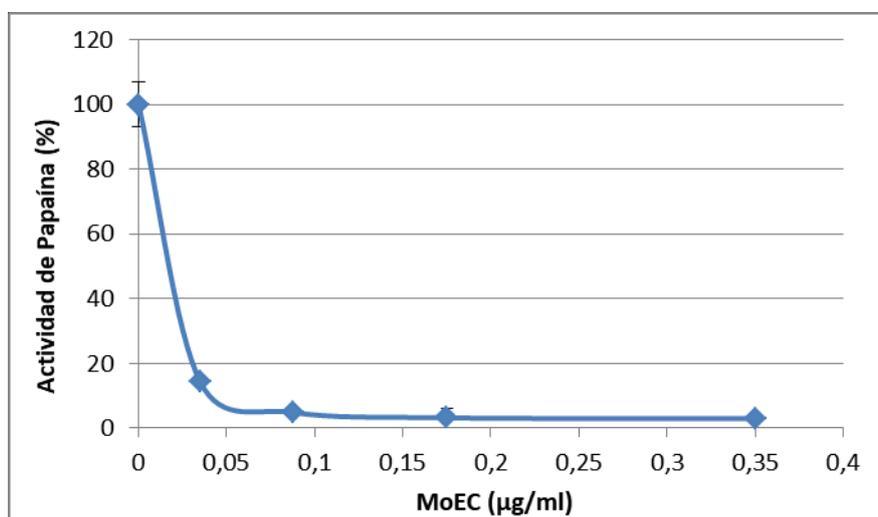


Figura 3.5: Actividad de papaína residual (%) en presencia de extracto crudo de *M. oleifera* (MoEC).

En la Figura 3.5 se observa la variación de la actividad de papaína frente a concentraciones crecientes de MoEC en comparación con la actividad de papaína control en la cual se reemplazó el volumen de extracto crudo por el equivalente de buffer. Como puede observarse, la actividad de dicha enzima disminuye drásticamente con el mínimo agregado de MoEC, lo cual demuestra que en dicha muestra existen moléculas que producen inhibición de papaína.

3.3.2 Purificación del inhibidor de papaína aislado a partir de *Moringa oleifera*

Teniendo en cuenta la posibilidad de que el extracto crudo con el posible inhibidor de papaína sea termorresistente, se planteó una etapa inicial de clarificación por calentamiento de manera tal de purificar parcialmente la muestra como paso previo a la etapa de purificación por cromatografía de afinidad.

3.3.2.1 Purificación parcial mediante tratamiento térmico

El extracto crudo fue sometido a tratamientos térmicos de 100 °C durante 15 min, 60 min y 120 min. Luego se centrifugó cada muestra a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes de cada tratamiento, los que se denominaron “MoTT100_15”, “MoTT100_60” y “MoTT100_120” respectivamente.

Se estimó la concentración proteica de cada muestra mediante el método de Bradford.

Los resultados se detallan en la Tabla 3.4, observándose de esta manera el efecto que ejerce el tratamiento térmico sobre las proteínas solubles contenidas en la muestra (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Concentración proteica luego de cada tratamiento térmico. MoEC: extracto crudo; MoTT100_15: tratamiento térmico a 100 °C durante 15 min; MoTT100_60: tratamiento térmico a 100 °C durante 60 min; MoTT100_120: tratamiento térmico a 100 °C durante 120 min.

Muestra	Concentración proteica (mg/ml)
MoEC	3,5 ± 0,03
MoTT100_15	1,7 ± 0,05
MoTT100_60	1,6 ± 0,06
MoTT100_120	1,5 ± 0,04

Como puede apreciarse, el tratamiento a 100 °C produjo una disminución en el contenido de proteínas del 50-60% respecto al extracto crudo de partida, fundamentada en la agregación por desnaturalización térmica de las mismas. Teniendo en cuenta que este ensayo no permite determinar si todas las proteínas solubles mantienen su actividad y que nuestro interés radica en verificar la conservación de la actividad inhibitoria de papaína, se realizó la determinación de actividad inhibitoria luego de cada tratamiento térmico.

3.3.2.1.1 Actividad inhibitoria de papaína

A las muestras correspondientes a cada tratamiento térmico (MoTT100_15, MoTT100_60 y MoTT100_120) se les determinó actividad inhibitoria de papaína. Cabe aclarar que la cantidad de muestra utilizada en cada ensayo fue de 20 µl, independientemente de la cantidad de proteínas que hayan quedado solubles luego de cada tratamiento. Esto es así ya que el propósito de este ensayo fue justamente, verificar la población de proteínas térmicamente estables, en nuestro caso inhibidores de papaína, que permanecieron activas luego de cada tratamiento.

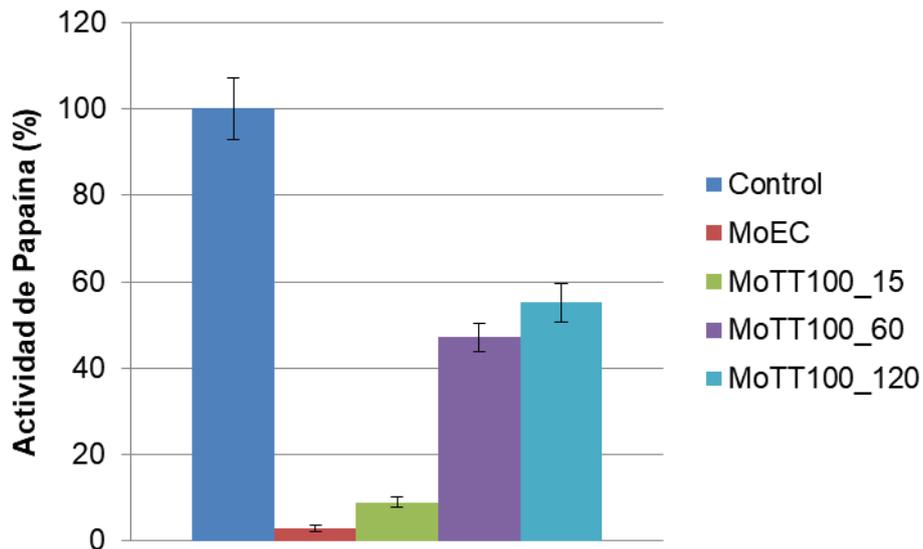


Figura 3.6: Actividad residual de papaína (%) en presencia de los diferentes tratamientos térmicos de *M. oleifera*. MoTT100_15: tratamiento térmico a 100 °C durante 15 min, MoTT100_60: tratamiento térmico a 100 °C durante 60 min, MoTT100_120: tratamiento térmico a 100 °C durante 120 min.

En la Figura 3.6 se puede observar que la actividad inhibitoria de papaína se conservó parcialmente con los diferentes tratamientos térmicos, siendo MoTT100_15 la muestra que conservó la mayor actividad inhibitoria, manteniendo un 90% de la actividad inicial. En cambio MoTT100_60 y MoTT100_120 conservan cerca de un 50% de la actividad inicial. Estos resultados sumados a los resultados expresados en la tabla 3.2 muestran que MoTT100_15 es una muestra óptima para continuar con los estudios de purificación y caracterización, ya que es la muestra en la cuál se observa una mejor relación entre conservación de la actividad / eliminación de proteínas solubles no inhibitoras. Por este motivo MoTT100_15 fue la muestra de elección para los próximos pasos de este capítulo.

Es de destacar la notable estabilidad térmica del inhibidor de papaína de *Moringa oleifera*, ya que luego de someterlo durante 1-2 horas a 100 °C conservó un 50% de su actividad inhibitoria inicial, resultado observado solo para el inhibidor de papaína de *Vigna unguiculata* (Monteiro Júnior et al., 2017).

3.3.2.2 Purificación mediante cromatografía de afinidad

En esta etapa del trabajo se confeccionó la matriz por medio de la cual se pudieron aislar las proteínas deseadas (inhibidores de papaína) de la muestra sembrada (extracto crudo parcialmente purificado). Previo al desarrollo de la cromatografía de afinidad se procedió a verificar si el EC parcialmente purificado (MoTT100_15) inhibe a la papaína inmovilizada. Para ello se realizó un seguimiento de la absorbancia a 410 nm poniendo en contacto 1 mg de relleno con el sustrato PFLNA 1mM durante 3 min. En ese momento se adicionó la muestra de MoTT100_15 y se comprobó la disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato, verificando de este modo la interacción entre el inhibidor de papaína presente en la muestra y el relleno inmovilizado.

Como mencionamos anteriormente, la muestra MoTT100_15 fue elegida para continuar con la purificación por cromatografía de afinidad debido a que presenta una marcada clarificación respecto al extracto crudo y elevada conservación de la actividad inhibitoria.

En la Figura 3.7 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en el proceso de purificación de MoTT100_15. Se puede observar una inmediata elución de las moléculas retenidas al aplicar el cambio de buffer. Mientras que el pool del no retenido no presenta actividad inhibitoria, el pico eluido al agregar HCl muestra una fuerte inhibición de papaína, con un valor de IC₅₀ de 6,3 ng/ml. Dicha fracción presentó una concentración de proteínas de 16 µg/ml. El pico eluido fue denominado MoPI y representa el primer inhibidor de papaína aislado de *Moringa oleifera*. Asimismo se trata del primer inhibidor altamente termoestable reportado para esta planta.

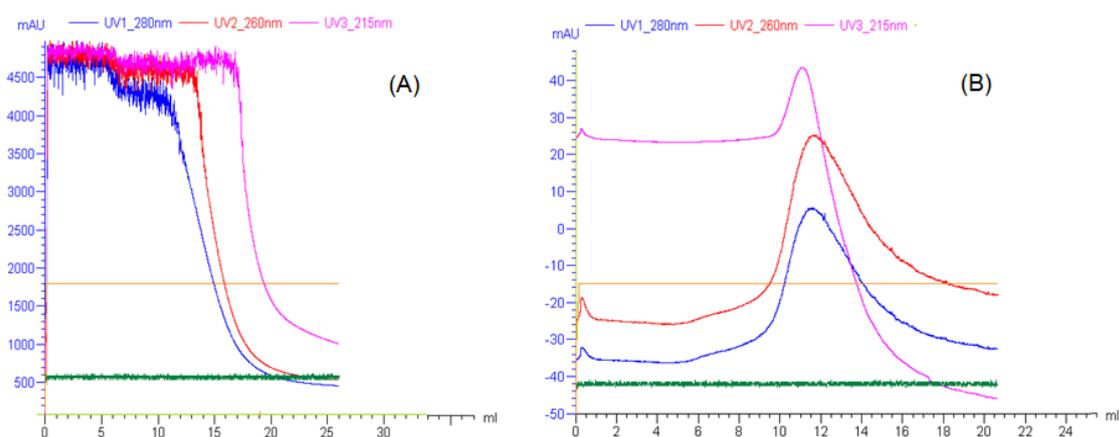


Figura 3.7: Cromatografía de afinidad del inhibidor de *Moringa oleifera* obtenida por tratamiento térmico (MoTT100_15) en columna con relleno de papaína-agarosa. (A) Elución del no retenido, (B) Elución del pico retenido (MoPI).

En la Tabla 3.5 se muestra la tabla de purificación correspondiente al inhibidor de papaína obtenido a partir de semillas de *Moringa oleifera*. El tratamiento térmico realizado como primer paso de purificación permitió obtener una preparación parcialmente purificada con un rendimiento del 93,6%. La cromatografía de afinidad, segundo paso de purificación, nos permitió obtener una muestra con un grado de purificación de 144,6 veces con respecto al extracto crudo, pero con un rendimiento del 3,3% respecto de la muestra de partida (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Purificación del inhibidor de papaína de *Moringa oleifera*.

Paso de Purificación	Volúmen (ml)	Proteínas totales (mg)	CP ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	AI total (mU)	AIE (mU/mg)	Pureza	Rendimiento (%)
Extracto crudo (MoEC)	160	560	3500	0,0085	4250	7,6	1	100
Tratamiento a 100 °C por 15 min (MoTT100_15)	150	255	1700	0,016	3977	15,6	2,06	93,6
Cromatografía de afinidad (MoPI)	8	0,128	16	0,006	140	1097	144,6	3,3

CP: Concentración proteica

AI: Actividad inhibitoria.

AIE: Actividad inhibitoria específica.

3.3.3 Caracterización del inhibidor de papaína de *Moringa oleifera* (MoPI)

3.3.3.1 Determinación de la masa molecular

Para la estimación del peso molecular se realizó un SDS-PAGE, sembrando 35 µg de MoPI en condiciones desnaturalizantes y reductoras mediante el agregado de β-mercaptoetanol en el buffer de muestra.

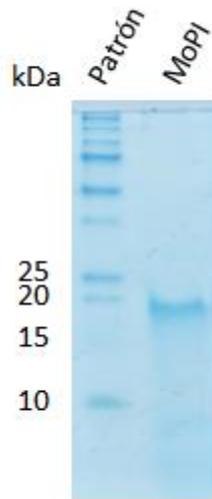


Figura 3.8: SDS-PAGE del inhibidor de papaína de *Moringa oleifera* (MoPI).

Calle 1: Marcador de peso molecular (10-250 kDa), Calle 2: muestra de inhibidor MoPI purificado por cromatografía de afinidad con papaína inmovilizada en agarosa.

En la Figura 3.8 observamos la presencia de una banda de peso molecular aparente de aproximadamente 18 kDa comparada con el patrón de pesos moleculares empleado (Precision Plus Protein Standards, BioRad).

3.3.3.2 Determinación de la IC_{50} : curva dosis-respuesta

Con el objeto de determinar la capacidad inhibitoria del inhibidor de papaína aislado de semillas de *Moringa oleifera*, se estimaron los valores de IC_{50} de acuerdo al protocolo descrito por Tellechea, García-Pardo, Cotabarrén, Lufrano, Avilés, Obregón, Lorenzo, & Tanco, 2016 modificado para este tipo de inhibidores. El inhibidor de papaína aislado de *M. oleifera* (MoPI) presentó un valor de IC_{50} de 6,3 ng/ml ($3,5 \times 10^{-7}$ M), lo cual indica la presencia de un inhibidor fuerte de papaína, dado que se requieren concentraciones muy pequeñas para producir una inhibición considerable de la enzima blanco (Figura 3.9). Comparando el valor de IC_{50} obtenido

para este inhibidor aislado (MoPI) con los informados en la bibliografía, podemos inferir que nos encontramos en presencia de un inhibidor de proteasa con mayor actividad inhibitoria que el inhibidor de tripsina de *Jatropha curcas* ($IC_{50}=1,25 \times 10^{-6}$ M; (Costa et al., 2014) y que el inhibidor de tripsina de *Erythrina velutina* ($IC_{50}=2,2 \times 10^{-6}$ M; Machado et al., 2013), pero menos potente que el inhibidor de tripsina de *Sapindus saponaria* ($IC_{50}=8,3 \times 10^{-8}$ M; Macedo et al., 2011).

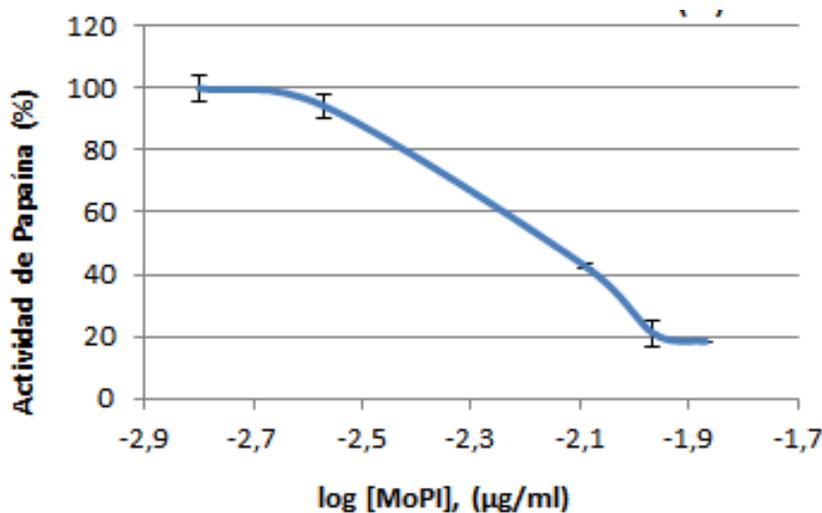


Figura 3.9: Curva dosis-respuesta del inhibidor de papaína de *M. oleifera*.

3.3.3.3 Evaluación preliminar de actividades biológicas

3.3.3.3.1 Actividad anticoagulante

Se ensayó la actividad anticoagulante del inhibidor de papaína aislado de *M. oleifera* mediante la determinación del tiempo de tromboplastina parcial activado (vía intrínseca, llamada así porque todos los componentes necesarios para activar la cascada de coagulación están presentes en la sangre) y del tiempo de protrombina (vía extrínseca, llamada así porque requiere de la exposición de un componente externo a la sangre como el factor tisular de la pared vascular o tromboplastina tisular para iniciar la activación).

En la Tabla 3.6 se resumen los tiempos de coagulación obtenidos, encontrando que la concentración de inhibidor evaluada (12,5 µg/ml) produjo un incremento del 25% en el tiempo de de tromboplastina parcial activada respecto de la muestra control al ser ensayada la vía intrínseca. Esto sugiere una potencial aplicación del inhibidor MoPI estudiado como agente anticoagulante.

Respecto al comportamiento del MoPI para la vía extrínseca, los valores obtenidos para el ensayo correspondiente, fueron muy similares a los de la muestra control, por lo tanto no se observó incremento significativo en el tiempo de coagulación. En este caso, se podría intentar repetir el ensayo con concentraciones crecientes del inhibidor.

Tabla 3.6: Tiempos de coagulación para los ensayos de actividad anticoagulante.

Muestra	Tiempo de Protrombina (seg)	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (seg)
Control	18,6 ± 0,7	44,4 ± 3,1
MoPI	18,1 ± 0,7	57,2 ± 6,9

3.3.3.3.2 Actividad antimicrobiana

3.3.3.3.2.1 Ensayo de difusión en agar

Se realizó un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana producida por el extracto crudo MoEC, la fracción sometida a tratamiento térmico (MoTT100_15) y el inhibidor de papaína purificado (MoPI).

Para ello se emplearon placas de medio Müller-Hinton en las cuales se sembró una pátina de bacterias diluida a 0,5 de Mc Farland y luego se adicionaron 50 µl de la muestra a ensayar. En las Figuras 3.10 a 3.16 se muestran las fotografías tomadas a las placas luego de incubar a 37 °C durante toda la noche. En los casos en que la muestra produjo inhibición de crecimiento se midió el radio correspondiente al halo de inhibición producido en milímetros.



Figura 3.10: Actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (Bacteria A).

1: extracto crudo (MoEC); 2: tratamiento térmico a 100 °C durante 15 min (MoTT100_15); 3: control de buffer fosfato pH 6,5; 4: inhibidor de papaína de *M. oleifera* (MoPI); 5: control de H₂O.



Figura 3.11: Actividad antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* (Bacteria B).

1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5; 4: MoPI; 5: control de H₂O.



Figura 3.12: Actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Bacteria C). 1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5; 4: MoPI; 5: control de H₂O.

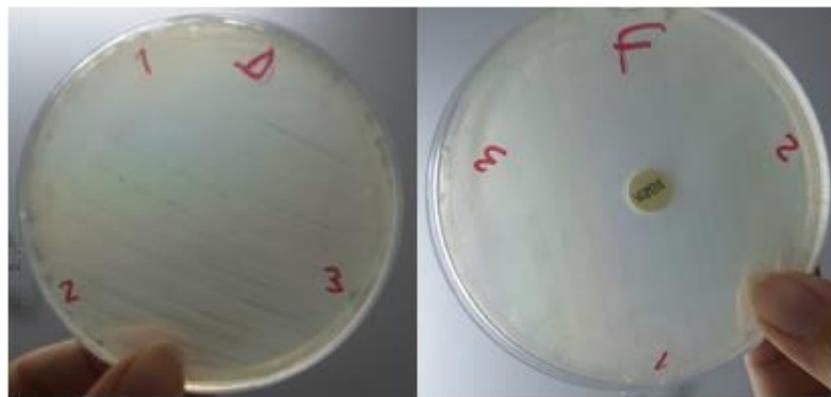


Figura 3.13: Actividad antimicrobiana sobre *Salmonella typhimurium* (Bacteria D) y *Citrobacter amalonaticus* (Bacteria F). 1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5.



