

Universidad: Universidad Nacional de La Plata
Facultad/Centro/Instituto: Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LiProVe), Facultad de Ciencias Exactas
Título del Trabajo: Nuevos inhibidores de metalocarboxipeptidasas como potenciales drogas emergentes en biomedicina.
Autor/es: Mariana Edith Tellechea, María Florencia Ceccacci, Natalia Durante, José Sebastián Cisneros
Nivel de formación del investigador principal: Estudiante (no graduado)
Orientador (si lo hubiere): Walter David Obregón
Núcleo Disciplinario/Comité Académico/Otros Temas: Nanociencia y Nanotecnología
Correo electrónico del autor principal: mariana_tellechea@hotmail.com
Palabras Clave: en español: inhibidor, proteasas, inmovilización; en portugués: inhibiteur, protéase, immobilisation

RESUMEN:

Introducción:

El empleo de productos vegetales para la cura de enfermedades tales como el Cáncer, el SIDA y la Malaria, entre otras, puede ser una de las claves terapéuticas a utilizarse en el futuro. Dentro de estos productos bioactivos se encuentran los inhibidores de metalocarboxipeptidasas los cuales, entre otras acciones, inhiben la acción de la trombina en la cascada de coagulación constituyendo una importante droga en las terapias trombolíticas. La regulación precisa de la actividad proteolítica es esencial para la fisiología humana, por esto la actividad de muchas proteasas se encuentra bajo estudio intensivo, ya que los inhibidores de proteasas (IP) son un tipo de regulador de las mismas. La tecnología y la creación de instrumentos para una fina purificación es lo que nos puede permitir detectar los componentes individuales que contienen las propiedades curativas.

Objetivos y Metodología:

Nuestro objetivo es el aislamiento y caracterización de nuevos IPs mediante la combinación de la espectrometría de masas y la inmovilización de enzimas, permitiendo realizar un screening rápido para la identificación de biomoléculas. La inmovilización de enzimas permite su reutilización, así como la mejora de propiedades como la estabilidad, actividad y la selectividad entre sustratos, lo cual, permite la captura selectiva de biomoléculas, aumentando la resolución y el rendimiento de la purificación, muy importante en IPs con potencialidades terapéuticas que requieren de un alto grado de homogeneidad.

Resultados:

Se identificaron, aislaron y purificaron nuevos inhibidores de Carboxipeptidasa A obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie andigenum variedades churqueña y malcacha.

INTRODUCCIÓN:

Inhibidores de proteasas:

Los inhibidores de proteasas (IPs) representan una eficiente vía que tienen los organismos para el control de la actividad de proteasas endógenas y a su vez son herramientas que protegen a los tejidos frente a una proteólisis descontrolada en estados patológicos. Adicionalmente, los IPs pueden controlar la actividad de proteasas exógenas como las de virus, bacterias y parásitos y de este modo estar involucrados en los mecanismos de defensa del organismo. Seguramente el mayor incentivo para la búsqueda de nuevos IPs es que el control de la proteólisis representa una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos. Los inhibidores contra proteasas serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas son ubicuos, pero los inhibidores de proteasas aspárticas no han sido hasta ahora detectados en semillas, aún cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar. 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. Se sabe que la actividad de enzimas como proteasas por ej., puede contribuir o extinguir una enfermedad, por tanto, muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas, siendo las dianas de casi la mitad de los fármacos del mundo (Hopkins and Groom 2002).

Inhibidores de metalocarboxipeptidasas

A diferencia de los numerosos ejemplos de inhibidores de origen vegetal encontrados para tripsina, catepsina, quimotripsina, entre otras, los inhibidores de carboxipeptidasas naturales no han sido reportados y solo es limitado su hallazgo en la naturaleza. Solo han sido encontrados en plantas pertenecientes a la familia Solanáceae, tanto en tomate como en papa (Ryan, Hass et al. 1974; Hass, Nau et al. 1975; Hass and Hermodson 1981).

