

Tesis de grado:

José Sebastián Cisneros

Director:

Walter David Obregón

“Identificación de inhibidores peptídicos de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad *Millanegra* (papa andina)”.



INTRODUCCION

Corremos peligro...

Si nuestras variedades nativas no son conocidas y apreciadas, corremos el riesgo de desaparecer de los campos.
¡Consumenos, para que los agricultores nos sigan cultivando!



If our native varieties are not known and appreciated, we might disappear from the fields.
Eat us, so that farmers go on cultivating us!

We are in danger...

Redescubriendo las papas nativas de los Andes
www.papasandinas.org



Rediscovering native potatoes from the Andes
www.andeanpotatoes.org

1. Las proteasas

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

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

Se ha demostrado que las proteasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Por tal motivo también 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, el SIDA (Baltimore et al. 1998; Bartlett et al. 1998), el asma (Katz et al. 1998; Rice et al. 1998, Agusti et al. 1998; Mulligan et al. 2000), la malaria (Rosenthal et al. 1998; Dahlgren et al. 2003) y el mal de Alzheimer (Maccioni et al. 2001; Roberts et al. 2002).

El proceso proteolítico está involucrado en la movilización de proteínas tisulares, en la regulación del metabolismo de proteínas intracelulares y en el procesamiento de neuropéptidos y funciones neurales. Los inhibidores de proteasas, en cambio, controlan a las proteasas y son esenciales para la regulación fisiológica. Tales inhibidores de proteasas son pseudosustratos con afinidad hacia el sitio catalítico de las enzimas (Huber et al. 1993).

2. Los inhibidores de proteasas

Existe en la actualidad diversos compuestos que inhiben proteasas, entre ellos podemos destacar los de origen sintético obtenidos por síntesis química. Pero 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 idea de este trabajo es buscar esas moléculas que son parte fisiológica de un ser vivo y que

no ha sufrido ninguna transformación química o que no fue generada en ningún laboratorio de síntesis convencional.

2.1. Función general de los inhibidores de proteasas

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

2.2. Localización y función de inhibidores de proteasas en plantas

2.2.1. Localización en plantas

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

2.2.2. Función en plantas

El papel de los inhibidores en la regulación de las actividades proteolíticas es muy importante por la protección que proporcionan a tejidos y fluidos de la degradación

no deseada, desempeñando un papel importante en la defensa de las plantas. Los inhibidores de proteasas encontrados en plantas, generalmente contienen altos porcentajes de cisteína formando puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes a la desnaturalización por calor y pH extremos. La producción de estos inhibidores está altamente regulada por una ruta de transducción de señales que es iniciada por el ataque del patógeno y transducida como una respuesta de daño. En plantas, los IPs se acumulan durante la maduración de la semilla, y se ha argumentado que la maduración de semillas es un indicador de su función de defensa.

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

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

Por esto, podemos decir que los IPs son una de las más importantes clases de proteínas de defensa en las plantas. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos (De Leo et al. 2002). La inmunidad innata es una estrategia de defensa ancestral usada por organismos multicelulares para controlar la flora natural y combatir patógenos (Kim et al. 2009). Dentro de los inhibidores que están relacionados con la resistencia de las plantas a los patógenos se han observado elevados niveles de inhibidores de tripsina y quimotripsina. La síntesis de polipéptidos inhibitorios en respuesta a ataques por proteasas producidas por microorganismos patógenos fue observada por primera vez en tomates infectados por *Phytophthora infestans*, en el cual se encontraron niveles elevados inhibidores de tripsina y quimotripsina relacionados con la resistencia de las plantas al patógeno. Estudios posteriores mostraron que tubérculos de papas acumulan inhibidores proteicos

de serínproteasas de 20 a 24 kDa en respuesta a heridas mecánicas e infección por *P. infestans* (Kim et al. 2009).

La acumulación de los IPs es elicitada por varios tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, incluyendo heridas mecánicas, ataque de insectos, ataque de patógenos y/o exposición a radiaciones UV. Respecto al daño mecánico, los fragmentos de pectinas que son liberados de la pared celular de la planta, y los oligómeros de quitosanos derivados de la pared celular de hongos, se asume que actúan como inductores extracelulares de la ruta de señales que dirige a la expresión de genes de inhibidores de proteasas. Los polisacáridos inductores no parecen ser inmóviles en la planta, por lo que es probable que estas moléculas únicamente induzcan en forma local la expresión de genes de inhibidores de proteasas. La magnitud de respuesta de defensa es mucho mayor en plantas atacadas por insectos que en plantas dañadas mecánicamente.