Figura 3.14: Actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (Bacteria E). 1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5; 4: MoPI; 5: control de H₂O.



Figura 3.15: Actividad antimicrobiana sobre *Enterobacter cloacae* (Bacteria G) y *Proteus* (Bacteria I). 1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5.



Figura 3.16: Actividad antimicrobiana sobre *Klebsiella pneumoniae* (Bacteria H). 1: MoEC; 2: MoTT100_15; 3: control de buffer fosfato pH 6,5; 4: MoPI; 5: control de H₂O.

Se observó que la inoculación de 175 µg de MoEC produjo inhibición del crecimiento para *Escherichia coli* (halo de inhibición de 2 mm), para *Enterococcus faecalis* (halo de inhibición de 5 mm), para *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de 7 mm), para *Enterobacter cloacae* (halo de inhibición de 3 mm), para *Klebsiella pneumoniae* (halo de inhibición de 2 mm) y para *Proteus* (halo de inhibición de 3 mm).

Al analizar los resultados obtenidos para 85 µg de MoTT100_15 se observó inhibición de crecimiento para *Enterococcus faecalis* (halo de inhibición de 5 mm) y para *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de 6 mm).

La aplicación de 24 µg de MoPI producen inhibición de crecimiento en estas mismas cepas, observándose un halo de inhibición de 4 mm en el caso de *Enterococcus faecalis* y de 3 mm en el caso de *Staphylococcus aureus*.

Tal como mencionamos al inicio de este capítulo, la única cistatina conocida con actividad antibacteriana es una cistatina del kiwi que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia* y *Erwinia carotovora* (Popovic et al., 2013). Nuestro estudio representa una nueva evidencia del rol antimicrobiano de las fitocistatinas, ampliando sus posibles aplicaciones biomédicas. Proponemos continuar con el estudio de la actividad antimicrobiana de MoPI realizando una curva dosis-respuesta para diferentes concentraciones de inhibidor con el fin de poder calcular la mínima concentración inhibitoria (MIC) para cada bacteria, en paralelo al estudio de su capacidad antimicrobiana frente a otras cepas bacterianas.

3.3.3.3.2 Ensayo de resazurina en microplaca (viabilidad celular)

Los ensayos de inhibición en microplaca utilizando resazurina como indicador de inhibición fueron realizados como parte final de este capítulo utilizando MoTT100_15 como muestra y se encuentran actualmente en desarrollo por nuestro grupo de trabajo para la continuidad de los estudios de inhibición de microorganismos y forman parte de la puesta a punto, de esta técnica, realizada en los últimos estadios de la tesis.

Actualmente nos encontramos en la fase de producción de MoPI mediante cromatografías de afinidad con el fin de contar con cantidad suficiente para realizar los ensayos de actividad antimicrobiana con los respectivos cálculos de la concentración inhibitoria mínima (MIC). Dicha etapa de purificación se vio comprometida debido a la pérdida de actividad del relleno con papaína inmovilizada en glioxil agarosa, intensificada por problemas de conservación en nuestro laboratorio.

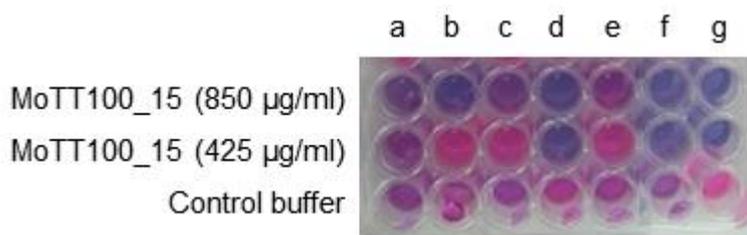


Figura 3.17: Actividad antimicrobiana determinada por el método de resazurina ensayada para *K. pneumoniae* (a), *E. cloacae* (b), *C. amalonaticus* (c), *S. aureus* (d), *S. typhimurium* (e), *E. faecalis* (f), *E. coli* (g).

En la Figura 3.17 se observan estudios preliminares con los resultados de la incubación de MoTT100_15 (850 µg/ml y 425 µg/ml) con las siguientes bacterias patógenas:

- a) *Klebsiella pneumoniae*,
- b) *Enterobacter cloacae*,
- c) *Citrobacter amalonaticus*,
- d) *Staphylococcus aureus*,
- e) *Salmonella typhimurium*,
- f) *Enterococcus faecalis*,
- g) *Escherichia coli*.

Tal como se describió en la metodología (cfr. 3.3.3.3.2.2), el color rojo indica viabilidad celular y el color azul inhibición del crecimiento. Cuando comparamos el comportamiento del inhibidor respecto a la muestra control, observamos que MoTT100_15 (425 µg/ml) produjo inhibición de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Al duplicar la concentración del inhibidor purificado (850 µg/ml) se encontró además inhibición de las cepas *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.

Es así que con el ensayo de resazurina, MoTT100_15 produjo inhibición en las mismas cepas que el ensayo de difusión en agar (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), confirmando los ensayos realizados por dicha metodología. Adicionalmente, el ensayo de resazurina nos permitió visualizar inhibición sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, lo cual era imperceptible en el ensayo de difusión en agar. En este momento se está purificando mayor cantidad de MoPI para confirmar la inhibición de estas cepas patógenas.

La puesta a punto de esta técnica mejoraría la capacidad de detección de la inhibición de crecimiento de microorganismos por parte de los inhibidores de proteasas, permitiendo la utilización de concentraciones menores de muestra y mayor reproducibilidad en los resultados. Proponemos la optimización de esta técnica con el objeto de lograr un sistema automatizado de detección de actividades antimicrobianas utilizando diferentes inhibidores de proteasas.

3.4 CONCLUSIONES

El estudio y el descubrimiento de nuevas fitocistatinas contribuyen a la identificación y caracterización de nuevas propiedades en los inhibidores de proteasas cisteínicas, las cuales ya representan un grupo de inhibidores de proteasas de potencial aplicación en biomedicina y en la industria agrícola.

En este capítulo informamos el aislamiento y purificación del primer inhibidor de papaína proveniente de *Moringa oleifera* L., un árbol conocido por sus propiedades nutricionales, y demostramos su estabilidad a elevadas temperaturas. Esta característica sólo ha sido informada para un inhibidor de papaína obtenido a partir de semillas de *Vigna inguiculata* (Monteiro Júnior et al., 2017), ya que no es usual la estabilidad térmica para los inhibidores de cisteín proteasas. Es así que, con nuestra investigación, contribuimos al estudio de la estabilidad de los IPPs.

Por otra parte, pudimos detectar actividad anticoagulante del inhibidor de *M. oleifera*, verificando su actividad frente a la vía intrínseca de coagulación.

Finalmente, se determinó la capacidad inhibitoria del crecimiento sobre diversas cepas de bacterias patógenas, comprobando efecto antimicrobiano frente a cepas de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antimicrobiana hallada en este estudio posiciona al inhibidor de papaína de *M. oleifera* como un potencial agente o compuesto anti-infectivo natural, con capacidad para ser aplicado en biotecnología y biomedicina.

Capítulo 4:

Utilización de inhibidores de proteasas en la protección del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Análisis bioinformático para la búsqueda *in silico* de sitios promisorios para la generación de un EGF mutante resistente a la proteólisis

En el presente capítulo se abordará el estudio bioinformático realizado sobre la secuencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), con el fin de definir los sitios promisorios a ser mutables para generar resistencia a la proteólisis por las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético.

*Los resultados obtenidos arrojaron la posibilidad de generar dos moléculas mutantes, las cuales presentarían resistencia a la proteólisis y mantendrían los sitios de interacción con el receptor de EGF. Los ensayos de dinámica molecular para la caracterización de mutantes fueron realizados en colaboración con el Dr. Martín Lavecchia (CEQUINOR, Fac. de Cs. Exactas, UNLP). Los mutantes de EGF se encuentran actualmente en etapa de clonado y se espera su expresión recombinante para evaluar su actividad biológica *in vitro*. Dicha investigación dio lugar a una publicación en el libro de resúmenes de la XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (“Design of a variant of Epidermal Growth Factor resistant to proteases for the treatment of diabetic foot ulcers. Protector role of*

proteases inhibitors". Juliana Cotabarren, Walter D. Obregón, Laura Bakás, SAB, 2016, pp 162-163).

Finalmente, en este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos para el rol protector del inhibidor de carboxipeptidasa A de *Solanum tuberosum* variedad imilla morada (imaPCI, presentado en el Capítulo 2 - Parte 1) sobre el EGF, información que fue publicada en la revista internacional *Phytochemistry* ("Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes". Daniela Lufrano, Juliana Cotabarren, Javier García-Pardo, Roberto Fernandez-Alvarez, Olivia Tort, Sebastián Tanco, Francesc Xavier Avilés, Julia Lorenzo, Walter David Obregón. *Phytochemistry*, 2015, 120, 36-45). Este trabajo fue realizado en conjunto con la Dra. Daniela Lufrano, perteneciente a nuestro grupo de trabajo en Argentina y en colaboración con la Dra. Julia Lorenzo (IBB-UAB-Barcelona-España), co-directora de mi Tesis doctoral, en cuyo laboratorio fueron realizados algunos de los ensayos de caracterización bioquímica de imaPCI.

INDICE CAPITULO 4

4.1 Introducción.....	230
4.1.1 <i>Diabetes Mellitus</i>	230
4.1.2 <i>Rol de las proteasas asociadas a Diabetes Mellitus</i>	231
4.1.3 <i>Estrategias terapéuticas empleando EGF</i>	232
4.1.3.1 <i>Características del EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico)</i>	234
4.1.4 <i>IPPs como potenciales agentes terapéuticos protectores de factores de crecimiento</i>	235
4.1.5 <i>Diseño de EGFs mutantes, resistentes a proteólisis</i>	236
4.2 Materiales y métodos.....	237
4.2.1 <i>Clonado y expresión de EGF salvaje</i>	237
4.2.1.1 <i>Clonado y expresión en Pichia pastoris</i>	237
4.2.1.2 <i>Clonado y transformación en E. coli BL21</i>	238
4.2.2 <i>Diseño de los EGFs mutantes con resistencia a la proteólisis</i>	240
4.2.2.1 <i>Análisis bioinformático de los sitios de corte de las proteasas mayoritarias en las UPD</i>	240
4.2.2.2 <i>Propuestas de EGFs mutantes</i>	240
4.2.2.2.1 <i>Caracterización por dinámica molecular</i>	241
4.2.3 <i>Ensayo protector del EGF</i>	242
4.3 Resultados y discusión.....	243
4.3.1 <i>Clonado y expresión de EGF salvaje</i>	243
4.3.1.1 <i>Clonado y expresión en Pichia pastoris</i>	243
4.2.1.2 <i>Clonado y transformación en E. coli BL21</i>	243
4.3.2 <i>Diseño de los EGFs mutantes con resistencia a la proteólisis</i>	245
4.3.2.1 <i>Análisis bioinformático de los sitios de corte de las proteasas mayoritarias en las UPD</i>	245
4.3.2.2 <i>Propuestas de EGFs mutantes</i>	247
4.3.2.2.1 <i>Caracterización por dinámica molecular</i>	248
4.3.3 <i>Evaluación de la actividad protectora del imaPCI</i>	249
4.4 Conclusiones.....	251

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus (DM) es el único desorden endocrino-metabólico que se expande a la velocidad de una enfermedad pandémica. La ulceración de las extremidades inferiores es una de las complicaciones más serias de esta enfermedad debido a la incapacidad de sostener el crecimiento del tejido de granulación, con una matriz extracelular apropiada para la reepitelización. Alrededor del 19-34% de los pacientes diabéticos desarrollan úlceras conocidas como úlceras del pie diabético (UPD), de los cuales un 20% derivará en la amputación de los miembros inferiores (Armstrong et al., 2017).

La reparación de tejidos es un mega proceso controlado en cada una de sus etapas por varios factores de crecimiento y por citoquinas (Mast & Schultz, 1996), siendo los problemas asociados con la cicatrización de heridas un problema clínico y económico de importancia en estos pacientes. Los mecanismos por los cuales la DM impide la reparación de tejidos no se conocen aún en su totalidad. Sin embargo, las evidencias sugieren un déficit en la producción de diferentes factores de crecimiento tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Doxey, Ng, Dill, & Lacopino, 1995). Además, el receptor de EGF (EGFR) fue identificado como un blanco en la glicosilación, viéndose impedida la autofosforilación del receptor y la activación de la cascada intracelular correspondiente (Portero-Otin et al., 2002).

El déficit de los factores de crecimiento descrito en la DM lleva a: (i) una alteración en la funcionalidad de los fibroblastos, con limitada formación, maduración y remodelado de la matriz extracelular, (ii) disminución en la población de miofibroblastos y (iii) limitación de la respuesta angiogénica. Todos estos factores convergen en una importante falla en el proceso de reparación (Berlanga-Acosta et al., 2017). Sumado a esto, los desórdenes bioquímicos asociados actúan como fuerzas que desencadenan un fenotipo proinflamatorio, prooxidante y prodegradativo (Berlanga-Acosta et al., 2017). Un control metabólico estricto, cuidado de las heridas

y terapia antibiótica son las intervenciones básicas para el tratamiento de las úlceras del pie diabético.

En los últimos años se han implementado nuevas terapias tendientes a promover la cicatrización de las heridas y reducir las amputaciones. Éstas incluyen la terapia de reemplazo de factores de crecimiento con la administración tópica de EGF (Tsang et al., 2003), VEGF (Hanft et al., 2008), un cocktail generado de plasma rico en plaquetas autólogas (Driver, Hanft, Fylling, & Beriou, 2006), heparina de bajo peso molecular (Rullan, Cerda, Frontera, Masmiquel, & Llobera, 2008) y sustitutos de piel generados *in vitro*, obtenidos de ingeniería de tejidos que sirven como biorreactores locales de los factores de crecimiento (Marston, Hanft, Norwood, & Pollak, 2003). A pesar de esto, cuestiones como la alta probabilidad de infecciones dada por las inyecciones intralesión y efectos adversos inducidos por concentraciones suprafisiológicas de EGF, continúan sin resolverse. Más aún, en dichas terapias continúa siendo un desafío muy importante contrarrestar las limitaciones farmacodinámicas relacionadas con el microambiente hostil de las heridas crónicas.

4.1.2 ROL DE LAS PROTEASAS ASOCIADAS A DIABETES MELLITUS

Se ha demostrado que la desregulación de la cantidad y/o actividad de proteasas extracelulares, con la concomitante degradación de factores de crecimiento y de proteínas de la matriz extracelular constituye uno de los principales factores determinantes de la no reparación de heridas en diabéticos. Los resultados de muchos estudios han identificado defectos en la cicatrización de heridas en pacientes diabéticos que pueden explicarse en gran parte por células disfuncionales de la herida y por desequilibrios en proteasas clave, citoquinas y factores de crecimiento. En contraste con la curación normal de heridas, la reacción inflamatoria en heridas diabéticas con mala cicatrización parece prolongada, lo que genera una respuesta de proteasas intensificada, en particular MMPs y neutrófilo elastasa. Los granulocitos también secretan citoquinas proinflamatorias, en particular el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1). Ambas citoquinas son capaces de estimular directamente la síntesis de las MMPs. Además, el TNF estimula su propia secreción y la de la IL-1, lo que puede contribuir a un estado inflamatorio persistente (Mast & Schultz, 1996; Nwomeh, Liang, Cohen, & Yager,

1999; Chen et al., 1999). El alto nivel de proteasas en el sitio de la herida conduce a un proceso de cicatrización de las heridas interrumpido y no coordinado al degradar las proteínas de la matriz y los factores de crecimiento que son esenciales para la curación (Chen et al., 1999).

4.1.3 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EMPLEANDO EGF

Las estrategias terapéuticas utilizadas para el tratamiento de las úlceras del pie diabético dependen de la gravedad de la lesión (Alexiadou & Doupis, 2012). La clasificación más comúnmente usada para las úlceras del pie diabético se basa en 5 categorías de severidad incrementada, siendo las de grado I úlceras superficiales, las de grado II úlceras que afectan filamentos y músculos, las de grado III úlceras profundas frecuentemente complicadas con osteomielitis, las de grado IV úlceras con gangrenas localizadas mientras que las de grado V corresponde a úlceras con gangrena que involucra al pie entero (Mehraj, 2018).

Una de las terapias utilizadas es la administración tópica de EGF, la cual comienza en 1989 en procesos de cicatrización de tejidos periféricos, existiendo también documentación de su empleo por vía intravenosa, oral o rectal para el tratamiento de úlceras gastrointestinales. Además existe información de su empleo en formulaciones orales para el tratamiento de úlceras (Acosta et al., 2006). Los estudios han demostrado un efecto dependiente de la dosis y su seguridad ha sido demostrada en experimentos de toxicidad (Tuyet et al., 2009). Sin embargo, su uso sistémico ha sido limitado por promover crecimiento epitelial anormal y la generación de tumores (Krishnan, Arnone, & Buchman, 2011), aunque existe una batería de estudios preclínicos documentando que EGF no induce genotoxicidad, mutagenicidad o citotoxicidad (Maraschin et al., 1995; Causa & Herrero Vila, 2015). Si bien EGF juega un rol importante en el desarrollo de cáncer, no es un agente iniciador, debido a los múltiples mecanismos endógenos que protegen a las células normales contra un evento mitogénico no programado. Sin embargo, en muchos tumores humanos epiteliales, el receptor de EGF está sobreexpresado (Arteaga, 2002), por lo que es evidente que en este contexto cualquier terapia con factores de crecimiento está contraindicado, por lo que la administración de factores de crecimiento debe ser cuidadosamente evaluada en relación al balance de los riesgos y beneficios (Nair et al., 2008). En cuanto a las formulaciones tópicas el problema es

la difusión de los agentes activos, ya que ésta se encuentra afectada en tejidos necróticos, sepsis e inflamación. Alternativamente, la inyección intralesión puede llevar al agente activo a la región deseada.

Estudios clínicos realizados en pacientes diabéticos tratados con rhEGF (EGF recombinante humano) han arrojado resultados muy heterogéneos. Un estudio preliminar con rhEGF inyectado intralesión en úlceras del pie diabético mostró una disminución del 50% de las amputaciones de 29 pacientes tratados. La terapia consistió en inyectar 25 µg dos veces por semana durante 5 semanas. En estas pruebas, tanto la severidad de la úlcera como la vía de administración de EGF (tópica o intralesión) mostraron importantes variaciones. La principal conclusión derivada de estos estudios fue que el efecto de EGF sobre la velocidad de cicatrización de las úlceras, depende de la concentración de EGF, de la forma farmacológica empleada y de la severidad de la lesión (Fernandez-Montequin et al., 2009; Berlanga et al., 2013). A pesar de los progresos terapéuticos, las úlceras del pie diabético continúan aun siendo difíciles de manejar, lo que se refleja en la alta incidencia anual de ulceración y amputación (Armstrong et al., 2017).

Propuesta terapéutica de nuestro estudio

El permanente avance en el conocimiento de las Ciencias Médicas alienta el abordaje de investigaciones referidas a la búsqueda de nuevas estrategias para la administración y liberación de factores de crecimiento (GFs) que aseguren una mejora en la biodisponibilidad de estas moléculas en los tejidos lesionados. En este sentido una propuesta a futuro para el tratamiento adicional de las UPDs podría incluir:

(i) la administración de inhibidores de metaloproteinasas para evitar la proteólisis temprana de los EGF suministrados de forma exógena y atacar el proceso infeccioso, y

(ii) la construcción de una variante del EGF recombinante que presente resistencia a la proteólisis.