El mecanismo de inhibición del inhibidor de carboxipeptidasa A de papa se basa en la interacción de su secuencia aminoacídica carboxilo terminal con la ranura del sitio activo de dicha enzima imitando la unión del sustrato a este sitio (Vendrell, Querol et al. 2000). Por otra parte, propéptidos de procarboxipeptidasas, que se pliegan como dominios globulares independientes, tienen la posición de su lazo inhibitorio sobre la parte superior de la hendidura del sitio activo de la carboxipeptidasa A, manteniendo la enzima inhibida (Vendrell, Guasch et al. 1992; Chen, Wang et al. 1996; Muller, Appelros et al. 2002). Sobre la base de las funciones fundamentales de la carboxipeptidasa, sus inhibidores se han convertido en moléculas muy atractivas como fármacos potenciales para su estudio en las diferentes enfermedades sistémicas e infecciosas, destacándose las enfermedades cardiovasculares y la malaria, entre los más importantes.

Importancia de la inmovilización de enzimas

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

Inmovilización de proteasas para captura de inhibidores peptídicos utilizando soportes de glioxil-agarosa.

La inmovilización de enzimas a soportes que contienen grupos aldehídos alifáticos, como por ejemplo glioxil-agarosa, presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico. Se puede aumentar la rigidez de las molécula enzimáticas y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparada a las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aún cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Guisán, 2006). La agarosa corresponde a un tipo de soporte utilizado para inmovilizar enzimas debido a sus buenas propiedades físico-químicas: a mayor grado de entrecruzamiento, se tiene mayor superficie, dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, por lo tanto se puede cargar este soporte con más grupos reactivos. Este tipo de soporte, debido a sus características físico-químicas, ha sido utilizado para inmovilizar mediante la técnica de unión multipuntual covalente algunas enzimas como penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (Alvaro, Fernandez-Lafuente et al. 1990) tripsina (Soler, Bastida et al. 1997) y α -quimotripsina de páncreas de bovino (Guisan, Bastida et al. 1991) y otras proteasas (Yust Mdel, Pedroche et al. 2007). El método de inmovilización multipuntual covalente, es aquel en el que los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática reaccionan con los residuos de un soporte activado, quedando ubicada la enzima en su superficie mediante el establecimiento de varios puntos de unión. El entrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así

como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (M. Arroyo 1998; Montes, Grazu et al. 2006).

OBJETIVOS:

- a) Obtener extractos crudos con actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasa a partir de tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedades "Churqueña" y "Malcacha".
- b) Evaluar la estabilidad térmica de los inhibidores hallados.
- c) Diseñar matrices de afinidad para inmovilizar proteasas diana (carboxipeptidasa A, tripsina, araujiaina) selectivas en soportes de glioxil-agarosa.
- d) Purificar los IPs mediante cromatografía de afinidad.
- e) Caracterizar los inhibidores obtenidos por técnicas convencionales y/o proteómicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de los extractivos crudos:

Se utilizaron como material de partida tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad Churqueña y Malcacha. Los mismos se pelaron y trituraron en presencia de agentes antioxidantes. Se mezclaron con ditioneitol (DTT) para prevenir la oxidación de polifenoles y luego con agua fría, mediante incubación en la heladera sedimentó el almidón y el sobrenadante se centrifugó a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C. Los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C y posteriormente fueron filtrados en filtro de Orange Sci PES de 0,2 µm con jeringa BD Plastipak de 1 ml; obteniéndose de este modo el extracto crudo (EC).

2. Determinación de actividad inhibitoria de proteasas:

Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA):

La actividad es registrada por el descenso de la absorbancia a 350nm mediante medidas continuas durante 120 seg a 37°C. Buffer de reacción: Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,2M; pH 7,5. Solución de enzima: CPA de páncreas bovino (Sigma-Aldrich). Concentración de enzima: $7,0 \times 10^{-9}$ M. Solución de sustrato: N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH 10mM. La inhibición causa la disminución de la velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se traduce en la atenuación de la pendiente de la señal registrada.

