

65TCA. EFECTOS BIOLÓGICOS DE INHIBIDORES DE PROTEASAS EN ALIMENTOS

CISNEROS, J. S. *; TELLECHEA, M. *; CECCACCI, M. F. *; OBREGON, W. D. *

*Facultad de Ciencias Exactas/LIPROVE, Universidad Nacional de La Plata (1900), La Plata, Argentina - josesebastiancisneros@hotmail.com

Resumen: Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes para el desarrollo de alimentos, debido a su diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse en seres vivos. Entre estos productos se encuentran los inhibidores de proteasas (IPs). Las fuentes vegetales de IPs han sido escasamente exploradas y tienen la ventaja de su extraordinaria riqueza y diversidad. Tienen menor costo de obtención y procedimientos muy sencillos, si se comparan con los procedimientos de obtención por síntesis química. Seguramente el mayor incentivo para la búsqueda de nuevos IPs es que el control de la proteólisis de las proteasas propias del alimento o actividad antimicrobiana presente en el mismo representa una herramienta valiosa a la hora de conservar alimentos (Ayensa, 2002; Jin-Young et al., 2005). La combinación de la espectrometría de masas junto a la inmovilización de proteasas ha logrado desarrollar una técnica rápida y versátil “High-throughput screening” (HTS) que permite realizar un screening rápido para la identificación de moléculas. Esta metodología ha permitido identificar IPs en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales. Por medio de IF/MALDI TOF/MS, se pudo identificar nuevos IPs obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* de la variedad Imillanegra (papa andina) utilizando para su purificación microcolumnas de tripsina inmovilizada en soportes de glioxil agarosa. Con todo esto se propone (aprovechando también nuestra experiencia en el estudio bioquímico y estructural de las proteínas, sus aplicaciones biotecnológicas y la infraestructura disponible en nuestro laboratorio) continuar con la detección, purificación, caracterización bioquímica y aplicación de técnicas bioinformáticas sobre nuevos inhibidores de proteasas que demuestren posibilidades de potenciales aplicaciones en el desarrollo de nuevas sustancias utilizadas en la conservación de alimentos.

1. Introducción

En los últimos años, la nutrición y la tecnología de los alimentos están experimentando una profunda transformación debido al desarrollo del concepto de alimentos funcionales y de nutracéuticos. Tanto las proteínas funcionales como los péptidos bioactivos están cobrando gran importancia ya que, además de su papel nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema inmune, el sistema cardiovascular o el tracto gastrointestinal. Además, se ha descrito que estos péptidos y proteínas pueden tener efectos anticancerígenos, antibacterianos o antivirales. Las proteínas de origen vegetal muestran frecuentemente efectos hipocolesterolemiantes en comparación con las proteínas animales (Martínez Augustin et al., 2006). La apoptosis, la coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que participan las proteasas escindiendo proteínas o proenzimas. Los inhibidores de proteasas (IPs) representan para los organismos una eficiente vía de control de la actividad de proteasas endógenas, que necesitan ser balanceadas en estado normal para obtener una proteólisis controlada. La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. Estas biomoléculas abren un camino potencial para el

desarrollo de tratamientos adecuados para la conservación de alimentos con aditivos naturales. Esto puede llegar a producir grandes avances en la industria alimenticia y el bienestar de la comunidad, lo que a su vez, demuestra la importancia de estas tecnologías para la identificación y caracterización de nuevos IPPs.

Se utilizaron diversas técnicas de purificación y caracterización, entre las cuales destacamos una cromatografía de afinidad particularmente diseñada con proteasas inmovilizadas covalentemente a un soporte especial y una técnica proteómica denominada Intensity Fading MALDI-TOF/MS, que permite detectar e identificar pequeñas cantidades de moléculas presentes en una muestra biológica. La variante diseñada por nosotros incluye primariamente una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula pudo ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corroboró la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada, y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas.

2. Objetivos

Obtener extractos crudos a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Imillanegra (papa andina).

- a) Detectar actividad inhibitoria de tripsina y subtilisina en los extractos obtenidos.
- b) Caracterizar bioquímicamente los extractos crudos obtenidos mediante técnicas convencionales (PM, pI, tratamiento térmico)
- c) Purificar cromatográficamente los inhibidores de proteasas (IPs) obtenidos empleando matrices de afinidad especialmente diseñadas mediante el uso de proteasas diana inmovilizadas en soportes de glioxil-agarosa.
- d) Caracterizar bioquímicamente a los inhibidores purificados.
- e) Identificar los IPs mediante técnicas proteómicas tales como Peptide Mass Fingerprint (PMF) e Intensity fading MALDI-TOF.