4.1.3.1 Características del EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico)

El EGF también denominado Factor modulador de la proliferación celular, es un polipéptido pequeño, estable y resistente constituido por 53 aminoácidos (6045 Da). La secuencia aminoacídica del EGF es:

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

y posee 3 puentes disulfuros: Cys-6 - Cys-20; Cys-14 - Cys-31 y Cys-33 - Cys-42 (Figura 4.1), los cuales son muy trascendentes en la estabilidad de la proteína y en su función, en especial al anclarse a su receptor.

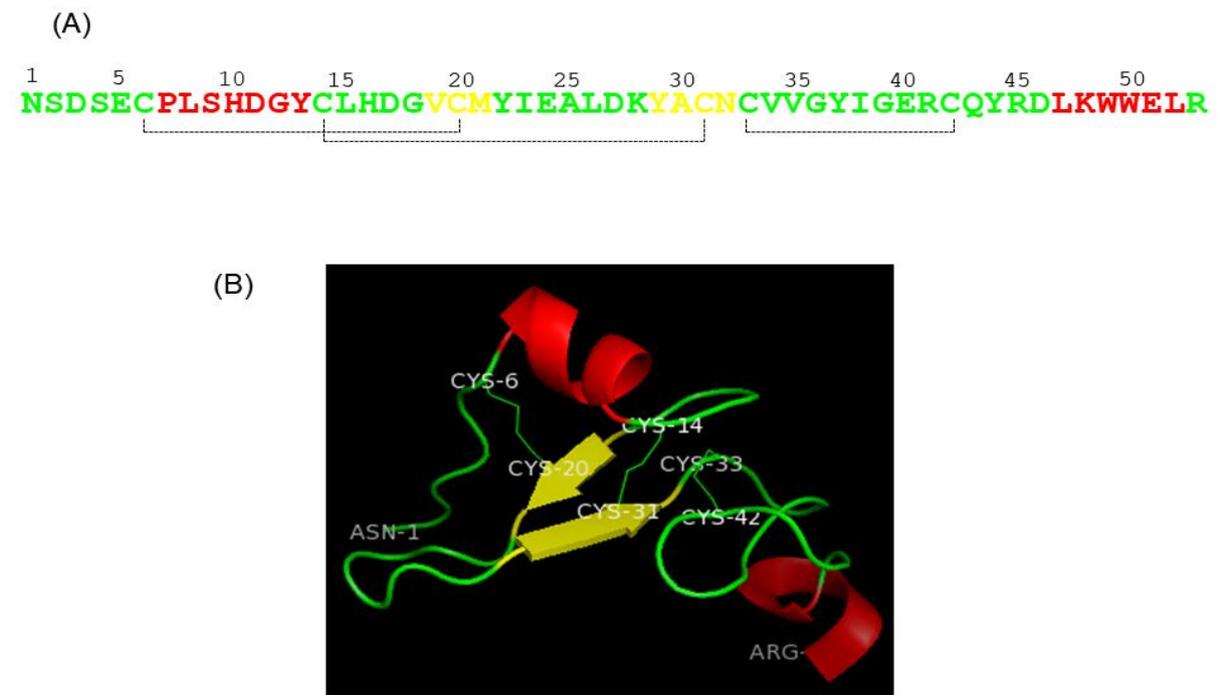


Figura 4.1: Secuencia y estructura tridimensional del EGF. (A) Secuencia aminoacídica del EGF. En líneas punteadas se indican las cisteínas involucradas en puentes disulfuro. Residuos color verde: "Loops", residuos color rojo: hélices alfa, residuos color amarillo: láminas beta. (B) Esquema del EGF donde se observan los residuos N-terminal (ASN-1) y C-terminal (ARG-53). Además se observan los puentes disulfuro unidos por líneas; CYS-6 - CYS-20, CYS-14 - CYS-31, CYS-33 - CYS-42.

El Factor de crecimiento epidérmico, es una biomolécula de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La actividad biológica de EGF depende de su unión a receptores de membrana específicos, a través de los cuales ejerce un potente efecto mitogénico (Bennett & Schultz, 1993). Esta actividad es

importante en el proceso de cicatrización de heridas, situación en la que los macrófagos, los queratinocitos y otras células inflamatorias migran a la zona dañada segregando EGF, el cual se distribuye ampliamente en secreciones tisulares y fluidos. El receptor de EGF se expresa en la mayoría de los tipos celulares incluyendo aquellos que juegan un rol crítico en la reparación de heridas como fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos (Wenczak, Lynch, & Nanney, 1992).

El EGF, al interactuar con su receptor activa determinadas vías de transducción de señales que promueven la regeneración epidérmica y la reepitelización. Se han detectado mutaciones y amplificaciones de EGFR en cáncer de pulmón (da Cunha Santos, Shepherd, & Tsao, 2011), de cabeza y cuello (Perisanidis, 2017), de mama (Kim, Jang, Lee, & Bae, 2017), glioblastomas (Xu et al., 2017) y otros tipos de cáncer (Normanno et al., 2006).

4.1.4 IPPS COMO POTENCIALES AGENTES TERAPÉUTICOS PROTECTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO

En los últimos años ha sido muy estudiado el rol de las proteasas en las heridas crónicas de humanos. Se ha informado que los niveles y/o actividad de determinadas metaloproteinasas de matriz (MMP-2, MMP-8 y MMP-9) (Lazaro et al., 2016) y de serin proteasas, como la neutrófilo elastasa (McCarty & Percival, 2013) se encuentran característicamente aumentados en exudados de heridas crónicas.

Durante el tratamiento de las UPD, el tiempo medio de residencia de EGF sugiere que más de un 60% de la cantidad administrada puede desaparecer en las 2 primeras horas post administración. Se ha observado que la degradación del EGF en presencia de exudados de heridas crónicas ha sido completamente inhibida por la presencia de inhibidores sintéticos de MMPs, indicando que la degradación de este factor de crecimiento en las heridas crónicas está principalmente mediada por este tipo de proteasas (Berlanga-Acosta et al., 2017).

Por este motivo una terapia que incluya la administración de IPPs de las principales proteasas involucradas en las UPDs (ej: inhibidores de metaloproteasas) sería altamente eficaz para el tratamiento de esta patología. De este modo sería posible al amortiguar y desacelerar el proceso proteolítico exacerbado característico

del microambiente de las UPDs, atacando en simultáneo el proceso infeccioso generado en la herida.

4.1.5 DISEÑO DE EGFS MUTANTES, RESISTENTES A PROTEOLISIS

Como mencionamos anteriormente, la desregulación de la cantidad y/o actividad de proteasas extracelulares con la concomitante degradación de GFs, de proteínas de la matriz extracelular y de algunos IPs constituye uno de los principales factores determinantes de la no reparación de heridas. En este sentido, las terapias de administración exógena de GFs en las UPDs representan un mecanismo diseñado con el fin de suplantar la disminución de factores de crecimiento en el microentorno proteolítico de la herida. Sin embargo, la biodisponibilidad de GFs continuará siendo disminuida por la proteólisis exacerbada en las UPD, representando una solución temporal para el problema de la cicatrización de heridas. En base a lo mencionado, la generación de una proteína recombinante de EGF resistente a la proteólisis (EGFres) por las proteasas mayoritarias presentes en las heridas de pie diabético, que conserve su actividad biológica, resultaría en una mejor respuesta a la infección y una recuperación más factible de la herida.

En este último capítulo de la Tesis doctoral se proponen dos objetivos; (i) el diseño de variantes de EGF resistentes a las proteasas mayoritarias en las UPD, y (ii) la evaluación de la actividad protectora de EGF del inhibidor recombinante de MCPs informado en el capítulo 2 (imaPCI), con el fin de disminuir la proteólisis de dicho factor de crecimiento.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Clonado y expresión de EGF salvaje

4.2.1.1 Clonado y expresión en *Pichia pastoris*

Con el fin de optimizar un método de producción de EGF salvaje (sin mutaciones), se procedió al clonado y expresión de dicho factor de crecimiento en el sistema de levaduras *Pichia pastoris* (cepa X-33). Para ello se empleó como material de partida la construcción de vector pUC57_hEGF (GenScript) presentada en la Figura 4.2 (A). Se realizó una doble digestión con las enzimas XhoI / NotI con posterior purificación del fragmento correspondiente al hEGF desde el gel de agarosa (cfr. 2.2.1.2.1.4) y ligación al vector pPICZαA entre los sitios XhoI / NotI (Figura 4.2 B).

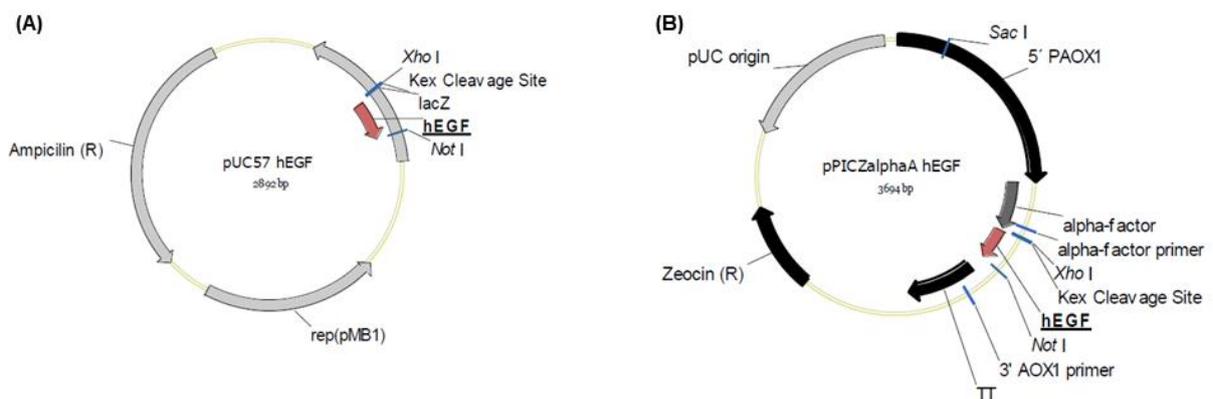


Figura 4.2: Construcción de clonado para la expresión de hEGF en *Pichia pastoris*. (A) vector pUC57_hEGF (GenScript), (B) vector pPICZαA_hEGF.

El paso siguiente consistió en la linearización del plásmido pPICZαA_hEGF con la enzima de restricción SacI y posterior purificación del plásmido linearizado desde el gel de agarosa. A continuación se electrotransformó una alícuota de células X-33 (*P. pastoris*) competentes con el ADN purificado empleando un electroporador Gene Pulser II (BioRad), bajo los siguientes parámetros: 1500 V, 200 Ω, 25 μF. Luego se incubó a 30 °C con agitación por 1,5 h en 1 ml de medio YPD y posterior crecimiento a 30 °C en placas YPDS-agar conteniendo Zeocina. Las transformantes fueron chequeadas mediante colony-PCR empleando los *primers* alpha-factor y 3'AOX1. Se seleccionó una transformante y se creció a 30 °C con agitación en

medio BMG hasta una DO_{600nm} igual a 2,0. Se recolectaron las células del pre-inóculo por centrifugación (2000 g, 5 min) y resuspensión en medio BMM (1/5 del volumen original). Se expresó durante 72 hs a 30 °C con agitación continua y agregado de metanol (concentración final 5% v/v) cada 24 h. El hEGF se purificó a partir del sobrenadante de expresión mediante cromatografía de intercambio catiónico seguida por cromatografía de exclusión molecular.

4.2.1.2 Clonado y transformación en *E. coli* BL21

Con el fin de contar con un sistema simple para posteriores ensayos de mutagénesis sitio-dirigida, se procedió al clonado del EGF salvaje en el vector pGEM-T Easy, con el agregado del péptido señal OmpA3 para una futura expresión en *E. coli* BL21.

Como material de partida se empleó el vector pPICZ α A_hEGF y se utilizó como molde en una sucesión de tres PCR's consecutivas donde, mediante diseño de *primers*, se logró adicionar a la secuencia del hEGF (Q6QBS2_HUMAN) el péptido señal OmpA3 y sitios para el corte con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI (Figura 4.3).



Figura 4.3: Estrategia de PCR's recursivas para la inserción del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF.

En la Figura 4.4 se observa la secuencia de los primers diseñados para el desarrollo de las PCR's recursivas, los cuales presentan una región 3' que permite la hibridación a la cadena molde, y una región 5' que será adicionada para luego permitir la hibridación en la PCR posterior.

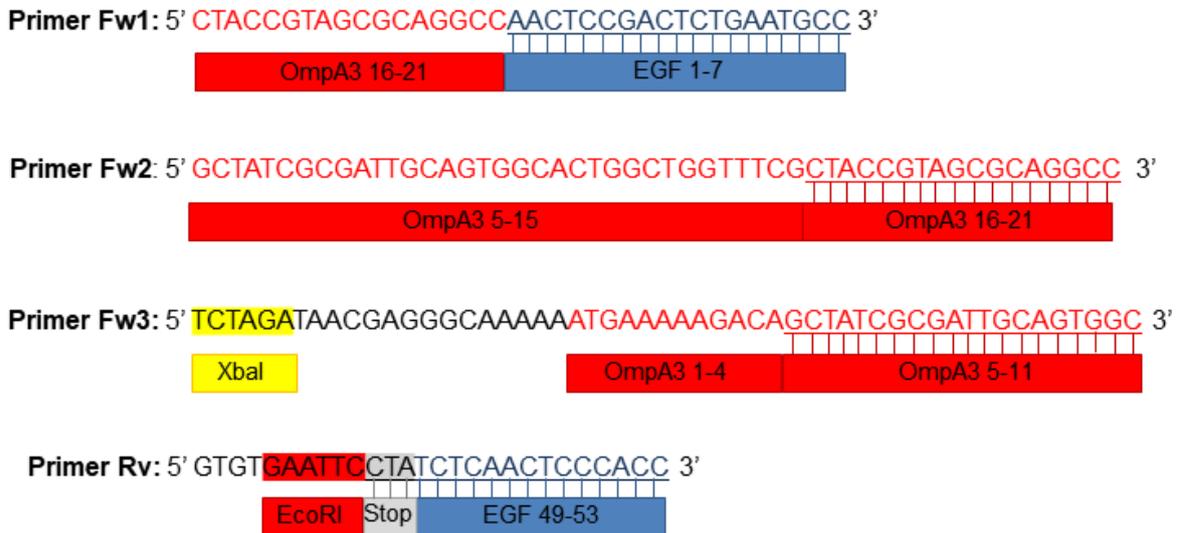


Figura 4.4: Diseño de primers para la adición del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF. Se observan subrayadas y unidas las regiones de hibridación entre la cadena molde y los *primers*.

En la siguiente tabla se muestran los *primers* diseñados, indicando sus propiedades más relevantes:

Tabla 4.1: *Primers* diseñados para el clonado de hEGF.

<i>Primer</i>	Largo Total	Largo de Hibridación	% GC	Tm (°C)
Fw3	53 pb	20 pb	60	62,5
Fw2	51 pb	17 pb	71	59,8
Fw1	36 pb	19 pb	53	57,5
Rv	27 pb	17 pb	53	52,4

El producto de las PCRs, al que denominamos OmpA3_hEGF fue clonado en el vector pGEM-T Easy y transformado en *E. coli* XL1-Blue (cfr. 2.2.1.2.1.6.3) para la confirmación de secuencia y posterior subclonado en el vector pINIII, con el fin de realizar la expresión del hEGF en *E. coli* BL21 empleando el protocolo puesto a punto en el capítulo 2.

4.2.2 Diseño de los EGFs mutantes con resistencia a la proteólisis

4.2.2.1 Análisis bioinformático de los sitios de corte de las proteasas mayoritarias en las UPD

Para el análisis bioinformático de los sitios de corte de las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético se empleó la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Se seleccionaron como proteasas mayoritarias en las UPD a las metaloproteasas de matriz MMP-1, MMP-2, MMP-8 y MMP-9, a la neutrófilo elastasa y finalmente catepsina-G. Para cada una de ellas se analizaron los residuos de corte de preferencia (o patrón de clivaje) y se realizó un análisis minucioso de aquellos sitios promisorios a ser clivados en la secuencia del EGF salvaje. Finalmente, se seleccionaron las secuencias del EGF con mayor probabilidad de corte.

4.2.2.2 Propuestas de EGFs mutantes

Con el objeto de generar una molécula de EGF que sea más resistente a la proteólisis (comparado con el EGF salvaje) pero que a su vez mantenga la actividad biológica intacta, se analizaron los sitios promisorios a mutar sin que afecte al plegamiento del EGF y su interacción con el receptor (EGFR). Se realizaron tres propuestas de EGFs mutantes que, en principio mantendrían la estructura tridimensional del EGF intacta y en los cuales se encuentra limitada la acción de proteasas al cambiar aminoácidos esenciales para el ataque proteolítico. A cada uno de estos mutantes se les realizó una caracterización preliminar por dinámica molecular, con el fin de evaluar *in silico* su plegamiento e interacción con el receptor.

4.2.2.2.1 Caracterización por dinámica molecular

La dinámica molecular es una herramienta computacional, basada en la Química, la Física y la Matemática, para simular, describir y predecir modelos y comportamientos moleculares en sistemas de interacción biológica.

Para cada uno de los mutantes diseñados se evaluaron 2 parámetros:

- la energía de interacción con el receptor de EGF como un indicativo del potencial de cada mutante propuesto para unirse al receptor y presentar actividad biológica, y
- la superficie de área de Born mediante mecánica molecular (MM-GBSA) como parámetro de discrepancia entre el plegamiento del EGF mutante respecto al plegamiento del EGF salvaje.

Estos estudios fueron llevados a cabo por el Dr. Martín Lavecchia perteneciente al Centro de Química Inorgánica "Dr. Pedro J. Aymonino" (CEQUINOR), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

La estructura de EGF/EGFR seleccionada de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2000) fue la 3NJP (0.1128/MCB.00742-10), mientras que los mutantes de EGF fueron generados a partir de la estructura del EGF con el editor y visualizador molecular USCF Chimera (Pettersen et al., 2004). Los hidrógenos y refinamientos fueron aplicados mediante el servidor MolProbity (Chen et al., 2009). El campo de fuerza empleado para representar los sistemas fue el AMBER FF14SB, parametrizado con el programa Leap, incluido en el paquete de programas AmberTools16. Alrededor fue generada una caja de moléculas de aguas del tipo TIP3P, a una distancia de 15 Å. Las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas con el programa NAMD2 (Kalé et al., 1999). Se aplicó una minimización de 100000 pasos, un calentamiento de 0 a 300 K y una equilibración/producción de 20 ns en ensamble NTP, con un paso de tiempo de 1 fs. El cálculo de la energía de interacción entre EGF y mutantes con el EGFR fueron realizados con el programa MMPBSA.py, también incluido en el paquete de programas "AmberTools". El modelo utilizado fue el MM-GBSA (*Generalized Born*) aplicado a 1000 frames extraídos de los últimos 10 ns de la simulación. Esta metodología es denominada de punto final, ya que utiliza las energías libres de los complejos con EGFR y las especies disociadas, estimadas bajo un esquema de solvatación implícita. La desviación

cuadrática media (RMSD) y la energía de interacción se utilizaron como parámetros para la elección del mutante que posea características más próximas al EGF, tanto estructural como energéticas. Además, se evaluó el RMSD de los mutantes libres con respecto al EGF.

4.2.3 Ensayo protector del EGF

Para evaluar la actividad protectora del inhibidor de metaloproteasas recombinante aislado en el capítulo 2 (imaPCI), se incubó EGF recombinante humano (2,5 µg) con las siguientes metaloproteasas: bCPA 30 nM y pCPB 50 nM en ausencia o presencia de inhibidor 100 nM durante 2 h a 37 °C en tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 250 mM. Después de la incubación, las reacciones fueron detenidas por adición de un volumen igual (20 µl) de TFA al 0,1% en agua, y luego, se prepararon muestras y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentados se dividen en tres secciones.