3. Tratamiento térmico del extracto crudo:

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas. Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 70 °C, 85 °C, y 100 °C durante 60 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a

11000 rpm por 90 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

4. Inmovilización de proteasas sobre gel de agarosa

El soporte utilizado para la inmovilización de Carboxipeptidasa A, tripsina y Araujiaína 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, utilizando el protocolo de activación de (Soler, Bastida et al. 1997). Se preparó una solución de agarosa de 180 ml (conteniendo 105 ml de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución conteniendo 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH₄ y luego se agregaron gota a gota 36 ml de glicidol. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 h aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Luego se lavó el gel varias veces con agua destilada, operación que se realizó filtrando bajo vacío (en un filtro con fritas para no dañar la agarosa). De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1.410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO₄ en 240 ml de agua destilada (100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel glioxil-agarosa con abundante agua destilada, de igual forma a la descrita previamente. La inmovilización se realizó a 25° C, pH 10, con bicarbonato de sodio 100 mM, glicerina al 25% (v/v), en una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml.

5. Purificación cromatográfica del extracto crudo:

Se realizó una cromatografía de afinidad con CPA inmovilizada en glioxil-agarosa. El extracto crudo fue clarificado por centrifugación durante 60 minutos a 13000 rpm y a 4°C, 50 ml del EC fueron sembrados y eluidos a una velocidad de 1ml/min por la columna y luego se lavó la misma con buffer de reacción de CPA (Tris-HCl 0,1M, ClNa 0,2 M, pH 7,2) recolectando la fracción no retenida y midiendo la absorbancia a 280 nm. hasta llegar a 0, momento en el cual se eluye la fracción retenida con un descenso progresivo del PH, cambiando el buffer de elución primero con ácido acético a pH 5 y luego ácido acético a pH 3 para lograr la desestabilización del complejo CPA-inhibidor y se recolectó en fracciones de 2 ml. Por último la columna se lavó con Tris-HCl 0,1M, ClNa 0,2 M, pH 7,2 y se guardó para posteriores usos. Posteriormente se le verificó la actividad inhibitoria y la concentración de proteínas.

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

6. Determinación de proteínas por el Método de Bradford:

Se basa en que la unión de Coomassie Blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el Método de Lowry. Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 5-100 µg/ml para el micrométodo: Se realizó el blanco correspondiente utilizando el medio de extracción, agua.

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

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina. Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C), un gel espaciador (10% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C).

Fijación y Tinción:

Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250:

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

Tinción con Coomassie Coloidal

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

8. Identificación mediante Intensity Fading MALDI-TOF/MS:

Intensity fading MALDI/TOF: La atenuación de la intensidad de la señal de espectrometría de masas con el método de ionización asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (IF MALDI-TOF MS: del inglés "intensity fading", "matrix-assisted laser desorption ionization", "time of flight", "mass spectrometry") posibilita detectar la formación

de complejos entre moléculas, particularmente proteínas, mediante la utilización de la espectrometría de masas como transductor. El método fue desarrollado para identificar IPs a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con las proteasas que inhibe. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación total o parcial de la intensidad iónica molecular de una proteína, después de adicionar su contraparte molecular, cuando se compara con un espectro de masas control de la muestra inicial. La variante diseñada por nosotros incluye primariamente una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluido selectivamente y analizado mediante espectrometría de masas. De esta forma, la reaparición o el aumento de la intensidad de la señal en el espectro de la fracción eluida, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

9. Análisis de la huella peptídica:

Se realizó la digestión trípica 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 aislados. Para ello las bandas fueron cortadas, lavadas y decoloradas. Posteriormente 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.

RESULTADOS

Obtención del Extracto Crudo y purificación preliminar

De las preparaciones crudas obtenidas de los tubérculos de las papas andinas estudiadas se obtuvo un Extracto Crudo (EC) que contuvo una concentración de proteínas de alrededor de 800 ug/ml en ambas variedades. Se realizó una curva dosis-respuesta de ambos extractos como primera prueba de la existencia de actividad inhibitoria en ambos extractos (Fig 1). Se observa que a medida que aumenta la cantidad de extracto disminuye la actividad de la enzima carboxipeptidasa A, evidenciándose la presencia de un inhibidor de esta enzima en los preparativos obtenidos.