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

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

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

2.3. Clasificación y familias donde abundan

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

Las proteínas solubles de papa (*Solanum tuberosum*) están compuestas principalmente de proteínas inhibidoras de proteasas (50% aprox.) y patatina (40% aprox.) Los inhibidores incluyen inhibidores de proteasas I y II (y otros inhibidores de

serín proteasas), inhibidores de proteasas aspárticas de papa, inhibidores de proteasas de tipo Kunitz, inhibidores de carboxipeptidasa de papa, inhibidores de proteasas cisteínicas de papa, y multicistatina de papa (PMC) (inhibidor de proteasas cisteínicas) (Nissen et al. 2009).

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

2.4. Clases de inhibidores de proteasas

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

2.4.1. *Inhibidores de cisteín proteasas*

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

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

2.4.2. *Inhibidores de aspartil proteasas*

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

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

2.4.3. *Inhibidores de serín proteasas*

Serpinas:

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

un papel clave en hemostasia, ya que incluso ligeras deficiencias pueden incrementar el riesgo trombótico.

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

Tipo Kunitz:

Los inhibidores tipo Kunitz son usualmente proteínas de alrededor de 20 kDa con 4 residuos de cisteína formando 2 puentes disulfuro intracatenarios y un sólo sitio activo que generalmente es un residuo de arginina localizado en alguno de los loops de la proteína. Este tipo de inhibidores son muy abundantes en las subfamilias de *Leguminoceae: Mimosoidae, Caesalpinoideae y Papilionoideae*. Algunos inhibidores tipo Kunitz aislados de la familia *Mimosiodae* están constituidos por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro (Batista et al. 1996; Lin et al. 1991; Negreiros et al. 1991; Oliva et al. 2000).

Tipo Bowman Birk:

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

Tripsina/Quimotripsina) (Gladysheva et al. 1994; Laskowski et al. 2000; Prakash et al. 1996; Qi et al. 2005)

2.4.4. Inhibidores de metaloproteasas

El mecanismo de inhibición de las metaloproteasas es variado, pero puede deberse al bloqueo del sitio activo, el cual se ha visto que llevan a cabo los inhibidores de metaloproteasas tisulares de tipo 1; o desplazando el agua activada mediante el aporte de un ligando metálico adicional, el cual ha sido observado en inhibidores de metaloproteasas de *Pseudomonas*. Algunos mecanismos de inhibición de inhibidores de proteasas son desconocidos pero se sabe que algunos poseen la particularidad de incluir puentes disulfuro que probablemente “enmascaran” el sitio activo de la proteasa (Rawlings).

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son endopeptidasas que son 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).

2.5. Aplicación y uso terapéutico

La diversidad y abundancia de IPs encontrada en vegetales los convierte en una excelente fuente para descubrir y obtener un gran número de moléculas líder que pueden ser analizadas para su posterior aplicabilidad en el área del desarrollo de nuevos fármacos. Se ha observado que los IPs de muchas plantas inhiben potencialmente el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas y fúngicas patógenas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el uso como compuestos principales para el desarrollo de numerosos agentes antimicrobianos (Kim et al. 2009). Cocktels de inhibidores de proteasas son adicionados rutinariamente en muestras clínicas para ser usados en estudios proteómicos para inactivar proteasas (Liu et al.). Es por ello que también los IPs tienen un gran interés para su potencial uso farmacológico en el tratamiento de enfermedades tales como cáncer (Jedinak et al. 2005), infecciones parasitarias, fúngicas y virales (Dalton et al. 1997), malaria (Dahlgren et al. 2003), candidiasis (Abad-Zapatero et al. 1998), SIDA (Patick et al. 1998), hepatitis (Lin et al. 2004), herpes (De Clercq 2004), afecciones inflamatorias (Bilfinger et al. 2002) y respiratorias (Cataldo et

al. 2003; Hugli 1996), cardiovasculares (Boos 2004), coagulopatías (Gladwell 2002) y la enfermedad de Alzheimer (Vassar et al. 1999).