- 1) En primer lugar se puso a punto la producción de EGF recombinante humano con el fin de utilizarlo como control en los ensayos de protección de factores de crecimiento utilizando inhibidores de proteasas y también para ser utilizado como molde en futuros ensayos para la construcción de mutantes.*
- 2) En segundo lugar se realizó un estudio bioinformático de los sitios de corte por las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético, para luego proponer EGFs mutantes con resistencia a la proteólisis.*
- 3) Por último se realizó un ensayo in vitro para evaluar el rol protector del inhibidor de metalocarboxipeptidasa recombinante (obtenido en el capítulo 2) frente al EGF recombinante control expresado inicialmente en este capítulo.*

4.3.1 Clonado y expresión de EGF salvaje

4.3.1.1 Clonado y expresión en *Pichia pastoris*

El clonado y expresión del EGF recombinante humano (hEGF) en el sistema de levaduras *Pichia pastoris* fue exitoso. Luego de realizados los pasos de purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico (Streamline Direct HST, GE) y de exclusión molecular (Superdex 30 prep grade, GE) se verificó la identidad del EGF expresado por PMF-MALDI-TOF/MS. El EGF recombinante humano aquí expresado se reservó para el ensayo de protección que será presentado más adelante.

4.3.1.2 Clonado y transformación en *E. coli* BL21

La estrategia de clonado del hEGF en el vector pIN-III consistió en una serie de PCRs recursivas con la utilización de *primers* solapantes, cuya finalidad fue adicionar la secuencia OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF y las enzimas de restricción para el clonado (Figura 4.5).

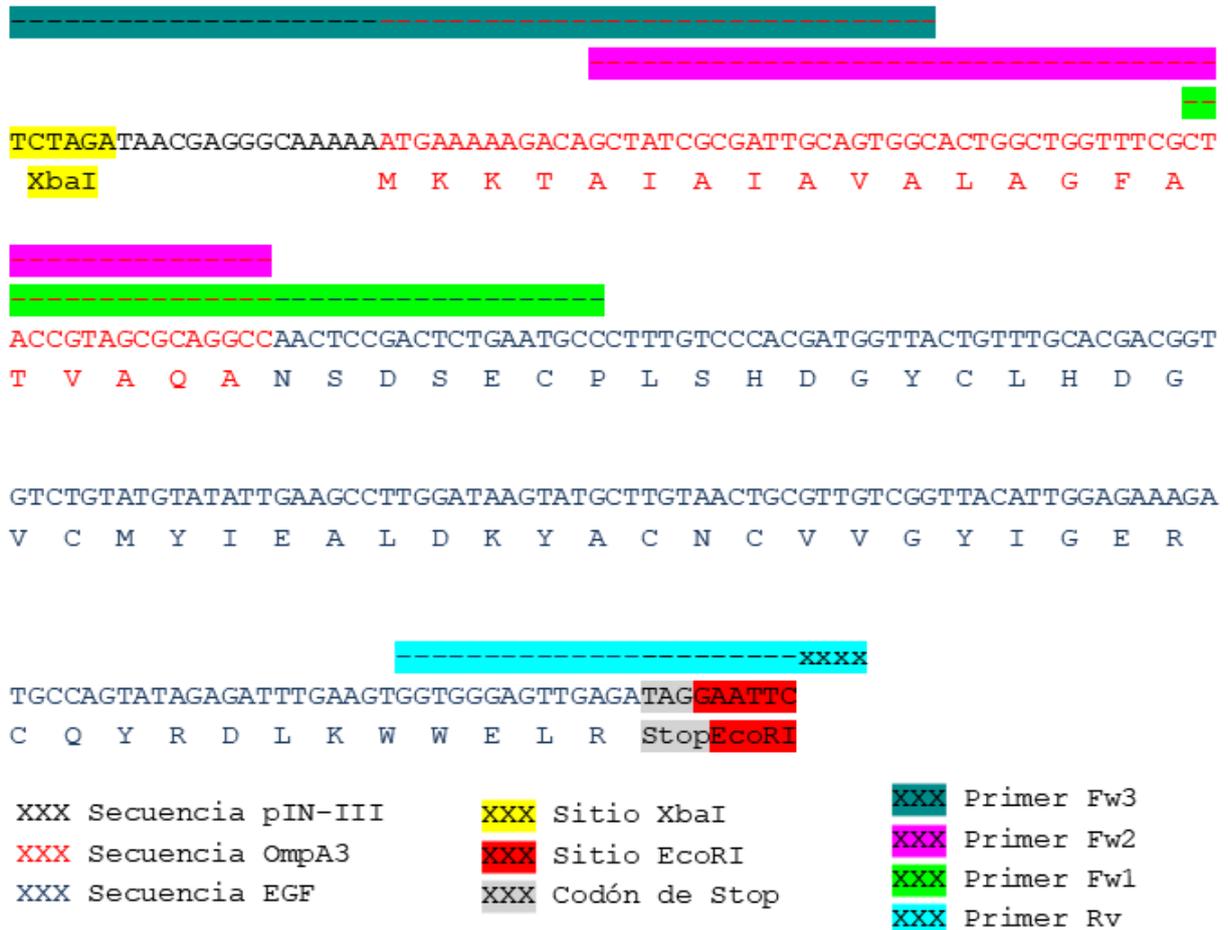


Figura 4.5: Secuencia de pIN-III-OmpA3_hEGF con las regiones de hibridación para los primers y sitios de restricción.

En la Figura 4.6 se muestra la electroforesis en gel de agarosa para las 3 PCRs realizadas.

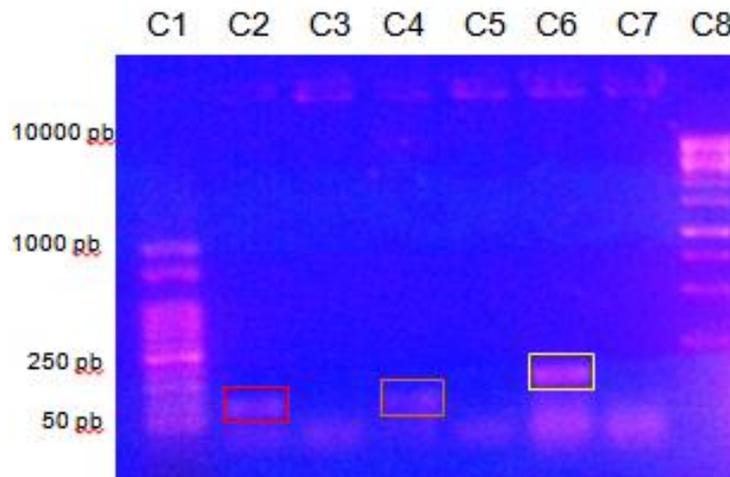


Figura 4.6: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de las PCRs sucesivas para la inserción del péptido señal OmpA3 en el extremo N-terminal del hEGF. El recuadro rojo señala el producto de la PCR1, el recuadro naranja señala el producto de la PCR2 y el recuadro amarillo señala el producto de la PCR3.

Se puede observar el aumento en el tamaño del producto de PCR, siendo el producto de la PCR3 denominado “OmpA3_hEGF”, el cual fue posteriormente ligado a pGEM-T Easy y enviado a secuenciar para la confirmación de su identidad. El vector pGEM-T Easy_OmpA3_hEGF se reservó para ensayos futuros, en los cuales se construirán los mutantes de EGF resistentes a la proteólisis.

4.3.2 Diseño de los EGFs mutantes con resistencia a la proteólisis

4.3.2.1 Análisis bioinformático de los sitios de corte de las proteasas mayoritarias en las UPD

La primera etapa del diseño de EGFs mutantes resistentes a la proteólisis producida por las proteasas mayoritarias en las UPD consistió en analizar las regiones del EGF más promisorias al clivaje. En la Figura 4.7 se muestra un mapa de los sitios del EGF que se encuentran con mayor probabilidad de hidrólisis.

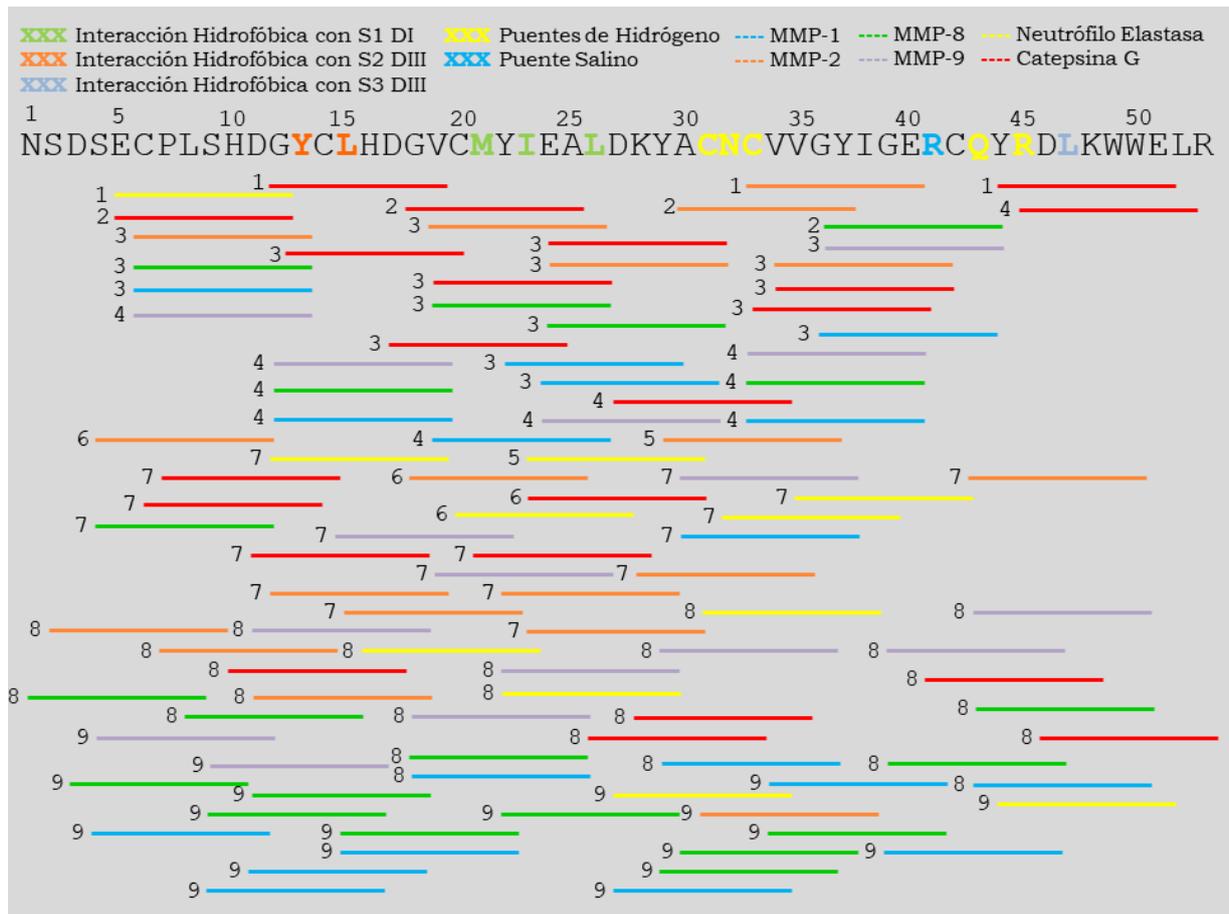


Figura 4.7: Esquema de los sitios de reconocimiento para el corte por proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético. Cada color representa el reconocimiento de una proteasa específica. En la parte superior se muestra la secuencia del EGF con los sitios indispensables para su plegado y unión al receptor. Los números 1-9 son indicativos de la probabilidad de corte.

Podemos apreciar que los sitios con mayor probabilidad de corte corresponden a la Leu8, Leu15, Gly36 y Leu47, de las cuales la Leu15 y la Leu47 son residuos involucrados en interacciones con el receptor de EGF, por lo tanto no pueden ser mutadas.

4.3.2.2 Propuestas de EGFs mutantes

Si bien existen numerosos sitios de corte por parte de las proteasas mayoritarias en las UPDs, hemos diseñado 3 EGFs mutantes que mantienen la estructura del EGF salvaje y que limitan la acción de proteasas al cambiar aminoácidos esenciales para el ataque proteolítico. Los sitios importantes para el plegamiento del EGF y la interacción con el receptor fueron tenidos en cuenta como residuos indispensables para la funcionalidad del EGF, por lo tanto fueron sitios descartados al momento de diseñar los mutantes. A su vez, en aquellos sitios que fueron escogidos para modificar, se priorizó la elección de aminoácidos cuya incorporación modifique la probabilidad de clivaje por parte de las proteasas pero que, al mismo tiempo, no represente un residuo voluminoso con posibilidad de afectar a la estructura general del EGF.

Bajo estos criterios se diseñaron 3 EGFs mutantes:

- EGFmutA (Leu8_Thr + Gly36_Ser + Gly39_Ser): La leucina en la posición 8, la glicina en la posición 36 y la glicina en la posición 39 fueron reemplazadas por treonina, serina y serina respectivamente.
- EGFmutB (Leu8_His): La leucina en la posición 8 fue reemplazada por histidina.
- EGFmutC (Leu8_His + Gly36_Thr + Gly39_Thr): La leucina en la posición 8, la glicina en la posición 36 y la glicina en la posición 39 fueron reemplazadas por histidina, treonina y treonina respectivamente.

Como puede apreciarse, en las 3 propuestas de EGFs mutantes se encuentra el reemplazo de la leucina en posición 8, dado que se sabe que esta mutación disminuiría el ataque proteolítico por parte de las proteasas mayoritarias en las UPDs MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, que necesitan de una Leu en el sitio de clivaje.

4.3.2.2.1 Caracterización por dinámica molecular

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados de las energías de interacción con EGFR para cada mutante y la desviación obtenida a partir de cálculos de MM-GBSA de las trayectorias de dinámica molecular.

Tabla 4.2: Energía de interacción con el receptor de EGF.

Molécula	Energía de interacción (kcal/mol)	Desviación estándar (kcal/mol)
EGF	-86,2898	9,5088
EGFmutA	-92,7806	9,0466
EGFmutB	-88,6203	8,3910
EGFmutC	-108,1888	8,9485

Dado que el objetivo principal del diseño de mutantes es preservar la actividad biológica del EGF, priorizamos aquellos mutantes con menores diferencias en la energía de interacción con el receptor. Se observó que el mutante más próximo a la energía de interacción del EGF salvaje es el EGFmutB, seguido por el EGFmutA. Se desprende de estos resultados que el EGFmutC presenta mayor afinidad por EGFR que el resto de las secuencias, por lo tanto no sería un mutante óptimo para ser clonado y expresado, ya que en esta etapa de la investigación es desconocido el efecto que desencadenaría una interacción EGF-EGFR mayor a la encontrada en la naturaleza.

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados de RMSD durante las dinámicas moleculares, que es un parámetro indicativo de la discrepancia entre cada mutante y el EGF salvaje (a mayor número, más discrepancia). La estructura que presentó menor variación frente al EGF control fue mutB, seguida por mutA y mutC.

Tabla 4.3: RMSD de los EGFs mutantes respecto al EGF salvaje.

Molécula	Avg	Sd	Min	Max
EGFmutA	1,534	0,239	0,529	2,734
EGFmutB	1,527	0,233	0,702	2,985
EGFmutC	1,653	0,299	0,662	2,710

Dados los resultados obtenidos por dinámica molecular, en un futuro se procederá a la construcción del EGFmutB como mutante inicial para su clonado y expresión con el fin de ensayar la resistencia a la proteólisis y verificar si la mutación es efectiva para tal fin.

4.3.3 Evaluación de la actividad protectora del rimaPCI

La capacidad de rimaPCI para proteger a las proteínas con interés biotecnológico y biomédico de la proteólisis C-terminal se evaluó utilizando EGF recombinante humano. Para este fin, hEGF recombinante se incubó con una mezcla de bCPA y pCPB en ausencia o presencia de rimaPCI durante 2 h a 37 °C y pH 7,5. Los productos de la digestión fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS. Los espectros representativos se muestran en la Figura 4.8 A-C.

La acción combinada de bCPA y pCPB produjo la remoción de hasta seis residuos C-terminales de la molécula de hEGF, siendo los principales productos las formas EGF1-47 y EGF1-48. También se observó un pico de menor intensidad, correspondiente a la forma EGF1-51. Como se muestra en la Fig. 4.8 C, la adición de rimaPCI 100 nM a la mezcla de reacción, tuvo un efecto protector C-terminal de EGF por MCPs mediante el bloqueo de la escisión de la unión entre los residuos Glu51 y Leu 52.

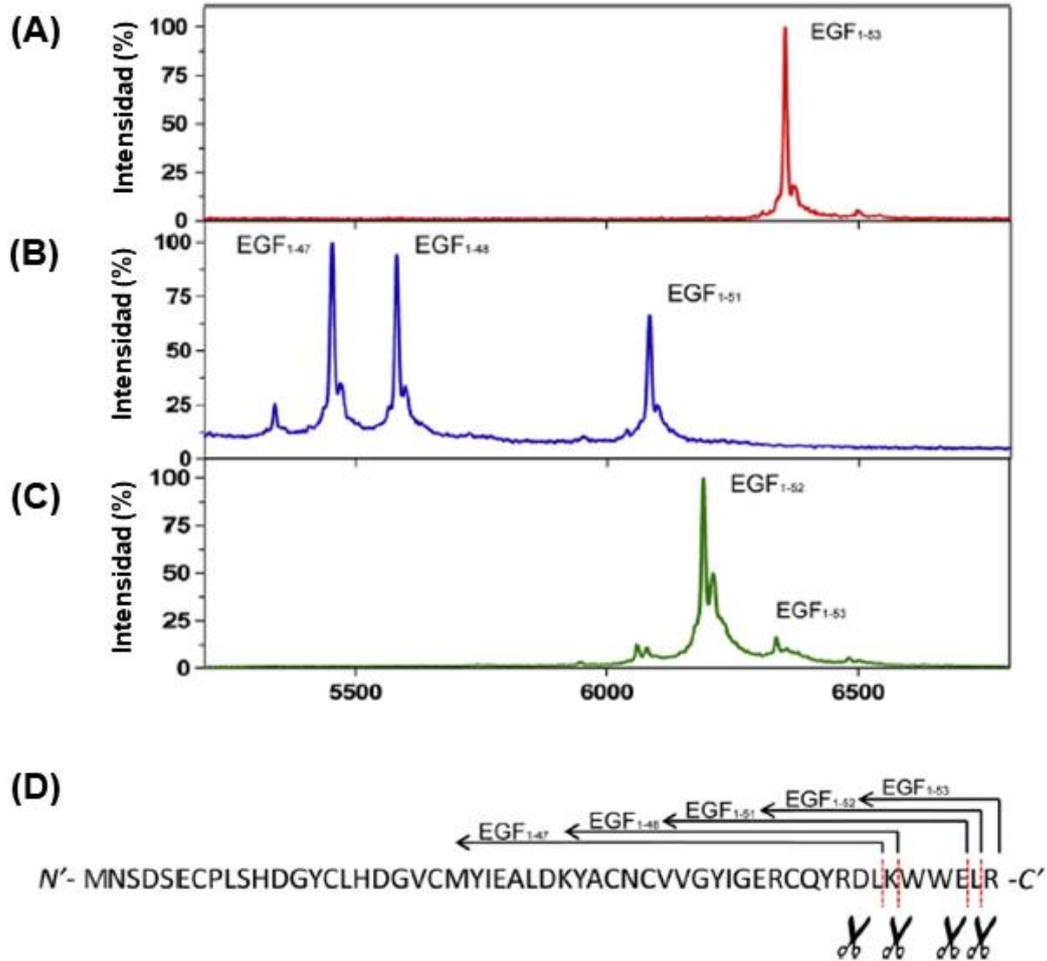


Figura 4.8: Análisis proteómico de la proteólisis C-terminal del hEGF en presencia de rimaPCI. MALDI-TOF/MS del hEGF completo (EGF1-53) luego de incubarlo en (A) ausencia o (B) presencia de una mezcla de bCPA 30 nM y bCPB 50 nM. (C) MALDI-TOF/MS del hEGF incubado con bCPA y bCPB en presencia de rimaPCI 100 nM. (D) Secuencia del hEGF con las regiones susceptibles a proteólisis C-terminal indicadas por tijeras.