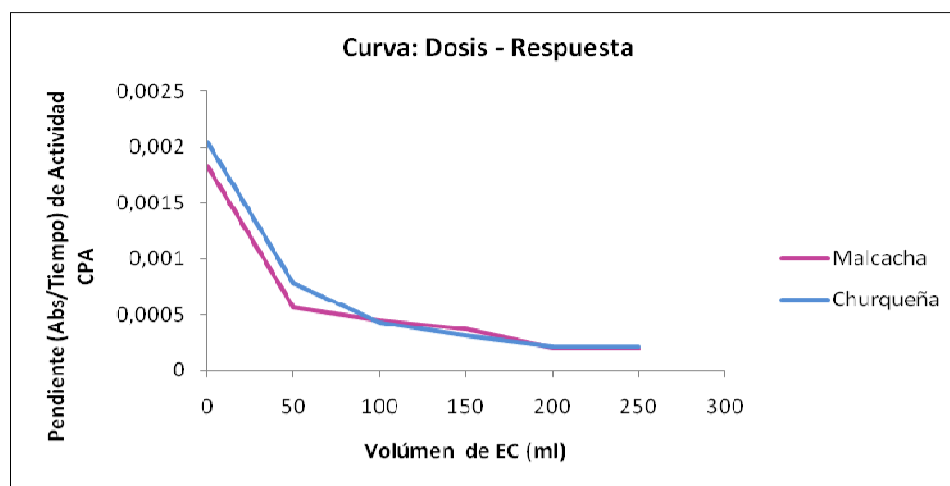
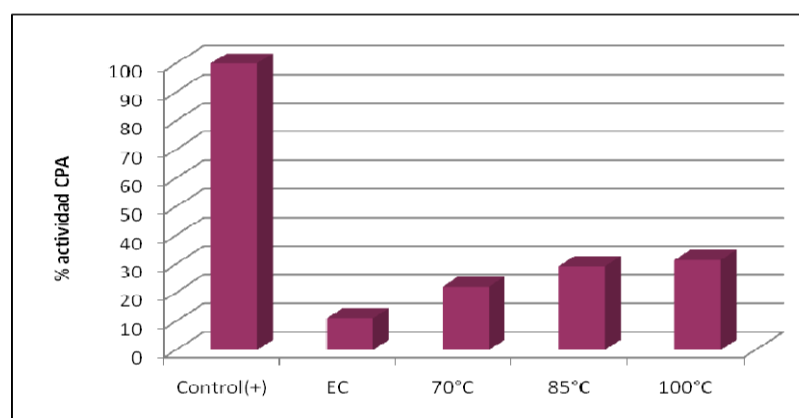


Fig. 1 : Curva dosis- respuesta de ambos extractos

Actividad inhibitoria de CPA frente a los diferentes tratamientos térmicos.

Teniendo en cuenta que el inhibidor de CPA es un péptido termorresistente, el EC fue sometido a tratamiento térmico a 60°C, 70°C, 85°C y 100 °C. Este proceso bajó el rendimiento de proteínas, disminuyendo la concentración a 120 ug/ml cuando la muestra se incubó durante una hora a 60° C. El rendimiento proteico bajó aún mas con los tratamientos de 70°C, 85°C y 100°C cayendo la cantidad de proteínas a valores de alrededor de 90 ug/ml. Sin embargo, la actividad inhibitoria de carboxipeptidasa se mantuvo incluso a 100°C.