La utilización de inhibidores de proteasas en el tratamiento contra el cáncer comenzó como estudios epidemiológicos en donde se podía observar que en las poblaciones vegetarianas alimentadas con leguminosas la incidencia de cáncer de mamas, colon y próstata era marcadamente menor (Fontham et al. 1993), lo que luego abrió el camino para nuevos estudios en los que se utilizaban inhibidores extraídos de dichas especies vegetales.

Muchos estudios han comprobado que estos inhibidores tienen propiedades supresoras sobre diferentes etapas de distintos tipos de cáncer. El tratamiento con el inhibidor de tripsina y quimotripsina a células irradiadas con rayos X ha disminuido claramente la transformación de las células por esta radiación con respecto a los controles (Yavelow et al. 1985).

Distintos estudios con células cancerosas indicaron que los inhibidores actúan sobre diferentes proteasas serínicas que están implicadas en las cadenas de señalización de este tipo de células (Billings et al. 1992; Gueven et al. 1998; Habres et al. 1992). A partir de estos trabajos han aparecido muchos otros acerca de las implicancias de los inhibidores de proteasas en los tratamientos contra cáncer.

Por otra parte, otro tipo de aplicación potencial de los inhibidores de proteasas podría ser su utilización para una mejor protección de los cultivos, que se consigue utilizando combinaciones de inhibidores, como se ha visto con los inhibidores de proteasas de tipo I y II de la papa, producidos por plantas solanáceas como un mecanismo de defensa contra insectos y microbios. (Dunse et al.).

2.6. Investigación de inhibidores para estudios moleculares

Los inhibidores de proteasas no sólo pueden ser utilizados para tratamientos o para la investigación de terapias contra enfermedades, sino que son muy importantes en el estudio molecular de distintos procesos biológicos que implican actividades de proteasas. La inhibición de algún paso de estos procesos por los IPs puede dar mucha información respecto a los mismos.

Las bases bioquímicas de las actividades antiproteolíticas y antimicrobianas de los inhibidores de proteasas y la elucidación de la relación función-estructura de su actividad resultan esenciales para el estudio mecánico de su acción bifuncional. Se encontró que algunos inhibidores de proteasas reducidos no poseen actividad

antiproteolítica o actividad antimicrobiana, lo cual indica que son dímeros en solución. Estos resultados indican que los cambios estructurales sobre los enlaces disulfuro en los inhibidores de proteasas podrían inducir la pérdida de ambas actividades antiproteolítica y antimicrobiana. Estudiando las respuestas de defensa de la planta y desarrollando estrategias amigables con el ecosistema más nuevas para la protección de las plantas contra plagas y patógenos es actualmente una de las áreas más dinámicas de la investigación en la ciencia de las plantas (Kim et al. 2009).

La introducción del inhibidor de proteinasa de papa II a *Nicotiana tabacum* confirmó que la secuencia señal aminoterminal es removida y el inhibidor se acumula como una proteína del tamaño esperado (21 kDa). También, se identificó un péptido de aproximadamente 5.4 kDa como un producto foráneo del gen en las plantas transgénicas de tabaco. Esto indica que algunos péptidos son derivados *in vivo* del procesamiento pos-traduccionales de IPs (McManus et al. 1994)

Otra propiedad importante de los inhibidores es la presencia de diferentes dominios. En la familia de IPs de papa tipo II se han identificado seis dominios que inhiben las proteasas digestivas de varias especies de insectos, es probable que la ventaja de producir IPs con precursores multidominios sea la inhibición eficiente de una gran cantidad de proteínas en un período de tiempo relativamente corto (Miller et al. 2000).

Recientemente, se identificó la secuencia responsable del efecto tóxico del inhibidor de tripsina de *Bauhinia rufa* (BrTI) contra *C. maculatus*, que corresponde al motivo RGE. Lo cual sugiere que otro atributo de los IPs de plantas es la presencia de motivos funcionales que pueden inducir diversas señales de defensa (Sumikawa et al.).

2.7. Tecnologías para la purificación de inhibidores

Se han aislado inhibidores de proteasas mediante cromatografías de afinidad e intercambio iónico, confirmando dicha purificación y peso molecular con electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Usándose en algunos casos estos inhibidores purificados como ligandos de afinidad para la purificación de cualquier tipo de proteasas, comerciales o no (Saxena et al.).

Usualmente, la purificación de proteínas (péptidos) antimicrobianas con la actividad de inhibidores de proteasas es lograda de manera exitosa con extracción con sales, ultracentrifugación y cromatografía en fase reversa C(18) (Kim et al. 2009).