4.4 CONCLUSIONES

En el presente capítulo se logró la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), en el sistema de levaduras *Pichia pastoris*, para su utilización como EGF control en los ensayos de protección posteriores. Además se generó una construcción de hEGF con el péptido señal OmpA3 unido a su extremo N-terminal, con el objeto de utilizarlo en ensayos futuros para su expresión en *E. coli* BL21.

Por otro lado, se realizó un análisis de los sitios de corte por las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético, a partir del cual fue posible el diseño de EGFs mutantes resistentes a la proteólisis. Mediante técnicas de dinámica molecular se logró caracterizar los mutantes propuestos en función de su energía de interacción con el receptor y de la superficie de área de Born para la comparación estructural con el EGF salvaje. Estos resultados permitieron establecer un orden de prioridad en los mutantes a clonar y expresar, para luego realizar los ensayos *in vitro* de resistencia a la proteólisis y verificar si la mutación es efectiva para tal fin.

Finalmente, se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el rol protector del inhibidor de metalocarboxipeptidasa recombinante (rimaPCI), obtenido en el capítulo 2) frente al EGF control expresado en *Pichia pastoris*. Este estudio permitió comprobar que el EGF en presencia del imaPCI recombinante se encuentra protegido frente a la proteólisis producida por las metaloproteasas bCPA y bCPB, representando el primer resultado reportado para la actividad protectora de los inhibidores peptídicos de proteasas en un factor de crecimiento.

Los resultados aquí presentados incentivan a continuar con el estudio de los EGFs mutantes y la posible encapsulación de estas moléculas para ser administradas tópicamente en las úlceras de pie diabético. Además, se propone continuar los ensayos de protección con el fin de evaluar el rol de los IPPs en la protección del EGF frente a otras proteasas.

Capítulo 5:

Conclusiones Generales y Perspectivas

CONCLUSIONES GENERALES

❖ Se aisló un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa A (CPA) de papa andina denominado imaPCI, el cual fue clonado, expresado y caracterizado bioquímicamente.

❖ imaPCI presentó una identidad del 89% con el inhibidor de carboxipeptidasa A proveniente de papa común (PCI_t), observándose la típica organización de los inhibidores de metalocarboxipeptidasa, que consiste en una región N-terminal de propéptido formada por 27 aminoácidos, seguida de 39 residuos correspondientes a la proteína madura y una extensión de 7 residuos C-terminales. Más aún, encontramos conservadas las seis cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro (Cys8-Cys12; Cys24-Cys27 y Cys18-Cys34).

❖ Las principales diferencias entre imaPCI y PCI_t fueron localizadas en la región conocida como sitio secundario de unión. Dichas variaciones son interesantes para el clonado, expresión y purificación de imaPCI para su estudio, caracterización y comparación de parámetros cinéticos con PCI_t, ya que los aminoácidos de diferencia contribuyen energéticamente con la interacción proteasa-inhibidor.

❖ El imaPCI recombinante (rimaPCI) fue caracterizado por cinética de inhibición y técnicas proteómicas. Todos los valores de K_i determinados para rimaPCI se encuentran en el rango nanomolar, característica de inhibidores de unión fuerte de MCPs. Por espectrometría de masas MALDI-TOF corroboramos la presencia de un pico de peso molecular 4234,8 Da, concordante con el valor teórico (4234 Da) de la secuencia aminoacídica estimada para el cDNA clonado que codifica para rimaPCI. El análisis de la huella peptídica no pudo determinar la identidad de imaPCI, confirmando que se trata de un nuevo inhibidor, no estudiado hasta el momento. Por

espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se secuenció un péptido interno de 13 residuos de aminoácidos que corresponde parcialmente a la secuencia del inhibidor de CPA (PCI_t) depositada en la base de datos.

❖ rimaPCI fue ensayado *in vitro* para evaluar el rol protector del inhibidor de metalocarboxipeptidasa recombinante frente al EGF. Este estudio permitió comprobar que el EGF, en presencia del rimaPCI, se encuentra protegido frente a la proteólisis producida por las metaloproteasas bCPA y bCPB, representando el primer resultado informado sobre la actividad protectora de los inhibidores peptídicos de proteasas en un factor de crecimiento.

❖ Se aisló el primer inhibidor de metaloproteinasas de *Capsicum annuum* (YBPCI), y se demostró la estabilidad del inhibidor a altas temperaturas, elevadas concentraciones salinas y valores extremos de pH.

❖ Los resultados de estabilidad del YBPCI representan el primer estudio publicado sobre miniproteínas estables de tipo MCPI.

❖ Se encontró que YBPCI es el primer inhibidor de MCPs informado con estabilidad a la digestión gastrointestinal *in vitro*, sugiriendo que dichos inhibidores podrían alcanzar el colon en forma intacta y fomentar el estudio de posibles aplicaciones farmacéuticas como formulaciones antiparasitarias y/o antibacterianas naturales.

❖ Se demostró que YBPCI, imaPCI y PCI_t pertenecen al grupo de proteínas de alta estabilidad fisicoquímica, denominadas de tipo “*cisteín knot*”, debido a sus pequeños tamaños y alto grado de empaquetamiento, dados por la elevada densidad de puentes disulfuro en relación a la cantidad de aminoácidos presentes en dichas moléculas.

- ❖ Se aisló y purificó el primer inhibidor de papaína (fitocistatina) proveniente de *Moringa oleifera* L. (MoPI).
- ❖ MoPI representa el segundo inhibidor de papaína de plantas termoestable, característica inusual en los inhibidores de proteasas cisteínicas, no así para algunos inhibidores de proteasas serínicas y metaloproteasas.
- ❖ MoPI presentó actividad anticoagulante inhibiendo la vía intrínseca de la coagulación.
- ❖ MoPI mostró capacidad inhibitoria del crecimiento de las bacterias patógenas *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, el MoPI parcialmente purificado presentó capacidad inhibitoria del crecimiento de las siguientes bacterias patógenas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*.
- ❖ La actividad antimicrobiana hallada en MoPI y MoPI parcialmente purificado los posiciona como un potencial anti-infectivo natural, con capacidad para ser aplicado en biotecnología y biomedicina.

- ❖ Se logró la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en el sistema de levaduras *Pichia pastoris*, para su utilización como EGF control en los ensayos de protección de factores de crecimiento.
- ❖ Se generó una construcción de hEGF con el péptido señal OmpA3 unido a su extremo N-terminal, con el objeto de utilizarlo en ensayos futuros para su expresión en *E. coli* BL21.
- ❖ Se realizó un análisis de los sitios de corte por las proteasas mayoritarias en las úlceras de pie diabético, a partir del cual fue posible el diseño de EGFs mutantes resistentes a la proteólisis.

❖ Mediante técnicas de dinámica molecular se logró caracterizar los mutantes propuestos en función de su energía de interacción con el receptor y de la superficie de área de Born para la comparación estructural con el EGF salvaje, permitiendo establecer un orden de prioridad en los mutantes a clonar y expresar.

PERSPECTIVAS A FUTURO

El estudio realizado en esta Tesis doctoral inicia el camino para la búsqueda de nuevos inhibidores de proteasas que presenten las 3 características principales que se nombran a continuación:

- a) Naturales: obtenidos de fuentes naturales y no por síntesis química,
- b) Estables: estabilidad a diferentes condiciones extremas de pH, temperatura, fuerzas iónicas. Características presentes en muy pocas moléculas,
- c) Actividad biológica: actividad antimicrobiana, anticoagulante, etc.

La presencia de estas 3 características en un único inhibidor incentiva la búsqueda de otras moléculas que presenten dichas características, con el objeto de ampliar su estudio y caracterización para que a futuro puedan ser empleados en la industria de alimentos, biotecnologías agrícolas o aplicaciones farmacéuticas.

Los IPPs pertenecen al grupo de moléculas que cumplen con estas condiciones, lo cual ha generado particular interés para la ciencia y la tecnología, principalmente por el sinfín de ventajas que supone su empleo; sin la necesidad de requerimientos especiales de almacenamiento a temperaturas bajas o templadas, medios especiales de estabilización, conservación en soluciones tampón y/o requerimientos de ambientes no oxidativos, entre otras.

En base a los diferentes estudios realizados en esta tesis doctoral proponemos:

- a) El desarrollo de formulaciones orgánicas o la ingesta controlada de vegetales ricos en MCPs como una estrategia natural para el tratamiento de múltiples patologías;

angiogénesis, trombosis, cáncer, malaria, parásitos, ya que se ha demostrado que algunos IPPs llegan a la circulación sistémica a través de las células epiteliales intestinales o el mecanismo paracelular. No obstante, para determinar si el consumo dietético de alimentos ricos en MCPI es compatible con la actividad biológica de estas miniproteínas *in vivo* como lo encontramos *in vitro*, se requiere una evaluación experimental adicional y específica.

- b) Avanzar con el estudio de MoPI y con el descubrimiento de nuevas fitocistatinas, para su evaluación como potenciales candidatos para su uso como antimicrobianos naturales estables en la biomedicina y en la industria agrícola.
- c) Continuar con el clonado y expresión recombinante de los EGFs mutantes seleccionados en esta Tesis, con el fin de comprobar su actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, con el objeto de utilizarlo como alternativa terapéutica en reemplazo del EGF salvaje utilizado actualmente. Además, se propone continuar los ensayos de protección con el fin de evaluar el rol de los IPPs en la protección del EGF frente a otras proteasas.
- d) Ampliar los estudios de caracterización molecular y biológica de MoPI (inhibidor de papaína de *Moringa oleifera*), YBPCI (inhibidor de carboxipeptidasa A de morrón amarillo) e imaPCI (inhibidor de carboxipeptidasa A de Imilla morada), de notables estabilidades fisicoquímicas, para brindar a la comunidad científica moléculas efectivas y estables en una gran variedad de condiciones ambientales, para que puedan ser tenidas en cuenta en reemplazo de terapias y/o aplicaciones tecnológicas que por diferentes motivos van quedando obsoletas en el mundo.

REFERENCIAS

- Aagaard, A., Listwan, P., Cowieson, N., Huber, T., Ravasi, T., Wells, C. A., ... Martin, J. L. (2005). An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: Relationship to cystatins and the tumor suppressor TIG1. *Structure*, 13(2), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.12.013>
- Aaronson, S. A. (1991). Growth factors and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), 1146–1153.
- Abe, K., Kondo, H., & Arai, S. (1987). Purification and Characterization, 51(10), 2763–2768.
- Abraham, Z., Martinez, M., Carbonero, P., & Diaz, I. (2006). Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare*. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4245–4255. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl200>
- Acosta, J. B., Savigne, W., Valdez, C., Franco, N., Alba, J. S., del Rio, A., ... Fernandez-Montequin, J. (2006). Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *International Wound Journal*, 3(3), 232–239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00237.x>
- Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B., & Tyndall, J. D. A. (2018). Proteases and protease inhibitors in infectious diseases. *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1295–1331. <https://doi.org/10.1002/med.21475>
- Aguirre, C., Valdés-Rodríguez, S., Mendoza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A., & Blanco-Labra, A. (2004). A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 138(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.02.011>
- Ahn, J. E., Salzman, R. A., Braunagel, S. C., Koiwa, H., & Zhu-Salzman, K. (2004). Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 13(6), 649–657. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00523.x>
- Alexiadou, K., & Doupis, J. (2012). Management of Diabetic Foot Ulcers. <https://doi.org/10.1007/s13300-012-0004-9>
- Alonso-Del-Rivero, M., Trejo, S. A., Rodríguez De La Vega, M., González, Y., Bronsoms, S., Canals, F., ... Chávez, M. A. (2009). A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*- a step into the invertebrate world of proteases. *FEBS Journal*, 276(17), 4875–4890. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07187.x>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Aoki, H., Akaike, T., Abe, K., Kuroda, M., Arai, S., Okamura, R., ... Maeda, H. (1995). Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(4), 846–849.
- Arai, S., Matsumoto, I., Emori, Y., & Abe, K. (2002). Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 50(22), 6612–6617.
- Arai, S. and Abe, K. (2000) Cystatin-based control of insects, with special reference to oryzacystatin. *Recombinant Pro-tease Inhibitors in Plants* (ed.D. Michaud), pp. 27–42. Landes Bioscience, Georgetown
- Arai, S., Watanabe, H., Kondo, H., Emori, Y., & Abe, K. (1991). Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. *Journal of Biochemistry*, 109(2), 294–298.
- Arolas, J. L., Lorenzo, J., Rovira, A., Castellà, J., Aviles, F. X., & Sommerhoff, C. P. (2005). A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3441–3448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411086200>
- Arolas, J. L., Vendrell, J., Aviles, F. X., & Fricker, L. D. (2007). Metalloproteases: emerging drug targets in biomedicine. *Current Pharmaceutical Design*, 13(4), 349–366.
- Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A., ... Pena, J. M. (2005). Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 40(3), 280–287.
- Arteaga, C. L. (2002). Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist*, 7 Suppl 4, 31–39.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Ather, A. (2009). Identification , Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida* Arjumand Ather, (July).
- Atkinson, H. J., Grimwood, S., Johnston, K., & Green, J. (2004). Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. *Transgenic Research*, 13(2), 135–142.
- Atkinson, H. J., Urwin, P. E., & McPherson, M. J. (2003). Engineering plants for nematode resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 615–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095737>
- Aviles, F. X., Vendrell, J., Guasch, A., Coll, M., & Huber, R. (1993). Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *European Journal of Biochemistry*, 211(3), 381–389.
- Badiola, N., Alcalde, V., Pujol, A., Munter, L.-M., Multhaup, G., Lleo, A., ... Aloy, P. (2013). The proton-pump inhibitor lansoprazole enhances amyloid beta production. *PloS One*, 8(3), e58837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058837>
- Barbieri, L., Battelli, M. G., & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154(3–4), 237–282.
- Barrett, A. J. (1987). The cystatins : a new class of peptidase inhibitors, (May), 193–196.
- Barrett, A. J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Jarvinen, M., Katunuma, N., ... Turk, V. (1986, May). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *The Biochemical Journal*. England.
- Bártová, V., & Bárta, J. (2008). Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. *Research in Agricultural Engineering*, 54(4),

- 170–175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(12\)61766-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7292(12)61766-4)
- Baselga, J., & Mendelsohn, J. (1994). The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, *29*(1), 127–138.
- Bateman, K. S., & James, M. N. G. (2011). Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Current Protein & Peptide Science*, *12*(5), 340–347.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4), 493–496.
- Benchabane, M., & Kiggundu, A. (2010). Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control : a multitrophic perspective, (May 2014). <https://doi.org/10.1093/jxb/erq166>
- Benchabane, M., Schlüter, U., Vorster, J., Goulet, M. C., & Michaud, D. (2010). Plant cystatins. *Biochimie*, *92*(11), 1657–1666. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.006>
- Bendre, A. D., Ramasamy, S., & Suresh, C. G. (2018). Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *International Journal of Biological Macromolecules*, *113*, 933–943. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.148>
- Bennett, N. T., & Schultz, G. S. (1993). Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *American Journal of Surgery*, *165*(6), 728–737.
- Berdowska, I. (2004). Cysteine proteases as disease markers. *Clinica Chimica Acta*, *342*(1–2), 41–69. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.12.016>
- Berdowska, I., & Siewinski, M. (2000). [The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes]. *Postepy biochemii*, *46*(1), 73–84.
- Bergey, D. R., Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12053–12058.
- Berlanga-Acosta, J., Fernández-Montequín, J., Valdés-Pérez, C., Savigne-Gutiérrez, W., Mendoza-Marí, Y., García-Ojalvo, A., ... Guillén-Nieto, G. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Epidermal Growth Factor: Revisiting the Local Delivery Route for a Successful Outcome. *BioMed Research International*, *2017*(1). <https://doi.org/10.1155/2017/2923759>
- Berlanga, J., Fernandez, J. I., Lopez, E., Lopez, P. A., del Rio, A., Valenzuela, C., ... Herrera, L. (2013). Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. *MEDICC Review*, *15*(1), 11–15.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank, *28*(1), 235–242.
- Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *2*(10), 1551–1558. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021002>
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, *9*(7), 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Beyene, G., Foyer, C. H., & Kunert, K. J. (2006). Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, *57*(6), 1431–1443. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj123>
- Bijina, B., Chellappan, S., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bahkali, A. H., & Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. *Process Biochemistry*, *46*(12), 2291–2300.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.008>

- Binford, S. L., Maldonado, F., Brothers, M. A., Weady, P. T., Zalman, L. S., Meador, J. W. 3rd, ... Patick, A. K. (2005). Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 619–626. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.619-626.2005>
- Blanco-Aparicio, C., Molina, M. A., Fernández-Salas, E., Frazier, M. L., Mas, J. M., Querol, E., ... De Llorens, R. (1998). Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12370–12377. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12370>
- Botha, AM, Kunert, KJ, Cullis, CA. (2017). "Cysteine proteases and wheat (*Triticum aestivum* L) under drought: A still greatly unexplored association". *Plant Cell Environ.* 40(9):1679-1690
- Brito, M. S. De, Melo, M. B., Perdigão, J., & Alves, D. A. (2016). Partial purification of trypsin / papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L . seeds and antibacterial effect of protein fractions, 43(1), 11–18.
- Bronsoms, S., Villanueva, J., Canals, F., Querol, E., & Aviles, F. X. (2003). Analysis of the effect of potato carboxypeptidase inhibitor pro-sequence on the folding of the mature protein. *European Journal of Biochemistry*, 270(17), 3641–3650.
- Brunelle, F., Girard, C., Cloutier, C., & Michaud, D. (2005). A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60(1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/arch.20078>
- Brzin, J., & Kidrič, M. (1996). Proteinases and their inhibitors in plants: Role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 421–468. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647936>
- Burrow, J. W., Koch, J. A., Chuang, H.-H., Zhong, W., Dean, D. D., & Sylvia, V. L. (2007). Nitric oxide donors selectively reduce the expression of matrix metalloproteinases-8 and -9 by human diabetic skin fibroblasts. *The Journal of Surgical Research*, 140(1), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.11.010>
- Cai, X., Xie, X., Fu, N., & Wang, S. (2018). Physico-Chemical and Antifungal Properties of a Trypsin Inhibitor from the Roots of. <https://doi.org/10.3390/molecules23092388>
- Carrillo, L., Martinez, M., Alvarez-Alfageme, F., Castanera, P., Smagghe, G., Diaz, I., & Ortego, F. (2011). A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. *Transgenic Research*, 20(2), 305–319. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9417-2>
- Cater, S. A., Lees, W. E., Hill, J., Brzin, J., Kay, J., & Phylip, L. H. (2002). Aspartic proteinase inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinase A than cathepsin D. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1596(1), 76–82.
- Cavallini, C., Trettene, M., Degan, M., Delva, P., Molesini, B., Minuz, P., & Pandolfini, T. (2011). Anti-angiogenic effects of two cystine-knot miniproteins from tomato fruit. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1261–1273. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01154.x>
- Cawston, T. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Molecular Medicine Today*, 4(3), 130–137.
- Chang, R. J. Y. (2011). *Folding of Disulfied proteins*, Springer
- Chang, J. Y., Canals, F., Schindler, P., Querol, E., & Avilés, F. X. (1994). The disulfide folding pathway of potato carboxypeptidase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*,

269(35), 22087–22094.