Malcacha



Churqueña

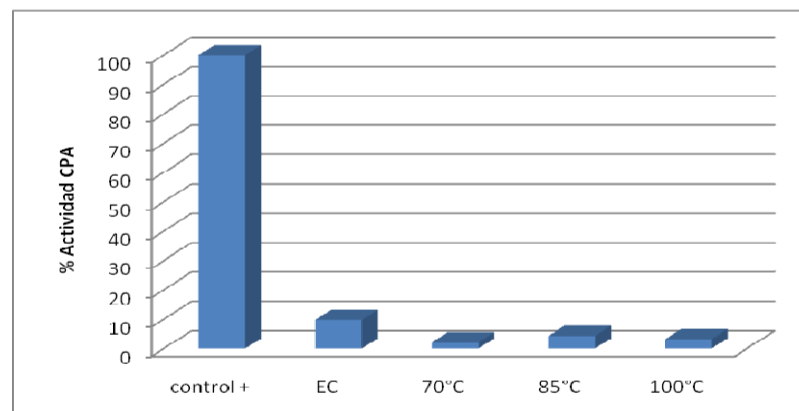


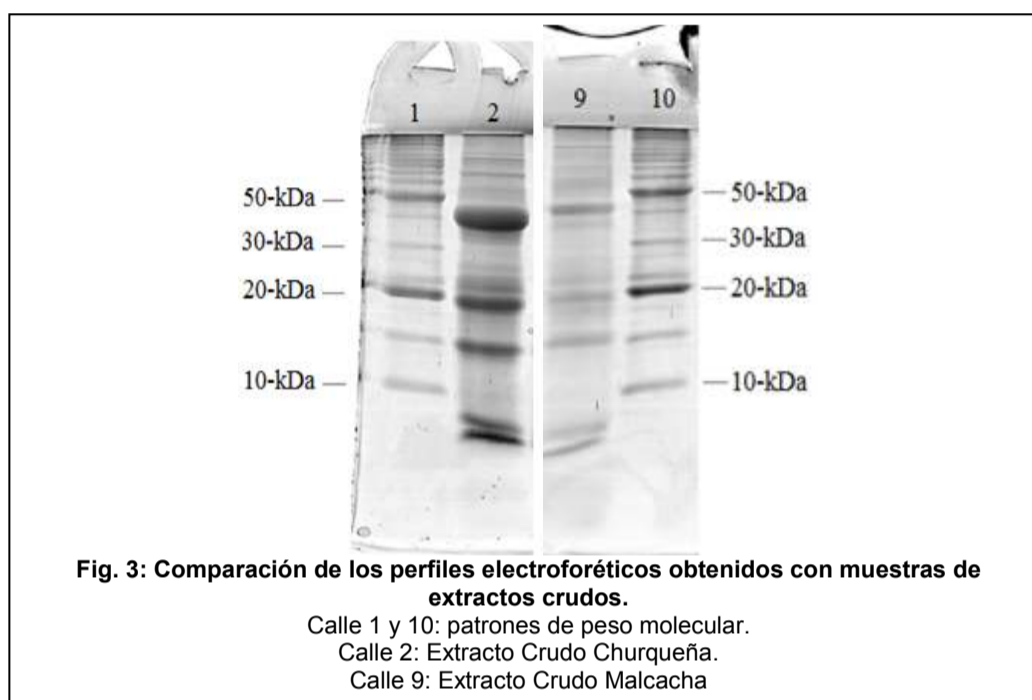
Fig 2 a) Malcacha y b) Churqueña

En las figuras 2 a) y b) se observa la actividad enzimática de carboxipeptidasa A en presencia de los distintos tratamientos térmicos.

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

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

Perfil electroforético de los EC de Churqueña y Malcacha Electroforesis SDS-PAGE.



La figura 3 muestra la distribución de masas moleculares de las proteínas constituyentes del EC. Se observan bandas intensas de 40 KDa, 20 KDa y menores de 10 KDa. Entre las bandas menores a 10 KDa se encuentran los inhibidores de CPA.

Purificación de los inhibidores mediante Cromatografía de Afinidad

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

Como primer ensayo de pruebas se realizó una cromatografía de afinidad CPA-agarosa en Batch como control del proceso. Posteriormente el relleno de afinidad fue colocado en una columna para automatizar la purificación.

En la figura 4 se observa uno de los cromatogramas obtenidos por el proceso de purificación, en este caso el de un extracto crudo proveniente de Churqueña, sin previo tratamiento térmico, para mostrar la relación entre la fracción no retenida (NR) y la fracción retenida.