3. Metodología

Preparación de los extractivos crudos: Se utilizó como material de partida tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Imillanegra. Los mismos se pelaron y trituraron en presencia de ditioneitol (DTT) 0,2 mM en frío para prevenir la oxidación de polifenoles. Luego se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 min. a 4°C y el sobrenadante se centrifugó diferencialmente a 5000g y 11000g por 60 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se denominó EC. La concentración de los inhibidores se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Determinación de actividad inhibitoria de proteasas: Al EC obtenido se le realizó determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas empleando las siguientes proteasas blanco:

- *Determinación de actividad inhibitoria de tripsina:* La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37°C. Buffer: Tris-HCl 0,1M; CaCl₂ 50 mM; pH 8. Enzima: Tipo I de páncreas bovino (Sigma-Aldrich). [2,8x10⁻⁷M]. Sustrato: BAPNA (N-alfa-Benzoil-DL-Arginina-4-Nitroanilida) 10 mM.

- *Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina:* La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 300 seg a 37 °C. Buffer: Tris-HCl 50 mM; pH 8,6. Enzima: Subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich). $[2,0 \times 10^{-7} \text{M}]$. Sustrato: Benzylocarbonyl-glycyl-glycyl-L-leucine4-nitroanilide (GLPNA) Bachem.

Tratamiento térmico del extracto crudo: La mayoría de los inhibidores de proteasas presentan una estructura compacta estabilizada por puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas. Las muestras fueron tratadas térmicamente a 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C durante 1 hora. Se dejaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 11000 g, 90 min a 4 °C. A cada sobrenadante se lo denominó: TT60, TT70, TT80 y TT90. Se analizaron para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

Purificación cromatográfica del extracto crudo: El EC fue sometido a cromatografía de afinidad empleando tripsina inmovilizada previamente en el soporte glioxil agarosa. Los inhibidores fueron separados por cambio de pH del solvente de elución.

Caracterización bioquímica de los extractos crudos y de los inhibidores obtenidos: El EC y los IPPs aislados se analizaron por SDS-PAGE y espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar sus pesos moleculares. También se les determinó el punto isoeléctrico mediante la técnica de isoelectroenfoque.

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

Análisis de la huella peptídica: Se realizó la digestión triptica de las bandas de SDS-PAGE para el análisis de la huella peptídica o “peptide mass fingerprint” (PMF) que se empleó para la identificación de los inhibidores. Las bandas fueron cortadas, lavadas y decoloradas. Luego, se redujeron y alquilaron los grupos Cys libres y se incubaron en presencia de tripsina a 37 °C durante 2 horas para la digestión de los inhibidores. Los péptidos generados fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

4. Resultados y discusión

Elección del medio de extracción: El proceso de obtención EC utilizado para la determinación de la caracterización del mismo fue finalmente el que se obtuvo a partir de agua destilada, en frío, con DTT y filtrado con membrana.

Evidencia de la presencia de inhibidores de proteasas: se determinó la presencia de inhibidores de proteasas en el EC. Se realizó un screening de cinética de inhibición y se pudo detectar actividades inhibitorias de tripsina y subtilisina.

Perfil proteico mediante SDS PAGE: El perfil electroforético del EC muestra la composición proteica por tamaños moleculares que abarcan desde los 3 kDa hasta los 100 kDa. (Fig. 1).

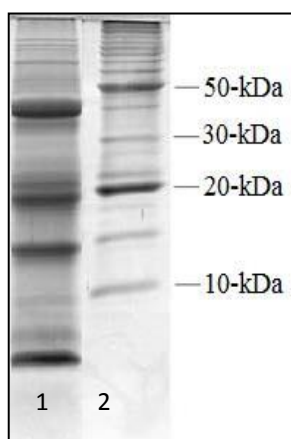


FIGURA 1: SDS-PAGE del EC de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad imillanegra. Calle 1: Extracto crudo. Calle 2: Patrones moleculares.

Purificación de los inhibidores:

Tratamiento térmico: Con el fin de obtener algunos de los inhibidores presentes en el EC, se procedió a un tratamiento térmico del mismo como segunda etapa de purificación, ya que la formación de un EC clarificado y libre de pigmentos la consideramos como una primera y muy importante etapa de purificación. Se sabe que los IPs generalmente presentan cierta estabilidad frente a tratamientos térmicos extremos, debido a ello, se los sometió a incubación a distintas temperaturas y se evaluó la actividad inhibitoria residual de cada proceso. El EC se incubó a 60 °C, 70 °C, 80 °C, y 90 °C durante 1 hora. Luego se centrifugó durante 90 min a 11000 g, descartando el pellet y quedándonos con el sobrenadante. La concentración de cada homogenato se ve en la Tabla 1.