- Chen, C., Yang, F., Zhang, Q., Wang, F., Hu, Y., & Xia, Z. (2015). *Natural Products for Antithrombosis, 2015*.
- Chen ZY, Brown RL, Russin JS, Lax AR, Cleveland TE (1999). —A corn trypsin inhibitor with antifungal act inhibits *Aspergillus flavus* alpha-amylasell. *Phytopathology*; 89: 902–7.
- Cheng, M.-L., Tzen, J. T. C., Shyu, D. J. H., & Chou, W.-M. (2014). Functional characterization of the N-terminal and C-terminal domains of a sesame group II phytocystatin. *Botanical Studies*, 55(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-18>
- Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.-C., Gracy, J., Chau, P. T. T., Ha, P. T., ... Le-Nguyen, D. (2004). Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current Protein & Peptide Science*, 5(5), 341–349.
- Chiche, L., Postic, G., Charlotte, P., & Gelly, J. (2018). KNOTTIN : the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years , toward a systematic structure modeling, 46(November 2017), 454–458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1084>
- Christova, P. K., Christov, N. K., & Imai, R. (2006). A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, 223(6), 1207–1218. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0169-9>
- Christova, P. K., Christov, N. K., Mladenov, P. V., & Imai, R. (2018). The wheat multidomain cystatin TaMDC1 displays antifungal, antibacterial, and insecticidal activities in planta. *Plant Cell Reports*, 37(6), 923–932. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2279-4>
- Cichewicz, R. H., & Thorpe, P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(2), 61–70. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01384-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01384-0)
- Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Nilges, M., & Ryan, C. A. (1987). Three-dimensional structure of potato carboxypeptidase inhibitor in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics. *Biochemistry*, 26(24), 8012–8023. <https://doi.org/10.1021/bi00398a069>
- Cocchiario, P., Fox, C., Tregidgo, N. W., Howarth, R., Wood, K. M., Situmorang, G. R., ... Moles, A. (2016). Lysosomal protease cathepsin D ; a new driver of apoptosis during acute kidney injury. *Nature Publishing Group*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep27112>
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*, 383(6603), 826–829. <https://doi.org/10.1038/383826a0>
- Connors, B. J., Laun, N. P., Maynard, C. A., & Powell, W. A. (2002). Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). *Planta*, 215(3), 510–514. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0782-9>
- Copeland, R. A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods of Biochemical Analysis*, 46, 1–265.
- Corre-menguy, F., Cejudo, F. J., Mazubert, C., & Vidal, J. (2002). Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development, 687–698.
- Costa, A. G., Cusano, N. E., Silva, B. C., Cremers, S., & Bilezikian, J. P. (2011). Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nature Publishing Group*, 7(8), 447–456. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.77>
- Costa, H. P. S., Oliveira, J. T. A., Sousa, D. O. B., Morais, J. K. S., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., ... Vasconcelos, I. M. (2014). JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in*

- Microbiology*, 5(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00005>
- Cotabarren, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García-Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D., & Parisi, M. G. (2019). Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. *Food Chemistry*, 274(September 2018), 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.061>
- Cotabarren, J., Tellechea, M. E., Avilés, F. X., Lorenzo Rivera, J., & Obregón, W. D. (2018). Biochemical characterization of the YBPCI miniprotein, the first carboxypeptidase inhibitor isolated from Yellow Bell Pepper (*Capsicum annuum* L). A novel contribution to the knowledge of miniproteins stability. *Protein Expression and Purification*, 144(December 2017), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.003>
- Cotabarren, J., Tellechea, M. E., Tanco, S. M., Lorenzo, J., Garcia-Pardo, J., Avilés, F. X., & Obregón, W. D. (2018). Biochemical and MALDI-TOF mass spectrometric characterization of a novel native and recombinant cystine knot miniprotein from *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* cv. Churqueña. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030678>
- Covaleda, G., Del Rivero, M. A., Ch??vez, M. A., Avil??s, F. X., & Reverter, D. (2012). Crystal structure of novel metallo-carboxypeptidase inhibitor from marine mollusk *Nerita versicolor* in complex with human carboxypeptidase A4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9250–9258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330100>
- Craik, C. S., Page, M. J., & Madison, E. L. (2011). Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*, 435(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BJ20100965>
- da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2011). EGFR mutations and lung cancer. *Annual Review of Pathology*, 6, 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130206>
- Dabbagh, K., Laurent, G. J., Shock, A., Leoni, P., Papakrivopoulou, J., & Chambers, R. C. (2001). Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 186(1), 73–81. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200101\)186:1<73::AID-JCP1002>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200101)186:1<73::AID-JCP1002>3.0.CO;2-Q)
- Dabhade, A. R., Mokashe, N. U., & Patil, U. K. (2016). Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.015>
- Dantzger, M., Vasconcelos, I. M., Scorsato, V., Aparicio, R., Marangoni, S., & Macedo, M. L. R. (2015). Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: Isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry*, 118, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.013>
- Darby, N. J., & Creighton, T. E. (1995). Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 34(51), 16770–16780.
- Dash, C., Kulkarni, A., Dunn, B., & Rao, M. (2003). Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2), 89–119. <https://doi.org/10.1080/713609213>
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002). "PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes". *Nucleic Acids Res.*, 30(1): 347-8
- Deal, C. (2009). Potential new drug targets for osteoporosis. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 5(1), 20–27. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0977>

- Di Nisio, M., ten Wolde, M., Meijers, J. C., & Buller, H. R. (2005, September). Effects of high plasma lipoprotein (a) levels on tissue factor pathway inhibitor and the protein C pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. England. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01517.x>
- Diaz-mendoza, M., Velasco-arroyo, B., Santamaria, M. E., González-melendi, P., Martinez, M., & Diaz, I. (2016). Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny, 338, 329–338.
- Dill, K. A. (1990). The meaning of hydrophobicity. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4978), 297–298.
- Dill, K. A., & MacCallum, J. L. (2012). The protein-folding problem, 50 years on. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6110), 1042–1046. <https://doi.org/10.1126/science.1219021>
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Da Cunha, M., Alves, E. W., ... Gomes, V. M. (2006). Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), 1323–1332. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.04.010>
- Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1406), 133–145. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0758>
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>
- Doxey, D. L., Ng, M. C., Dill, R. E., & Iacopino, A. M. (1995). Platelet-derived growth factor levels in wounds of diabetic rats. *Life Sciences*, 57(11), 1111–1123.
- Drake, M. T., Clarke, B. L., Oursler, M. J., & Khosla, S. (2017). Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocrine Reviews*, 38(4), 325–350. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1114>
- Driver, V. R., Hanft, J., Fylling, C. P., & Beriou, J. M. (2006). A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy/Wound Management*, 52(6), 68–70, 72, 74 passim.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-el-Saad, M., Xu, D., & Wu, R. (1996). Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology*, 14(4), 494–498. <https://doi.org/10.1038/nbt0496-494>
- Dubin, G. (2002). Extracellular proteases of Staphylococcus spp. *Biological Chemistry*, 383(7–8), 1075–1086. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.116>
- Dubin, G. (2005). Cellular and Molecular Life Sciences Proteinaceous cysteine protease inhibitors, 62, 653–669. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4445-9>
- Dufour, A., & Overall, C. M. (2013). Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.02.004>
- Edman, M. C., Janga, S. R., Meng, Z., Bechtold, M., Chen, A. F., Kim, C., ... Hamm-alvarez, S. F. (2018). Increased Cathepsin S activity associated with decreased protease inhibitory capacity contributes to altered tear proteins in Sjögren's Syndrome patients. *Scientific Reports*, (July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29411-9>
- Epple, P., Apel, K., & Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against Fusarium oxysporum. *The Plant Cell*, 9(4), 509–520. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.509>
- Fakruddin, M., Mohammad Mazumdar, R., Bin Mannan, K. S., Chowdhury, A., & Hossain, M.

- N. (2013). Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. *ISRN Biotechnology*, 2013, 590587. <https://doi.org/10.5402/2013/590587>
- Fan, S.-G., & Wu, G.-J. (2005). Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.*
- Fear, G., Komarnytsky, S., & Raskin, I. (2007). Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 354–368. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.09.001>
- Fernandes, K. V, Sabelli, P. A., Barratt, D. H., Richardson, M., Xavier-Filho, J., & Shewry, P. R. (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 23(1), 215–219.
- Fernandez-Montequin, J. I., Valenzuela-Silva, C. M., Diaz, O. G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernandez, F., ... Lopez-Saura, P. A. (2009). Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *International Wound Journal*, 6(6), 432–443. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00641.x>
- Filler, G., Bokenkamp, A., Hofmann, W., Le Bricon, T., Martinez-Bru, C., & Grubb, A. (2005). Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research. *Clinical Biochemistry*, 38(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.025>
- Fischer, M., Kuckenber, M., Kastilan, R., Muth, J., & Gebhardt, C. (2014). Novel in vitro inhibitory functions of potato tuber proteinaceous inhibitors. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(1), 387–398. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0906-5>
- Frohman, M. A., Dush, M. K., & Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), 8998–9002.
- Fujioka, H., Dairyo, Y., Yasunaga, K., & Emoto, K. (2012). Neural Functions of Matrix Metalloproteinases: Plasticity, Neurogenesis, and Disease, 2012(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2012/789083>
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47(6), 479–491. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K)
- Garcia-olmedo, F., Molina, A., Segura, A., & Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific proteins in plants, 3(2), 72–74.
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y., & Inouye, M. (1984). Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 3(10), 2437–2442.
- Gong, H., Zhou, J., Liao, M., Hatta, T., Harnnoi, T., Umemiya, R., ... Fujisaki, K. (2007). Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, 53(10), 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.008>
- Gonzalez, C., Neira, J. L., Ventura, S., Bronsoms, S., Rico, M., Aviles, F. X. (2003). "Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by 1H and 15N NMR." *Proteins* 50(3): 410-422
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1". *Nature*, 389(6646): 77-81.

- Goodwin SB (1997). —The populations' genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87:462-473
- Gracy, J., Le-Nguyen, D., Gelly, J. C., Kaas, Q., Heitz, A., & Chiche, L. (2008). KNOTTIN: The knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1), 314–319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm939>
- Graham, J. S., & Ryan, C. A. (1981). Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(4), 1164–1170.
- Green, TR & Ryan, CA. (1972). "Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects". *Science*, 175(4023):776-7
- Green, G. D. J., Kembhavi, A. A., Davies, M. E., & Barrett, A. J. (1984). Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver, 218, 939–946.
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J., & Asselin, A. (1999). Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 19(4), 473–480.
- Grinnell, F., & Zhu, M. (1996). Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 106(2), 335–341.
- Groenen, L. C., Nice, E. C., & Burgess, A. W. (1994). Structure-function relationships for the EGF/TGF-alpha family of mitogens. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 11(4), 235–257.
- Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases, 51(3), 609–624.
- Gruis, D. F., Schulze, J., & Jung, R. (2004). Storage Protein Accumulation in the Absence of the Vacuolar Processing Enzyme Family of Cysteine Proteases, 16(January), 270–290. <https://doi.org/10.1105/tpc.016378.low>
- Guay, C., Laviolette, M., & Tremblay, G. M. (2006). Targeting Serine Proteases in Asthma, 2, 393–402.
- Guerrero-Olazarán M, Cab-Barrera E, Galán-Wong LJ, Viajen-Salvadó JM (2004). —Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuaculturall. VII Simposium Internacional de Nutricion Acuícola.
- Gutierrez-campos, R., Torres-acosta, J. A., Saucedo-arias, L. J., & Gomez-lim, M. A. (2000). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants, (January). <https://doi.org/10.1038/70781>
- Habib H, Fazili KM, Zargar MA, Ganie BA (2016). —Protease Inhibitor Associated Antimicrobial Activity of Pea *Pisum sativum* L. *Arkel. Int. J. Pure App. Biosci.*, 4: 172- 79
- Habib, H., & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants, 2(August), 68–85.
- Hanft, J. R., Pollak, R. A., Barbul, A., van Gils, C., Kwon, P. S., Gray, S. M., ... Breen, T. J. (2008). Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *Journal of Wound Care*, 17(1), 30-32,34-37. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.1.27917>
- Haq, S. K., Atif, S. M., & Khan, R. H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection, 431, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.022>
- Haq, S. K., & Khan, R. H. (2003). Characterization of a Proteinase Inhibitor from *Cajanus cajan* (L .), 22(6).

- Haq, S. K., Rabbani, G., Ahmad, E., & Atif, S. M. (2010). Protease Inhibitors : A Panacea ?, *24*(4).
- Harsulkar, A. M., Giri, A. P., Patankar, A. G., Gupta, V. S., Sainani, M. N., Ranjekar, P. K., & Deshpande, V. V. (1999). Successive Use of Non-Host Plant Proteinase Inhibitors Required for Effective Inhibition of *Helicoverpa armigera* Gut Proteinases and Larval Growth 1. *Society*, *121*(October), 497–506. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.497>
- Hass, G. M., & Derr, J. E. (1979). Purification and characterization of the carboxypeptidase iso-inhibitors from potatoes. *Plant Physiology*, *64*(6), 1022–1028.
- Hass, G. M., & Hermodson, M. A. (1981). Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry*, *20*(8), 2256–2260. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7236596>
- Hass, G. M., Nau, H., Biemann, K., Grahn, D. T., Ericsson, L. H., & Neurath, H. (1975). The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry*, *14*(6), 1334–1342.
- Heitz, A., Avrutina, O., Le-Nguyen, D., Diederichsen, U., Hernandez, J.-F., Gracy, J., ... Chiche, L. (2008). Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. *BMC Structural Biology*, *8*, 54. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-54>
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, *165*(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.11.001>
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, *17*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.012>
- Heutinck, K. M., ten Berge, I. J. M., Hack, C. E., Hamann, J., & Rowshani, A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, *47*(11–12), 1943–1955. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.020>
- Honey, K., & Rudensky, A. Y. (2003). REGULATE ANTIGEN PRESENTATION, *3*(June), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nri1110>
- Hooper, N. M. (ed) (1996) *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*, Taylor and Francis Ltd., London
- Huntington, J. A., & Baglin, T. P. (2003). Targeting thrombin--rational drug design from natural mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*(11), 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.002>
- Hwang, J. E., Hong, J. K., Je, J. H., Lee, K. O., Kim, D. Y., Lee, S. Y., & Lim, C. O. (2009). Regulation of seed germination and seedling growth by an Arabidopsis phytocystatin isoform, AtCYS6. *Plant Cell Reports*, *28*(11), 1623–1632. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0762-7>
- Imada, C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *87*(1), 59–63. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6544-x>
- Indarte, M., Lazza, C. M., Assis, D., Caffini, N. O., Juliano, M. A., Avilés, F. X., ... Trejo, S. A. (2017). A Bowman-Birk protease inhibitor purified, cloned, sequenced and characterized from the seeds of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta*, *245*(2), 343–353. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2611-6>
- Ishimoto, M., Kuroda, M., Yoza, K., Nishizawa, K., Teraishi, M., Mizutani, N., ... Moriya, S. (2014). Heterologous Expression of Corn Cystatin in Soybean and Effect on Growth of the Stink Bug, *8451*(May). <https://doi.org/10.1271/bbb.120432>

- Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M., ... Arigoni, F. (2006). A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17246–17252. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601678200>
- Iwanaga, S., Yamasaki, N., Kimura, M., & Kouzuma, Y. (2005). Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of kunitz-type protease inhibitors from plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(1), 220–223. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.220>
- Jackson, P. J., McNulty, J. C., Yang, Y.-K., Thompson, D. A., Chai, B., Gantz, I., ... Millhauser, G. L. (2002). Design, pharmacology, and NMR structure of a minimized cystine knot with agouti-related protein activity. *Biochemistry*, 41(24), 7565–7572.
- Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma*, 52(3), 185–192.
- Jenko, S., Dolenc, I., Guncar, G., Dobersek, A., Podobnik, M., & Turk, D. (2003). Crystal structure of Stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *Journal of Molecular Biology*, 326(3), 875–885.
- Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *MESC*, 120, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.005>
- Johnson, C. M., Oliveberg, M., Clarke, J., & Fersht, A. R. (1997). Thermodynamics of denaturation of mutants of barnase with disulfide crosslinks. *Journal of Molecular Biology*, 268(1), 198–208. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0928>
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G., & Ryan, C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9871–9875. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9871>
- Johnson, S. L., & Pellecchia, M. (2006). Structure- and fragment-based approaches to protease inhibition. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(4), 317–329.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-A., & Stahl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(Pt 2), 91–105.
- Jongsma, M. a., & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43(10), 885–895. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(97\)00040-1](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(97)00040-1)
- Jongsma, M. A., Stiekema, W. J., & Bosch, D. (1996). Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends in Biotechnology*, 14(9), 331–333. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)30019-X](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)30019-X)
- Kaur, A. P., & Sohal, S. K. (2016). Pea protease inhibitor inhibits protease activity and development of *Bactrocera cucurbitae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(4), 1183–1189. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.10.012>
- Kaur, G., & Levy, E. (2012). Cystatin C in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5, 79. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00079>
- Kennedy, A. R. (1993). Cancer prevention by protease inhibitors. *Preventive Medicine*, 22(5), 796–811. <https://doi.org/10.1006/pmed.1993.1073>
- Kennedy, A. R., Szuhaj, B. F., Newberne, P. M., & Billings, P. C. (1993). Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate.

- Nutrition and Cancer*, 19(3), 281–302. <https://doi.org/10.1080/01635589309514259>
- Kennedy, K. D., Anithachristy, S. A., Buie, L. K., & Borra, T. (2012). Cystatin A , a Potential Common Link for Mutant Myocilin Causative Glaucoma, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036301>
- Kervinen, J., Tobin, G. J., Costa, J., Waugh, D. S., Wlodawer, A., & Zdanov, A. (1999). Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *The EMBO Journal*, 18(14), 3947–3955. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3947>
- Kiggundu, A., Goulet, M.-C., Goulet, C., Dubuc, J.-F., Rivard, D., Benchabane, M., ... Michaud, D. (2006). Modulating the proteinase inhibitory profile of a plant cystatin by single mutations at positively selected amino acid sites. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 48(3), 403–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02878.x>
- Kiggundu, A., & Vorster, J. (2010). Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control : a multitrophic perspective, 61(15), 4169–4183. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq166>
- Kikuchi, T., Abe, T., Yaekashiwa, M., Tominaga, Y., Mitsushashi, H., Satoh, K., ... Nukiwa, T. (2000). Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 23(3), 364–370. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.23.3.3942>
- Kim, A., Jang, M. H., Lee, S. J., & Bae, Y. K. (2017). Breast Cancer Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer, 20(2), 150–159.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S., & Park, Y. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2860–2872. <https://doi.org/10.3390/ijms10062860>
- Kim, J. Y., Park, S. C., Kim, M. H., Lim, H. T., Park, Y., & Hahm, K. S. (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.057>
- Kim, M. H., Park, S. C., Kim, J. Y., Lee, S. Y., Lim, H. T., Cheong, H., ... Park, Y. (2006). Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety “Golden Valley.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3), 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.186>
- Kimura, M., Ikeda, T., Fukumoto, D., Yamasaki, N., & Yonekura, M. (1995). Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(12), 2328–2329.
- Kimura, R. H., Levin, A. M., Cochran, F. V., & Cochran, J. R. (2009). Engineered cystine knot peptides that bind alpha5beta3, alpha5beta5, and alpha5beta1 integrins with low-nanomolar affinity. *Proteins*, 77(2), 359–369. <https://doi.org/10.1002/prot.22441>
- Kiyosaki, T., Asakura, T., Matsumoto, I., Tamura, T., Terauchi, K., Funaki, J., ... Abe, K. (2009). Wheat cysteine proteases triticain alpha, beta and gamma exhibit mutually distinct responses to gibberellin in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology*, 166(1), 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.02.006>
- Kobayashi, H., Suzuki, M., Kanayama, N., & Terao, T. (2004). A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clinical & Experimental Metastasis*, 21(2), 159–166.
- Kolmar, H. (2009). Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered