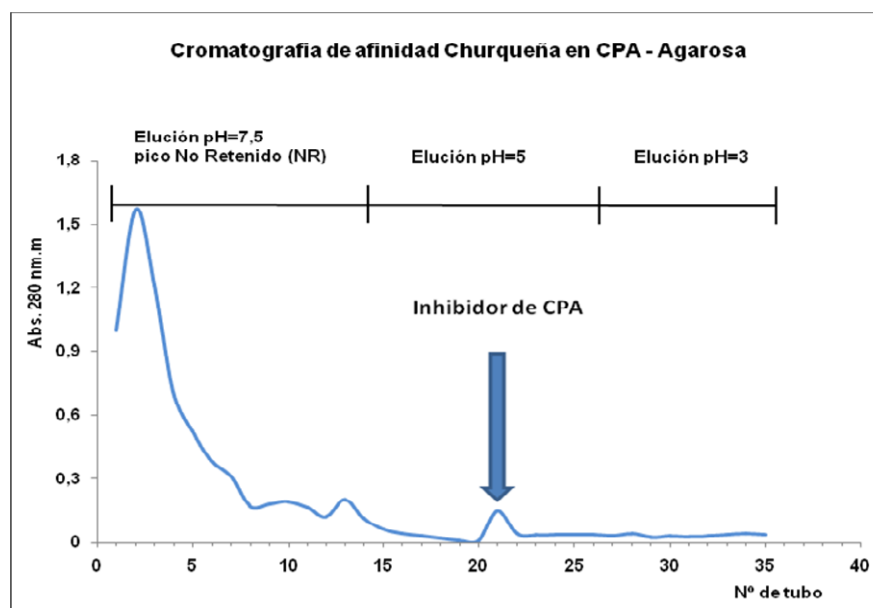


Fig. 4: Cromatografía de afinidad Churqueña en CPA - Agarosa

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

Espectrometría de masas MALDI- TOF, Intensity fading MALDI TOF y PMF MALDI-TOF.

Por espectrometría de masas se verificó la masa molecular de estos inhibidores y se observó que pesan alrededor de 4,2 KDa. (Fig. 5). Se muestran los espectros de masas de algunos tratamientos térmicos de algunas de las muestras analizadas. Se confirmó además la presencia de inhibidores de CPA mediante la técnica proteómica de alta eficiencia denominada Intensity Fading MALDI-TOF/ MS. Los IPs 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.

La obtención de la huella peptídica sin embargo no pudo determinar que este inhibidor sea hallado en bases de datos, por lo cual se confirmaría que se trata de un inhibidor nuevo, no estudiado hasta el momento.

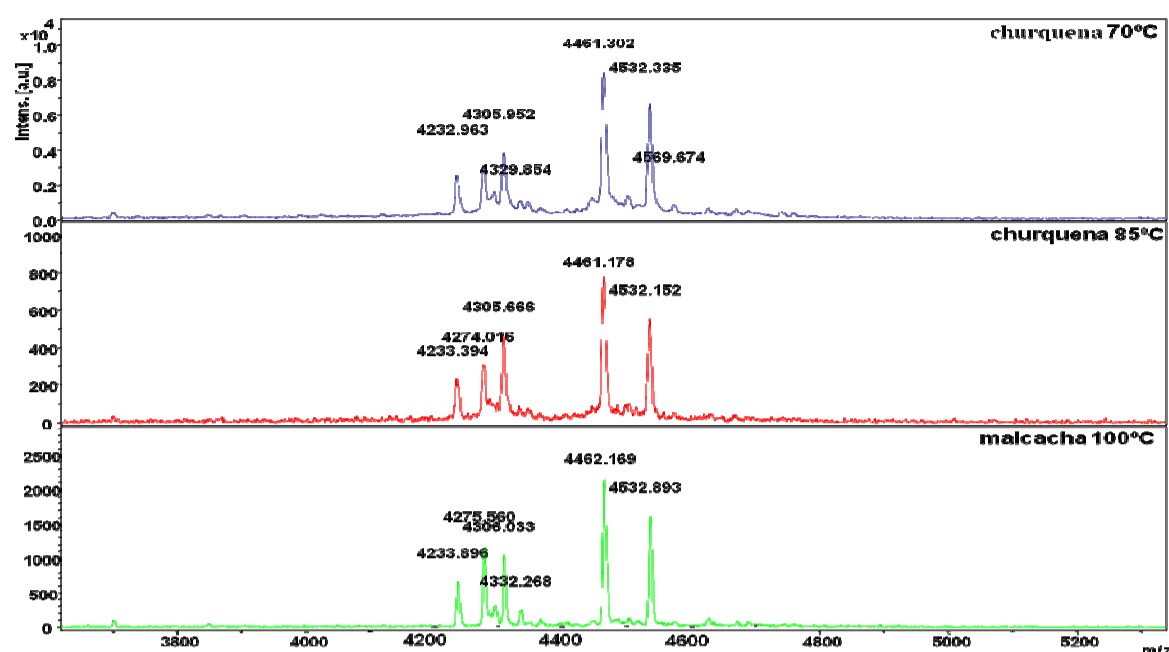


Fig 5: Espectros de masa de las muestras tratadas a 70, 85 y 100 °C.