TABLA 1: Concentración de proteínas determinadas por el método de Bradford.

Muestra	Concentración
EC	577,46 µg/ml
TT60	419,89 µg/ml
TT70	105,68 µg/ml

Perfil electroforético de los tratamientos térmicos:

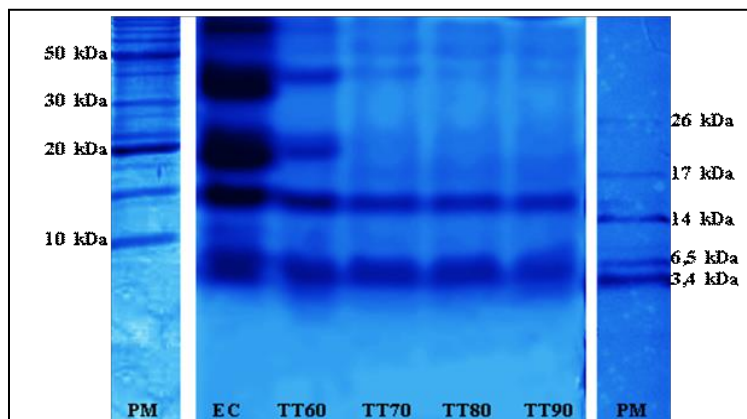


FIGURA 2: SDS-PAGE. Calle 1: Marcadores peptídicos. Calle 2: EC. Calle 3: TT60. Calle 4: TT70. Calle 5: TT80. Calle 6: TT90.

Isoelectroenfoque:

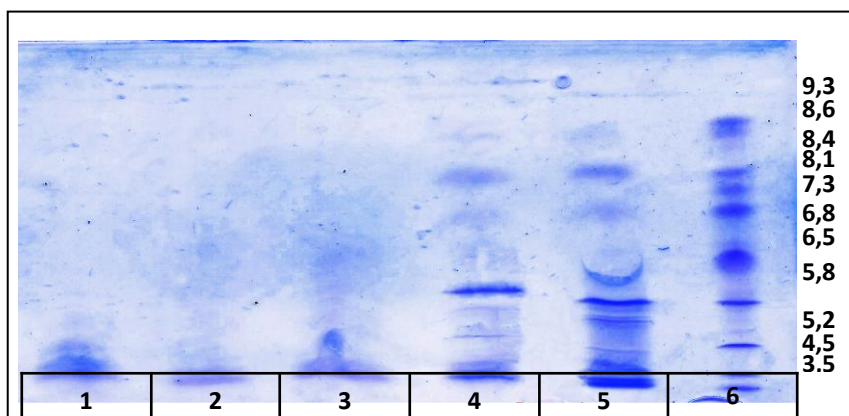


FIGURA 3: Purificación parcial del inhibidor de Tripsina. Calle 1: TT90. Calle 2: TT80. Calle 3: TT70. Calle 4: TT60. Calle 5: EC. Calle 6: Marcadores de pI. Al costado del gel se pueden observar los diferentes pIs de los marcadores.

Cromatografía de afinidad: Para realizar la cromatografía de afinidad se decidió usar tripsina inmovilizada como soporte. Debido a esto, de aquí en adelante los resultados se hacen en base a la actividad inhibitoria de tripsina. Esto se debió a que la obtención de subtilisina inmovilizada no fue posible debido a su elevado costo. Inicialmente se hizo una prueba de actividad a la matriz de tripsina inmovilizada en agarosa la cual se iba a convertir en el relleno de la columna de afinidad. Con el objeto de aislar el inhibidor de tripsina, se empleó el TT70, debido a que la actividad inhibitoria se conserva a dicha temperatura y hay pocas proteínas interferentes. Luego se realizó la cromatografía de afinidad obteniéndose una fracción retenida, la cual mantuvo actividad inhibitoria de tripsina. En la Fig. 4 se compara la inhibición de la tripsina desde el EC de Imillanegra hasta los distintos tratamientos térmicos del mismo junto a la fracción retenida de la cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada.