- cystine knot miniproteins. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.004>
- Kordis, D., & Turk, V. (2009). Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 266. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-266>
- Krishnan, K., Arnone, B., & Buchman, A. (2011). Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(1), 410–422. <https://doi.org/10.1002/ibd.21316>
- Krizaj, I., Drobnic-Kosorok, M., Brzin, J., Jerala, R., & Turk, V. (1993). The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Letters*, 333(1–2), 15–20.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., & Otlewski, J. (2003). Cellular and Molecular Life Sciences Review Canonical protein inhibitors of serine proteases, 60, 2427–2444. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3120-x>
- Kruger, J., Thomas, C. M., Golstein, C., Dixon, M. S., Smoker, M., Tang, S., ... Jones, J. D. G. (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5568), 744–747. <https://doi.org/10.1126/science.1069288>
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., ... Llinas-Brunet, M. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, 426(6963), 186–189. <https://doi.org/10.1038/nature02099>
- Laskowski M Jr, K. I. (1980). "Protein inhibitors of proteinases." *Annu Rev Biochem* 49: 593-626.
- Lee, CE, Ellen, KK, Ellman JA. (1998). "General Solid-Phase Synthesis Approach To Prepare Mechanism-Based Aspartyl Protease Inhibitor Libraries. Identification of Potent Cathepsin D Inhibitors". *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (38), pp 9735–9747
- Lemos Rocha, G., Hernandez Fernandez, J., Amancio Oliveira, AE., Sales Fernandes, KV. (2017). "Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants". *Enzyme Inhibitors and Activators*, Murat Senturk, IntechOpen
- Levitzki, A. (1996). Targeting signal transduction for disease therapy. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(2), 239–244.
- Lim, C. O., Lee, S. I., Chung, W. S., Park, S. H., Hwang, I., & Cho, M. J. (1996). Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Molecular Biology*, 30(2), 373–379.
- Lim, W. A., Richards, F. M., & Fox, R. O. (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*, 372(6504), 375–379. <https://doi.org/10.1038/372375a0>
- Lima, A. M., dos Reis, S. P., & de Souza, C. R. B. (2015). Phytocystatins and their potential to control plant diseases caused by fungi. *Protein and Peptide Letters*, 22(2), 104–111.
- Linden, W. A. Van Der, Schulze, C. J., Herbert, A. S., Krause, T. B., Wirchnianski, A. A., Dye, J. M., ... Bogyo, M. (2015). Cysteine Cathepsin Inhibitors as Anti-Ebola Agents. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00130>
- Lisón, P., Rodrigo, I., Conejero, V. (2006). "A Novel Function for the Cathepsin D Inhibitor in Tomato". *Plant Physiol.* 142(3): 1329–1339
- Losso, J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(1), 94–118. <https://doi.org/10.1080/10408390601177589>

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). The folin by oliver. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–230. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Lufrano, D., Cotabarren, J., Garcia-Pardo, J., Fernandez-Alvarez, R., Tort, O., Tanco, S., ... Obregón, W. D. (2015). Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes. *Phytochemistry*, 120, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.09.010>
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6109), 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Luo, X., Xie, C., Wang, D., Wei, Y., & Cai, J. (2016). Psc-AFP from *Psoralea corylifolia* L. overexpressed in *Pichia pastoris* increases antimicrobial activity and enhances disease resistance of transgenic tobacco. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7768-1>
- Lyons, P. J., & Fricker, L. D. (2010). Substrate Specificity of Human Carboxypeptidase A6 * □, 285(49), 38234–38242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158626>
- Maass, N., Teffner, M., Rosel, F., Pawaresch, R., Jonat, W., Nagasaki, K., & Rudolph, P. (2001). Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *The Journal of Pathology*, 195(3), 321–326. <https://doi.org/10.1002/path.948>
- Macedo, M. L. R., de Oliveira, C. F. R., Costa, P. M., Castelhana, E. C., & Silva-Filho, M. C. (2015). Adaptive mechanisms of insect pests against plant protease inhibitors and future prospects related to crop protection: a review. *Protein and Peptide Letters*, 22(2), 149–163.
- MacEdo, M. L. R., Diz Filho, E. B. S., Freire, M. G. M., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Toyama, M. H., & Marangoni, S. (2011). A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. *Protein Journal*, 30(1), 9–19. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9296-7>
- Macedo, M. L. R., Ribeiro, S. F. F., Taveira, G. B., Gomes, V. M., de Barros, K. M. C. A., & Maria-Neto, S. (2016). Antimicrobial Activity of ILTI, a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Inga laurina* (SW.) Willd. *Current Microbiology*, 72(5), 538–544. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0970-z>
- Machado, R. J. A., Monteiro, N. K. V., Migliolo, L., Silva, O. N., Franco, L., Kiyota, S., ... Santos, E. A. (2013). Characterization and Pharmacological Properties of a Novel Multifunctional Kunitz Inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063571>
- Magister, S., & Kos, J. (2013). Cystatins in immune system. *Journal of Cancer*, 4(1), 45–56. <https://doi.org/10.7150/jca.5044>
- Malcolm, B. A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., ... Njoroge, F. G. (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(3), 1013–1020. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.1013-1020.2006>
- Malgorzata, R., Dorota, C., & Justyna, S.-N. (2004). Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(4), 861–873.
- Mallamace, F., Corsaro, C., Mallamace, D., Vasi, S., Vasi, C., Baglioni, P., ... Stanley, H. E.

- (2016). Energy landscape in protein folding and unfolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3159–3163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524864113>
- Maraschin, R., Bussi, R., Conz, A., Orlando, L., Pirovano, R., & Nyska, A. (1995). Toxicological evaluation of u-hEGF. *Toxicologic Pathology*, 23(3), 356–366. <https://doi.org/10.1177/019262339502300312>
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V., & Baudyg, M. (1989). Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family, 25(1), 94–98.
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V., & Baudys, M. (1989). Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Letters*, 251(1–2), 94–98.
- Marino-Buslje, C., Venhudova, G., Molina, M. A., Oliva, B., Jorba, X., Canals, F., ... Querol, E. (2000). Contribution of C-tail residues of potato carboxypeptidase inhibitor to the binding to carboxypeptidase A A mutagenesis analysis. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1502–1509.
- Marston, W. A., Hanft, J., Norwood, P., & Pollak, R. (2003). The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care*, 26(6), 1701–1705.
- Martineau, B., McBride, K. E., & Houck, C. M. (1991). Regulation of metallocarboxypeptidase inhibitor gene expression in tomato. *Molecular & General Genetics: MGG*, 228(1–2), 281–286.
- Martinez, M., Abraham, Z., Gambardella, M., Echaide, M., Carbonero, P., & Diaz, I. (2005). The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1821–1829. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri172>
- Martinez, M., Cambra, I., Carrillo, L., Diaz-Mendoza, M., & Diaz, I. (2009). Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiology*, 151(3), 1531–1545. <https://doi.org/10.1104/pp.109.146019>
- Martins, T. F., Vasconcelos, I. M., Silva, R. G. G., Silva, F. D. A., Souza, P. F. N., Varela, A. L. N., ... Oliveira, J. T. A. (2018). A Bowman-Birk Inhibitor from the Seeds of *Luetzelburgia auriculata* Inhibits *Staphylococcus aureus* Growth by Promoting Severe Cell Membrane Damage. *Journal of Natural Products*, 81(7), 1497–1507. review-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00545>
- Marx, P. F. (2004). Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Current Medicinal Chemistry*, 11(17), 2335–2348.
- Massonneau, A., Condamine, P., Wisniewski, J.-P., Zivy, M., & Rogowsky, P. M. (2005). Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1729(3), 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.05.004>
- Massote, P. D., Pinheiro, A. C. N., Fonseca, C. G., Prado, M. A. M., Guimaraes, A. L. S., Massensini, A. R., & Gomez, M. V. (2008). Protective effect of retinal ischemia by blockers of voltage-dependent calcium channels and intracellular calcium stores. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(6), 847–856. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9243-0>
- Mast, B. A., & Schultz, G. S. (1996). Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 4(4), 411–420. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x>

- McCarty, S. M., & Percival, S. L. (2013). Proteases and Delayed Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 2(8), 438–447. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>
- Mehdad, A., Brumana, G., Souza, A. A., Barbosa, J., Ventura, M. M., & Freitas, S. M. De. (2016). A Bowman – Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Nature Publishing Group*, (November 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.67>
- Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C., & Macedo, M. L. R. (2002). Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds, 20(8).
- Memmert, S., Damanaki, A., Nogueira, A. V. B., Eick, S., Nokhbehshaim, M., Papadopoulou, A. K., ... Deschner, J. (2017). Role of Cathepsin S in Periodontal Inflammation and Infection, 2017.
- Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Muñoz, F. F., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 152(7), 2039–2047. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28816-0>
- Meulenbroek, E. M., Thomassen, E. A. J., Pouvreau, L., Abrahams, J. P., Gruppen, H., & Pannu, N. S. (2012). Structure of a post-translationally processed heterodimeric double-headed Kunitz-type serine protease inhibitor from potato. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(7), 794–799. <https://doi.org/10.1107/S0907444491201222X>
- Meyskens, F. L. J., & Szabo, E. (2005). Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(6), 1366–1369. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0666>
- MICKEL, C. E. and STANDISH, J. (1947) Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum* (Herbst). Univ. Minn. agric. Exp. Stn. tech. Bull. 178, 1-20.
- Miguel, M., Manso, M., Aleixandre, A., Alonso, M. J., Salaices, M., & Lopez-Fandino, R. (2007). Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10615–10621. <https://doi.org/10.1021/jf072307o>
- Milan, D. (1987). Tomo I. Descripción de plantas cultivadas. . Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. , Tomo I. Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires, 467-536. 1987
- Minnema, M. C., Friederich, P. W., Levi, M., von dem Borne, P. A., Mosnier, L. O., Meijers, J. C., ... ten Cate, H. (1998). Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI. In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 10–14. <https://doi.org/10.1172/JCI781>
- Mishra, V., Bilgrami, S., Sharma, R. S., Kaur, P., Yadav, S., Krauspenhaar, R., ... Singh, T. P. (2005). Crystal structure of himalayan mistletoe ribosome-inactivating protein reveals the presence of a natural inhibitor and a new functionally active sugar-binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20712–20721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500735200>

- Mock, W. L., Liu, Y., & Stanford, D. J. (1996). Arazoformyl Peptide Surrogates as Spectrophotometric Kinetic Assay Substrates for Carboxypeptidase A. *Analytical Biochemistry*, 239(2), 218–222. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0318>
- Mohanraj, S. S., Tetali, S. D., Mallikarjuna, N., Dutta-Gupta, A., & Padmasree, K. (2018). Biochemical properties of a bacterially-expressed Bowman-Birk inhibitor from *Rhynchosia sublobata* (Schumach.) Meikle seeds and its activity against gut proteases of *Achaea janata*. *Phytochemistry*, 151, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.009>
- Mokhtar, N. M., el-Aaser, A. A., el-Bolkainy, M. N., Ibrahim, H. A., Badr El-Din, N. K., & Moharram, N. Z. (1988). Effect of soybean feeding on experimental carcinogenesis--III. Carcinogenicity of nitrite and dibutylamine in mice: a histopathological study. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, 24(3), 403–411.
- Montaner, J., Ribo, M., Monasterio, J., Molina, C. A., & Alvarez-Sabin, J. (2003). Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke*, 34(4), 1038–1040. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000063139.06585.45>
- Monteiro Júnior, J. E., Valadares, N. F., Pereira, H. D. M., Dyszy, F. H., da Costa Filho, A. J., Uchôa, A. F., ... Grangeiro, T. B. (2017). Expression in *Escherichia coli* of cysteine protease inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*): The crystal structure of a single-domain cystatin gives insights on its thermal and pH stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.008>
- Mosnier, L. O., von dem Borne, P. A., Meijers, J. C., & Bouma, B. N. (1998). Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 80(5), 829–835.
- Mosolov, V. V., Grigor'eva, L. I., & Valueva, T. A. (2001). [The role of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review)]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 37(2), 131–140.
- Munger, A., Coenen, K., Cantin, L., Goulet, C., Vaillancourt, L., Goulet, M., ... Michaud, D. (2012). Beneficial 'unintended effects' of a cereal cystatin in transgenic lines of potato, *Solanum tuberosum*.
- Murphy, G., & Gavrilovic, J. (1999). Proteolysis and cell migration: creating a path? *Current Opinion in Cell Biology*, 11(5), 614–621.
- Murphy, G., & Lee, M. H. (2005). What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage?, 44–47. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.042465>
- Muto, Y., Suzuki, K., Sato, E., & Ishii, H. (2003). Carboxypeptidase B inhibitors reduce tissue factor-induced renal microthrombi in rats. *European Journal of Pharmacology*, 461(2–3), 181–189.
- Nagashima, M., Yin, Z.-F., Zhao, L., White, K., Zhu, Y., Lasky, N., ... Morser, J. (2002). Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) deficiency is compatible with murine life. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(1), 101–110. <https://doi.org/10.1172/JCI12119>
- Nagata, K., Kudo, N., Abe, K., Arai, S., & Tanokura, M. (2000). Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Biochemistry*, 39(48), 14753–14760.
- Ndao, M., Nath-Chowdhury, M., Sajid, M., Marcus, V., Mashiyama, S. T., Sakanari, J., ... Caffrey, C. R. (2013). A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6063–6073. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-13>

- Neurath, H., & Walsh, K. A. (1976). Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A Review) *, 73(11), 3825–3832.
- Normanno, N., Luca, A. De, Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., ... Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, 366, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>
- Normant, E., Martres, M. P., Schwartz, J. C., & Gros, C. (1995). Purification, cDNA cloning, functional expression, and characterization of a 26-kDa endogenous mammalian carboxypeptidase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12225–12229. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12225>
- Nosoh, Y., & Sekiguchi, T. (1990). Protein engineering for thermostability. *Trends in Biotechnology*, 8(1), 16–20.
- Nwomeh, B. C., Liang, H. X., Cohen, I. K., & Yager, D. R. (1999). MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *The Journal of Surgical Research*, 81(2), 189–195. <https://doi.org/10.1006/jsre.1998.5495>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426.
- Obregón, W. D., Ghiano, N., Tellechea, M., Cisneros, J. S., Lazza, C. M., López, L. M. I., & Avilés, F. X. (2012). Detection and characterisation of a new metallo-carboxypeptidase inhibitor from *Solanum tuberosum* cv. Desirée using proteomic techniques. *Food Chemistry*, 133(4), 1163–1168. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.030>
- Obregón, W. D., Liggieri, C. S., Morcelle, S. R., Trejo, S. a, Avilés, F. X., & Priolo, N. S. (2009). Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases. *Protein and Peptide Letters*, 16, 1323–1333. <https://doi.org/10.2174/092986609789353736>
- Ojima, A., Shiota, H., Higashi, K., Kamada, H., Shimma, Y., Wada, M., & Satoh, S. (1997). An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot, 99–109.
- Oliva, M. L. V., Ferreira, R. da S., Ferreira, J. G., de Paula, C. A. A., Salas, C. E., & Sampaio, M. U. (2011). Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review. *Current Protein & Peptide Science*, 12(5), 348–357.
- Oliveira, M. D. L., Andrade, C. A. S., Santos-Magalhaes, N. S., Coelho, L. C. B. B., Teixeira, J. A., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Correia, M. T. S. (2008). Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 371–376. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02319.x>
- Otlewski, J., & Jelen, F. (2005). New EMBO Member ' s Review The many faces of protease – protein inhibitor interaction, 24(7), 1303–1310. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600611>
- Ottaviani, J. I., Actis-goretta, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2006). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition, 88, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.10.001>
- Outchkourov, N. S., de Kogel, W. J., Wieggers, G. L., Abrahamson, M., & Jongsma, M. A. (2004). Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. *Plant Biotechnology Journal*, 2(5), 449–458. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00089.x>

- Pagano, M. R., Mendieta, J. R., Muñoz, F. F., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2007). Roles of glycosylation on the antifungal activity and apoplast accumulation of StAPs (*Solanum tuberosum* aspartic proteases). *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(5), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.07.009>
- Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., & Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 3(10), 1833–1839. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031022>
- Pallares, I., Bonet, R., Garcia-Castellanos, R., Ventura, S., Aviles, F. X., Vendrell, J., & Gomis-Ruth, F. X. (2005). Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(11), 3978–3983. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500678102>
- Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720–2722.
- Pandhare, J., Zog, K., & Deshpande, V. V. (2002). Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: Effect of various additives on thermostability. *Bioresource Technology*, 84(2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00025-1)
- Parisi, N., Moreno, S., & Luja, U. N. De. (2002). CHARACTERIZATION OF A NOVEL CYSTEINE PEPTIDASE FROM TISSUE CULTURE OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.). *micologia Biolo*, (December), 608–612. <https://doi.org/10.1079/IVP2002344>
- Park, H., Yamanaka, N., Mikkonen, A., Kusakabe, I., & Kobayashi, H. (2000). Purification and characterization of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(5), 931–939.
- Pathak, M., Wong, S. S., Dreveny, I., & Emsley, J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(3), 423–433. <https://doi.org/10.1160/TH12-11-0840>
- Perez-Pinzon, M. A., Yenari, M. A., Sun, G. H., Kunis, D. M., & Steinberg, G. K. (1997). SNX-111, a novel, presynaptic N-type calcium channel antagonist, is neuroprotective against focal cerebral ischemia in rabbits. *Journal of the Neurological Sciences*, 153(1), 25–31.
- Perez, C., Fernandez, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberon, M., & Bravo, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18303–18308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505494102>
- Pernas, M., López-solanilla, E., Sánchez-monge, R., Salcedo, G., & Rodríguez-palenzuela, P. (1999). Antifungal Activity of a Plant Cystatin, 12(7), 624–627.
- Petruzzelli, L., Müller, K., Hermann, K., Leubner-metzger, G., Petruzzelli, L., Müller, K., ... Leubner-metzger, G. (2013). Science Research : Distinct expression patterns of β -1, 3-glucanases and chitinases during the germination of Solanaceous seeds Distinct expression patterns of β -1, 3-glucanases and chitinases during the germination of Solanaceous seeds, (2003), 139–153. <https://doi.org/10.1079/SSR2003132>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

- Pezhman, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Varnosfaderani, S. R., & Sefid, F. (2017). Cathepsin B inhibitor improves developmental competency and cryo-tolerance of in vitro ovine embryos, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12861-017-0152-2>
- Pimentel, C., Choi, S., Chagot, B., Guette, C., Camadro, J., & Jacques, I. (2006). Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*, 628–634. <https://doi.org/10.1110/ps.051860606.Psalmopeotoxin>
- Pires, D., Marques, J., Pombo, J. P., Carmo, N., Bettencourt, P., Neyrolles, O., ... Anes, E. (2016). Role of Cathepsins in Mycobacterium tuberculosis Survival in Human Macrophages. *Nature Publishing Group*, (August), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep32247>
- Pirovani, C. P., da Silva Santiago, A., dos Santos, L. S., Micheli, F., Margis, R., da Silva Gesteira, A., ... de Mattos Cascardo, J. C. (2010). Theobroma cacao cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. *Planta*, 232(6), 1485–1497. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1272-0>
- Popovic, M., Andjelkovic, U., Grozdanovic, M., Aleksic, I., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2013). In Vitro Antibacterial Activity of Cysteine Protease Inhibitor from Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Indian Journal of Microbiology*, 53(1), 100–105. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0319-2>
- Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M. J., Ruiz, M. C., Prat, J., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2002). Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes*, 51(5), 1535–1542.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., Van Koningsveld, G. A., Van Den Broek, L. A. M., & Voragen, A. G. J. (2003). The most abundant protease inhibitor in potato tuber (cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5001–5005. <https://doi.org/10.1021/jf0212486>
- Prins, A., van Heerden, P. D. R., Olmos, E., Kunert, K. J., & Foyer, C. H. (2008). Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1935–1950. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern086>
- Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M., & López-otín, C. (2003). HUMAN AND MOUSE PROTEASES: A COMPARATIVE GENOMIC APPROACH, 4(July). <https://doi.org/10.1038/nrg1111>
- Qi, R.-F., Song, Z.-W., & Chi, C.-W. (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5), 283–292.
- Qiu, J. (2008, October). Is China ready for GM rice? *Nature*. England. <https://doi.org/10.1038/455850a>
- Quesada V., e. a. (2009). "The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis." *Nucleic acids research* 37: .D239-D243
- Rajapakse, N., Jung, W. K., Mendis, E., Moon, S. H., & Kim, S. K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22), 2607–2619. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.010>
- Rakashanda, S., Mubashir, S., Qurishi, Y., Hamid, A., Masood, A., & Amin, S. (2013). Solubilization rules of small molecules with different states under ultrasonic extraction, 2(5), 55–65.
- Rau, J., Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. (2007). "Serpins in thrombosis, hemostasis

- and fibrinolysis." *J Thromb Haemost.* 1: 102-115
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). "Evolutionary families of peptidase inhibitors". *Biochem. J.*, 378(3): 705-16.
- Rawlings, N. D. (2010). Biochimie Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92(11), 1463–1483. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.013>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. *Current Protocols in Bioinformatics*, 48, 1.25.1-33. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0125s48>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D343–D350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1118>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Rees, D. C., & Lipscomb, W. N. (1982). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 160(3), 475–498.
- Reiser, J., Adair, B., & Reinheckel, T. (2010). Science in medicine Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease, 120(10), 24–26. <https://doi.org/10.1172/JCI42918.specific>
- Renko, M., Sabotic, J., Mihelic, M., Brzin, J., Kos, J., & Turk, D. (2010). Versatile loops in mycocybins inhibit three protease families. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 308–316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043331>
- REPPOND, K. D., & BABBITT, J. K. (1993). Protease Inhibitors Affect Physical Properties of Arrowtooth Flounder and Walleye Pollock Surimi. *Journal of Food Science*, 58(1), 96–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03218.x>
- Res, M., Zhou, W., & Guo, R. (2018). Natural Products Phenols as Novel Antithrombotic Agents Minireview, 2–5. <https://doi.org/10.21127/yaoyimr20180002>
- Reverter, D., Fernandez-Catalan, C., Baumgartner, R., Pfander, R., Huber, R., Bode, W., ... Aviles, F. X. (2000). Structure of a novel leech carboxypeptidase inhibitor determined free in solution and in complex with human carboxypeptidase A2. *Nature Structural Biology*, 7(4), 322–328. <https://doi.org/10.1038/74092>
- Reverter, D., Vendrell, J., Canals, F., Horstmann, J., Avile, F. X., Fritz, H., & Sommerhoff, C. P. (1998). A Carboxypeptidase Inhibitor from the Medical Leech *Hirudo medicinalis*, 273(49), 32927–32933.
- Ribeiro, S. F. F., Silva, M. S., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Rabelo, G., ... Gomes, V. M. (2012). Capsicum annum L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(3), 657–670. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9683-x>
- Ricardo B. Maccioni, J. P. M. and L. B. (2001). The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders Ricardo. *International Surgery*, 46(6), 573–577. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00316-2)
- Rivard, D., Anguenot, R., Brunelle, F., Le, V. Q., Vezina, L.-P., Trepanier, S., & Michaud, D. (2006). An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal*, 4(3), 359–368.