DISCUSIÓN

Mediante los porcentajes de actividad de CPA se deduce que, en el caso del empleo de los tratamientos térmicos a 70, 85 y 100 °C de Churqueña, la actividad de la enzima es muy baja, lo cual demuestra la muy buena estabilidad térmica del inhibidor. Sin embargo, con respecto a Malcacha se observa que el porcentaje de actividad de CPA no es tan bajo luego de los tratamientos térmicos. Esto significa que, si bien la actividad de CPA sigue siendo baja, es mayor que en el caso de los tratamientos térmicos de Churqueña, lo cual indica una menor estabilidad del inhibidor comparado con el de esta última.

Además, los espectros de masas permiten observar el alto grado de purificación logrado luego de realizar los tratamientos térmicos y la cromatografía de afinidad, conservando en un gran porcentaje la actividad inhibitoria sobre CPA con respecto al extracto crudo.

La existencia de los inhibidores luego de los tratamientos térmicos a 70 y 85 °C, en el caso de Churqueña, y a 100 °C en el caso de Malcacha, se observan en los espectros de masa de la figura 5, pudiendo verificar que la realización de los tratamientos térmicos logra una mayor clarificación del extracto crudo, manteniendo la presencia y la actividad de los inhibidores de carboxipeptidasa.

La inmovilización de enzimas junto con el tratamiento térmico demostraron ser herramientas claves para la purificación y aislamiento de los inhibidores con alto grado de pureza. La espectrometría de masas es un método analítico con alto grado de precisión, lo

cual permitió en nuestro trabajo la identificación concreta de las moléculas presentes en las muestras. Por último, se logró evidenciar que en los tubérculos de las variedades Churqueña y Malcacha se encuentran presentes inhibidores de metalocarboxipeptidasas.

REFERENCIAS

- Alvaro, G., R. Fernandez-Lafuente, et al. (1990). "Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*." Appl Biochem Biotechnol **26**(2): 181-95.
- Chen, C. C., S. S. Wang, et al. (1996). "Serum procarboxypeptidase B, amylase and lipase in chronic renal failure." J Gastroenterol Hepatol **11**(5): 496-9.
- Guisan, J. M., A. Bastida, et al. (1991). "Immobilization-stabilization of alpha-chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels." Biotechnol Bioeng **38**(10): 1144-52.
- Hass, G. M. and M. A. Hermodson (1981). "Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit." Biochemistry **20**(8): 2256-60.
- Hass, G. M., H. Nau, et al. (1975). "The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." Biochemistry **14**(6): 1334-42.
- Hopkins, A. L. and C. R. Groom (2002). "The druggable genome." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 727-30.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- M. Arroyoa, J. M. S.-M. a. J. V. S. (1998). "Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports." Progress in Biotechnology Volume 15.
- Montes, T., V. Grazu, et al. (2006). "Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers." Biomacromolecules **7**(11): 3052-8.
- Muller, C. A., S. Appelros, et al. (2002). "Serum levels of procarboxypeptidase B and its activation peptide in patients with acute pancreatitis and non-pancreatic diseases." Gut **51**(2): 229-35.
- Neuhoff, V., N. Arold, et al. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." Electrophoresis **9**(6): 255-62.
- Ryan, C. A., G. M. Hass, et al. (1974). "Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." J Biol Chem **249**(17): 5495-9.
- Soler, G., A. Bastida, et al. (1997). "Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents." Biochim Biophys Acta **1339**(1): 167-75.
- Vendrell, J., A. Guasch, et al. (1992). "Pancreatic procarboxypeptidases: their activation processes related to the structural features of the zymogens and activation segments." Biol Chem Hoppe Seyler **373**(7): 387-92.
- Vendrell, J., E. Querol, et al. (2000). "Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 284-98.
- Yust Mdel, M., J. Pedroche, et al. (2007). "Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from flavourzyme." J Agric Food Chem **55**(16): 6503-8.