Actividad de tripsina en presencia de EC con y sin tratamientos térmicos y la fracción retenida en la cromatografía de afinidad:

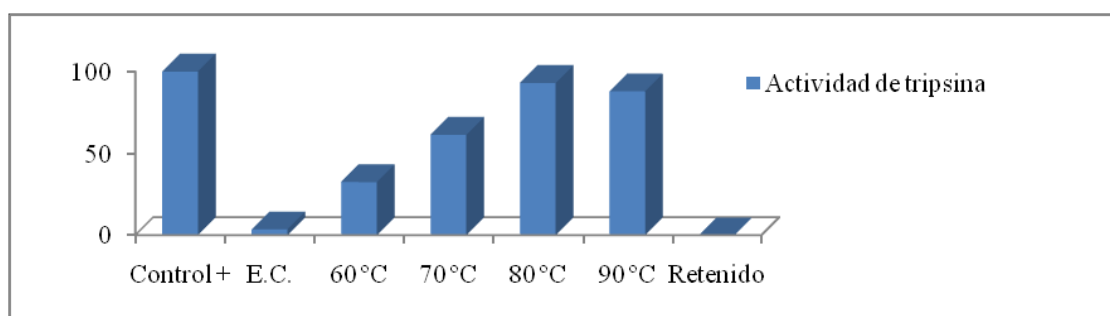


FIGURA 4: El Control + se refiere a la actividad de la tripsina con el sustrato solamente.

La Fig. 4 nos muestra que en el TT70 se recupera un 40% de la actividad inhibitoria original, y la pérdida de proteínas es de un 84 % con respecto al EC (Tabla 1). Con estos resultados se podría suponer que un inhibidor de tripsina del TT60 se desnaturaliza en el TT70, y esto no resultaría sorprendente ya que dicho inhibidor podría estar estabilizado por pocos puentes disulfuros y ser relativamente grande; a diferencia de otros inhibidores que

poseen hasta tres puentes disulfuro y un tamaño menor (de 12 kDa a 4,3 kDa), lo que determina una estructura mucho más compacta y termoestable. Este último inhibidor puede ser el que le confiera la actividad inhibitoria al TT70 y la fracción retenida del mismo en la cromatografía de afinidad demuestra tener una muy buena actividad inhibitoria de tripsina.

Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOFs: La determinación de la masa molecular del inhibidor de tripsina arrojó un pico principal con una masa molecular de 20168 Da. Esto se puede deber a la presencia de isoINHIBIDORES con pesos moleculares muy parecidos que generalmente no se detectan por electroforesis. Por otro lado, el pico de 10084 Da es exactamente la mitad de 20168 Da, que es la masa del pico mayoritario, que corresponde a la proteína ionizada doblemente cargada.

Confirmación de la identificación del inhibidor mediante técnicas proteómicas:

A) Intensity Fading MALDI-TOF: Se confirmó la presencia de inhibidores mediante la técnica proteómica de alta eficiencia denominada Intensity Fading MALDI-TOF/ MS. Los IPPs aislados se analizaron en el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona(UAB) la UAB como parte de un intercambio previsto en el Proyecto de Cooperación Bilateral: Genómica y Proteómica de Biomoléculas de Origen Vegetal otorgado por el MinCyT de Argentina y el MICINN de España.

B) Huella peptídica: Se han identificado en estos extractos, a partir de una huella peptídica de una digestión triptica de cada una de las bandas (Fig. 1), los distintos componentes mayoritarios presentes en dicho extracto. Se pudo identificar con un inhibidor de proteasa serínica tipo Kunitz de la especie *Solanum Tuberosum* subespecie *andígum* de 21 kDa.

5. Conclusiones

Los procesos de purificación mediante inmovilización enzimática han sido claves para el aislamiento de inhibidores. Estas biomoléculas abren un camino potencial para el desarrollo de tratamientos adecuados para diversas enfermedades y para el tratamiento de alimentos en lo que respecta a su conservación y sus actividades nutracéuticas.

Esto pudiera producir grandes avances en la industria y el bienestar de la comunidad, lo que a su vez, demuestra la importancia de estas tecnologías para la identificación y caracterización de nuevos IPPs (Ayensa et al., 2002).

6. Bibliografía:

- Alonso-del-Rivero, M.; Trejo, S.A.; Rodríguez de la Vega, M.; González, Y.; Bronsoms, S.; Canals, F.; Delfín, J.; Diaz, J.; Aviles, F.X.; Chávez, M.A. (2009). A novel metallopeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica* - a step into the invertebrate world of proteases. FEBS Journal 276 (17): 4875-4890.
- Ayensa, M.G.; Montero, M.P.; Borderías, A.J.; Hurtado, J.L. (2002). Influence of Some Protease Inhibitors on Gelation of Squid Muscle. Journal of Food and Science, 67 (5): 1636-1641.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

- Hillenkamp, F.; Karas, M. (1990). Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology*, 193: 280-295.
- Jin-Young, K.; Seong-Cheol, P.; Mi-Hyun, K.; Hak-Tae, L.; Yoonkyung, P.; Kyung-Soo, H. (2005). Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330 (3): 921-927.
- Martínez Augustin, O.; Martínez de Victoria Muñoz, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21 (Supl. 2): 1-14.