<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00187.x>

- Rocha, G. F., Díaz, M. E., Rosso, A. M., & Parisi, M. G. (2016). Citotoxicidad de una aspartil peptidasa de *Salpichroa organifolia* frente a la infección causada por *Phytophthora capsici* en zapallitos verdes (*Cucurbita maxima*, var. Zapallito). *Cultivos Tropicales*, 37, 111–117. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4562.3926>
- Rogersa, B. L., Pollock, J., Klapperb, D. G., & Griffith, I. J. (1993). Sequence of the proteinase-inhibitor cystatin homologue from the pollen of *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed)*, 133, 219–221.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosenthal, P. J. (2004). Cysteine proteases of malaria parasites. *International Journal for Parasitology*, 34(13–14), 1489–1499. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.003>
- Rosenthal, P. J. (2011). Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 712, 30–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_3
- Rudek, M. A., Venitz, J., & Figg, W. D. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy*, 22(6), 705–720.
- Rullan, M., Cerda, L., Frontera, G., Masmiquel, L., & Llobera, J. (2008). Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 25(9), 1090–1095. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02527.x>
- Ruseler-van Embden, J. G. H., van Lieshout, L. M. C., Smits, S. A., van Kessel, I., & Laman, J. D. (2004). Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of peri-anal dermatitis. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(4), 303–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01330.x>
- Ryan, C. A. (1980). Wound-regulated synthesis and vacuolar compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. *Current Topics in Cellular Regulation*, 17, 1–23.
- Ryan, S. N., Laing, W. A., & McManus, M. T. (1998). A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. *Phytochemistry*, 49(4), 957–963.
- Sajid, M., & McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 1–21.
- Sanglas, L., Aviles, F. X., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., & Arolas, J. L. (2009). Mammalian metallopeptidase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1743–1747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812623106>
- Sambrook JF y Maniatis T (1989). —Molecular Cloning: a laboratory manualll. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Sapio, M. R., Salzmann, A., Vessaz, M., Crespel, A., Lyons, P. J., Malafosse, A., & Fricker, L. D. (2012). Naturally occurring carboxypeptidase A6 mutations: Effect on enzyme function and association with epilepsy. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42900–42909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414094>
- Satheesh, L. S., & Murugan, K. (2011). Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt., 49(May), 366–374.
- Schroeder, V., Chatterjee, T., Mehta, H., Windecker, S., Pham, T., Devantay, N., ... Kohler, H. P. (2002). Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thrombosis and Haemostasis*,

88(6), 1020–1025.

- Sen, L. C., & Whitaker, J. R. (1973). Some properties of a ficin-papain inhibitor from avian egg white. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 158(2), 623–632.
- Senthilkumar, R., Cheng, C.-P., & Yeh, K.-W. (2010). Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Journal*, 8(1), 65–75. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00466.x>
- Shah, A., & Bano, Æ. B. (2009). Cystatins in Health and Diseases, (October 2008), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s10989-008-9160-1>
- Shamsi, A., & Bano, B. (2017). Journey of cystatins from being mere thiol protease inhibitors to at heart of many pathological conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 674–693. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.071>
- Shamsi, T. N., Parveen, R., Afreen, S., Azam, M., Sen, P., Sharma, Y., ... Fatma, T. (2018). Trypsin Inhibitors from *Cajanus cajan* and *Phaseolus limensis* Possess Antioxidant , Anti- Inflammatory , and Antibacterial Activity, 0211. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1407383>
- Shamsi, T. N., Parveen, R., & Fatima, S. (2016). Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1120–1133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069>
- Shimizu, M. (2004). Food derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, 21(1 4), 43–47. Retrieved from <http://iospress.metapress.com/content/ruv9m8xhdqm48yxk/?genre=article&issn=0951-6433&volume=21&issue=1&spage=43>
- Siemens, J., Zhou, S., Piskowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., ... Julius, D. (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*, 444(7116), 208–212. <https://doi.org/10.1038/nature05285>
- Sigoillot, M., Brockhoff, A., Neiers, F., Poirier, N., Belloir, C., Legrand, P., ... Briand, L. (2018). The Crystal Structure of Gurmarin, a Sweet Taste-Suppressing Protein: Identification of the Amino Acid Residues Essential for Inhibition. *Chemical Senses*, 43(8), 635–643. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy054>
- Silva, R. G. G., Vasconcelos, I. M., Filho, A. J. U. B., Carvalho, A. F. U., Souza, T. M., Gondim, D. M. F., ... Oliveira, J. T. A. (2015). Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.058>
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., ... Whisstock, J. C. (2001). The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally, 33293–33297. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200>
- Sin, S., & Chye, M. (2004). Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*, 1010–1022. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1306-6>
- Singh, S., Singh, A., Kumar, S., Mittal, P., & Singh, I. K. (2018). Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. *Insect Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12641>
- Sitjà-Arnau, M., Molina, M. A., Blanco-Aparicio, C., Ferrer-Soler, L., Lorenzo, J., Avilés, F. X., ... De Llorens, R. (2005). Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor

- (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Letters*, 226(2), 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.025>
- Soares-Costa, A., Beltramini, L. M., Thiemann, O. H., & Henrique-Silva, F. (2002). A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1194–1199.
- Song, I., Taylor, M., Baker, K., & Bateman, R. C. J. (1995). Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. *Gene*, 162(2), 221–224.
- Souza, C., Camargo, R., Demasi, M., & Santana, J. M. (2014). Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086600>
- Srikanth, S., & Chen, Z. (2016). Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy, 7(December). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00470>
- Stacey, M. C., Burnand, K. G., Mahmoud-Alexandroni, M., Gaffney, P. J., & Bhogal, B. S. (1993). Tissue and urokinase plasminogen activators in the environs of venous and ischaemic leg ulcers. *The British Journal of Surgery*, 80(5), 596–599.
- Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1993). Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide Case-Control Study. I. Vegetables and fruit. *International Journal of Cancer*, 53(5), 711–719.
- Stoch, S. A., & Wagner, J. A. (2008). Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83(1), 172–176. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100450>
- Stubbs, M. T., Huber, R., & Bode, W. (1995). Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin, 375, 103–107.
- Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., & Turk, V. (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *The EMBO Journal*, 9(6), 1939–1947.
- Sun, L., Burnett, J., Guo, C., Xie, Y., Pan, J., Yang, Z., ... Sun, D. (2016). CPA4 is a promising diagnostic serum biomarker for pancreatic cancer. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 91–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4759400/>
- Swathi, M., Lokya, V., Swaroop, V., Mallikarjuna, N., Kannan, M., Dutta-Gupta, A., & Padmasree, K. (2014a). Structural and functional characterization of proteinase inhibitors from seeds of *Cajanus cajan* (cv. ICP 7118). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.009>
- Swathi, M., Lokya, V., Swaroop, V., Mallikarjuna, N., Kannan, M., Dutta-Gupta, A., & Padmasree, K. (2014b). Structural and functional characterization of proteinase inhibitors from seeds of *Cajanus cajan* (cv. ICP 7118). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.009>
- Tabashnik, B. E., Brevault, T., & Carriere, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6), 510–521. <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>
- Tamhane, T., Lu, S., Maelandsmo, G. M., Haugen, M. H., & Brix, K. (2016). Biochimie Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells. *Biochimie*, 122, 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.003>
- Tanco, S., Lorenzo, J., Garcia-Pardo, J., Degroeve, S., Martens, L., Aviles, F. X., ... Van

- Damme, P. (2013). Proteome-derived peptide libraries to study the substrate specificity profiles of carboxypeptidases. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 12(8), 2096–2110. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023234>
- Tavano, O. L., Berenguer-murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology, 00(Figure 1), 1–25. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Tellechea, M., Garcia-Pardo, J., Cotabarren, J., Lufrano, D., Bakas, L., Avil?s, F., ... Tanco, S. (2016). Microplate Assay to Study Carboxypeptidase A Inhibition in Andean Potatoes. *Bio-Protocol*, 6(23), 1–12. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2032>
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*, 216(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tobey, N., Heizer, W., Yeh, R., Huang, T. I., & Hoffner, C. (1985). Human intestinal brush border peptidases. *Gastroenterology*, 88(4), 913–926.
- Torres-Castillo, J. A., Jacobo, C. M., & Blanco-Labra, A. (2009). Characterization of a highly stable trypsin-like proteinase inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (O. streptacantha Lemaire). *Phytochemistry*, 70(11–12), 1374–1381. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.009>
- Treggiari, D., Zoccatelli, G., Chignola, R., Molesini, B., Minuz, P., & Pandolfini, T. (2017). Tomato cystine-knot miniproteins possessing anti-angiogenic activity exhibit in vitro gastrointestinal stability, intestinal absorption and resistance to food industrial processing. *Food Chemistry*, 221, 1346–1353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.020>
- Tsang, M. W., Wong, W. K. R., Hung, C. S., Lai, K.-M., Tang, W., Cheung, E. Y. N., ... Lam, E. K. H. (2003). Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 26(6), 1856–1861.
- Turk, V., & Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 285(2), 213–219.
- Turk B, Turk V, Turk D (1997). "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors". *Biol. Chem.*, 378(3-4): 141-50
- Turk, V., & Turk, B. (2008). Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors: Recent Developments, 727–738.
- Tuyet, H. Le, Nguyen Quynh, T. T., Vo Hoang Minh, H., Thi Bich, D. N., Do Dinh, T., Le Tan, D., ... Tran Trong, T. N. (2009). The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results. *International Wound Journal*, 6(2), 159–166. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00594.x>
- Urwin, P. E., McPherson, M. J., & Atkinson, H. J. (1998). Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta*, 204(4), 472–479. <https://doi.org/10.1007/s004250050281>
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41(3), 415–427.
- Vaalamo, M., Weckroth, M., Puolakkainen, P., Kere, J., Saarinen, P., Lauharanta, J., & Saarialho-Kere, U. K. (1996). Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *The British*

Journal of Dermatology, 135(1), 52–59.

- Valdes-Rodriguez, S., Cedro-Tanda, A., Aguilar-Hernandez, V., Cortes-Onofre, E., Blanco-Labra, A., & Guerrero-Rangel, A. (2010). Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 48(6), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.03.012>
- Valueva, T. A., & Mosolov, V. V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11), 1305–1309. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0015-5>
- Valueva, T. A., Revina, T. A., Gvozdeva, E. L., Gerasimova, N. G., Il'inskaia, L. I., & Ozeretskovakaia, O. L. (2001). [Effect of elicitors on accumulation of protease inhibitors in injured potato tubers]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 37(5), 601–606.
- Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya, G. V., & Mosolov, V. V. (1998). Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tubers. *FEBS Letters*, 426(1), 131–134.
- Van der Vyver, C., Schneidereit, J., Driscoll, S., Turner, J., Kunert, K., & Foyer, C. H. (2003). Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 1(2), 101–112. <https://doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00010.x>
- van Tilburg, N. H., Rosendaal, F. R., & Bertina, R. M. (2000). Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*, 95(9), 2855–2859.
- van Wyk, S. G., Kunert, K. J., Cullis, C. A., Pillay, P., Makgopa, M. E., Schlüter, U., & Vorster, B. J. (2016). Review: The future of cystatin engineering. *Plant Science*, 246, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.016>
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V., & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design*, 13(4), 387–403.
- Vendrell, J., Querol, E., & Aviles, F. X. (2000). Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1–2), 284–298.
- Venhudova, G., Canals, F., Querol, E., & Aviles, F. X. (2001). Mutations in the N- and C-terminal tails of potato carboxypeptidase inhibitor influence its oxidative refolding process at the reshuffling stage. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11683–11690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007927200>
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *The British Journal of Nutrition*, 92(3), 357–366.
- Vierstra, R. D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*, 8(3), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00014-1)
- Villanueva, J., Canals, F., Prat, S., Ludevid, D., Querol, E., & Avilés, F. X. (1998). Characterization of the wound-induced metalloprotease inhibitor from potato: cDNA sequence, induction of gene expression, subcellular immunolocalization and potential roles of the C-terminal propeptide. *FEBS Letters*, 440(1–2), 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01447-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01447-1)
- Vinokurov, K. S., Elpidina, E. N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D. P., Dunaevsky, Y. E., & Belozersky, M. A. (2006). Diversity of digestive proteinases in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 145(2), 126–137.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.005>

- Virgil, S. C. (2010, August 25). First-Generation HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*. <https://doi.org/doi:10.1002/9783527630943.ch6>
- Vogt, G., Woell, S., & Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *Journal of Molecular Biology*, 269(4), 631–643. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1042>
- Waldron, C., Wegrich, L. M., Merlo, P. A., & Walsh, T. A. (1993). Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Molecular Biology*, 23(4), 801–812.
- Walsh, T. A., & Strickland, J. A. (1993). Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. *Plant Physiology*, 103(4), 1227–1234.
- Walsh, T. A., & Twitchell, W. P. (1991). Two kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiology*, 97(1), 15–18.
- Wang, C. K., Shu-Hong, H., Martin, J. L., Sjögren, T., Hajdu, J., Bohlin, L., ... Craik, D. J. (2009). Combined x-ray and NMR analysis of the stability of the cyclotide cystine knot fold that underpins its insecticidal activity and potential use as a drug scaffold. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10672–10683. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900021200>
- Wang, S. Y., Wu, J. H., Ng, T. B., Ye, X. Y., & Rao, P. F. (2004). A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*, 25(8), 1235–1242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.06.004>
- Wang, X., Smith, P. L., Hsu, M. Y., Ogletree, M. L., & Schumacher, W. A. (2006). Murine model of ferric chloride-induced vena cava thrombosis: Evidence for effect of potato carboxypeptidase inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(2), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01703.x>
- Weeda, S. M., Mohan Kumar, G. N., & Richard Knowles, N. (2009). Developmentally linked changes in proteases and protease inhibitors suggest a role for potato multicystatin in regulating protein content of potato tubers. *Planta*, 230(1), 73–84. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0928-0>
- Weitz, J. I., Howard, E. L., Becker, K. C. D., Rusconi, C. P., & Becker, R. C. (2007). Factor IXa Inhibitors as Novel Anticoagulants, 722–727. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000259363.91070.f1>
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., ... Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *International Journal of Cancer*, 60(1), 137–144.
- Wenczak, B. A., Lynch, J. B., & Nanney, L. B. (1992). Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(6), 2392–2401. <https://doi.org/10.1172/JCI116130>
- Werle, M., Kafedjiiski, K., Kolmar, H., & Bernkop-Schnürch, A. (2007). Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1–2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.028>
- Wilczynski, A. M., Joseph, C. G., & Haskell-Luevano, C. (2005). Current trends in the structure-activity relationship studies of the endogenous agouti-related protein (AGRP) melanocortin receptor antagonist. *Medicinal Research Reviews*, 25(5), 545–556.

- <https://doi.org/10.1002/med.20037>
- Williams, J. A., Day, M., & Heavner, J. E. (2008). Ziconotide: an update and review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(9), 1575–1583. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.9.1575>
- Winckers, K., ten Cate, H., & Hackeng, T. M. (2013). The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis. *Blood Reviews*, 27(3), 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.03.001>
- Wong, J. H., & Ng, T. B. (2005). Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, 26(7), 1120–1126. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.003>
- Wysocki, A. B., Staiano-Coico, L., & Grinnell, F. (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *The Journal of Investigative Dermatology*, 101(1), 64–68.
- Xu, Z. F., Qi, W. Q., Ouyang, X. Z., Yeung, E., & Chye, M. L. (2001). A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Molecular Biology*, 47(6), 727–738.
- Xue, Z., Zhou, Y., Wang, C., Zheng, J., Zhang, P., Zhou, L., ... Cai, Z. (2016). Latexin exhibits tumor-suppressor potential in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology Reports*, 35(1), 50–58. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4353>
- Yager, D. R., & Nwomeh, B. C. (1999). The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6), 433–441. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1999.00433.x>
- Yang, A. H., & Yeh, K. W. (2005). Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). *Planta*, 221(4), 493–501. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1462-8>
- Yoza, K.-I., Nakamura, S., Yaguchi, M., Haraguchi, K., & Ohtsubo, K.-I. (2002). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. Ma-yuen Stapf). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(10), 2287–2291.
- Yu, B., & Millhauser, G. L. (2007). Chemical disulfide mapping identifies an inhibitor cystine knot in the agouti signaling protein. *FEBS Letters*, 581(29), 5561–5565. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.062>
- Zavodszky, M., Chen, C.-W., Huang, J.-K., Zolkiewski, M., Wen, L., & Krishnamoorthi, R. (2001). Disulfide bond effects on protein stability: Designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Science*, 10(1), 149–160. <https://doi.org/10.1110/ps.26801>
- Zhang, G., & Li, G. (2012). Novel multiple markers to distinguish melanoma from dysplastic nevi. *PLoS One*, 7(9), e45037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045037>
- ZHANG, Y., KOUZUMA, Y., MIYAJI, T., & YONEKURA, M. (2008). Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Bowman-Birk Type Trypsin Inhibitor from *Apios americana* Medikus Tubers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(1), 171–178. <https://doi.org/10.1271/bbb.70531>
- Zhao, Y.-R., Xu, Y.-H., Jiang, H.-S., Xu, S., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2014). Antibacterial activity of serine protease inhibitor 1 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 44(2), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.002>

- Zhong, C., Cai, Q. F., Liu, G. M., Sun, L. C., Hara, K., Su, W. J., & Cao, M. J. (2012). Purification and characterisation of cathepsin L from the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*) and comparison of its role with myofibril-bound serine proteinase in the degradation of myofibrillar proteins. *Food Chemistry*, *133*(4), 1560–1568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.050>
- Zhou, P. (2016). Association between SNPs in the promoter region in cathepsin S and risk of asthma in Chinese Han population, 2070–2076.
- Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. (2015). Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 233–252. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0083>
- Zorio, E., Castello, R., Falco, C., Espana, F., Osa, A., Almenar, L., ... Estelles, A. (2003). Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. *British Journal of Haematology*, *122*(6), 958–965.