Se han purificado inhibidores de serín proteasas por medio de HPLC y HPLC en fase reversa (Yanes et al. 2005).

También se ha conseguido aislar parcialmente inhibidores sometiendo extractos crudos a temperaturas mayores a 37 °C (80 °C por ejemplo) por varios minutos, debido a que los mismos son resistentes a estas temperaturas y se mantienen en solución; a diferencia de muchas otras proteínas. Luego, se puede proceder a seguir purificando el sobrenadante pasando el mismo por columnas de exclusión molecular (Miyaji et al. 2007).

MATERIALES Y

METODOS



1) Material vegetal

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie *andigenum* variedad imillanegra, provenientes de la provincia de Jujuy, sobre la quebrada de humahuaca, Cordillera de los Andes, Argentina.

El nombre común de estas especies es de “papas andinas”, y es muy común su cultivo en estas zonas geográficas. *S. tuberosum* es

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

Las hojas son compuestas, con 7 a 9 foliolos, de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos. Presentan tres tipos de tallos, uno aéreo, circular o angular en sección transversal, sobre el cual se disponen las hojas compuestas y dos tipos de tallos subterráneos: los rizomas y los tubérculos (Faiguenbaum; “Biología de Cultivos Anuales, Papa. Sistema caulinar” 1988.).

El tubérculo es el tipo de tallo de la papa que es subterráneo y se halla engrosado como una adaptación para funcionar como órgano de almacenamiento de nutrientes. Los rizomas presentan una zona meristemática sub-apical, de donde se originan los tubérculos mediante un engrosamiento radial, producto del alargamiento de las células

parenquimáticas y la pérdida de la polaridad de las mismas. Durante la formación del tubérculo, el crecimiento longitudinal del estolón se detiene y las células parenquimáticas de la corteza, de la médula y de regiones perimedulares sufren divisiones y alargamiento. En tubérculos maduros, existen pocos elementos conductores y no hay un cámbium vascular continuo. Los tubérculos están cubiertos por una exodermis que aparece al romperse la epidermis que va engrosándose con el tiempo.



Sobre su superficie existen "ojos", hundimientos para resguardar las yemas vegetativas que originan los tallos, que están dispuestos de forma helicoidal. Además, hay orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas. Las lenticelas son circulares y el número de las mismas varía por unidad de superficie, tamaño del tubérculo y condiciones ambientales (Xin, E. et. al. 1998). Los tubérculos, en definitiva, están constituidos externamente por la peridermis, las lenticelas, los nudos, las yemas y, eventualmente, por un fragmento o una cicatriz proveniente de la unión con el rizoma del cual se originaron; internamente se distingue la corteza, el parénquima vascular de reserva, el anillo vascular y el tejido medular. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga; su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo (Faugenbaum; "Biología de Cultivos Anuales, Papa. Tubérculo" 1988.).



2) Preparación del extracto crudo

Los tubérculos de las papas fueron pelados estando los mismos congelados, luego lavados con agua destilada muy fría, y finalmente cortados para ser procesarlos posteriormente en frío. El extracto crudo se obtuvo de distintas maneras que se explican a continuación:

- a) Se mezclaron las papas procesadas (aproximadamente 125 gr) con buffer Tris-HCl 0,1 M de pH = 7,2, y se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 min en la heladera, el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se procedió a centrifugar a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en eppendorfs para almacenarse a -80 °C.
- b) Se mezclaron aproximadamente 125 gr de papas con ácido ascórbico a razón de 4 gr por Kgr de papa para prevenir la oxidación de polifenoles, y luego buffer Tris-HCl 0,1 M de pH = 7,2 bien frío. Luego se procedió a la sedimentación del

- almidón mediante incubación por 30 min en la heladera, el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se procedió a centrifugar a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en eppendorfs para su almacenamiento a 80 °C.
- c) Se mezclaron aproximadamente 125 gr de papas con PVP (1,5 %) y ácido ascórbico a razón de 4 gr por Kgr de papa para prevenir la oxidación de polifenoles, y luego buffer Tris-HCl 0,1 M de pH = 7,2 bien frío. Se procedió a sedimentar el almidón mediante incubación por 30 min en la heladera, el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se centrifugó a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en eppendorfs para su almacenamiento a -80 °C.
- d) Se mezclaron aproximadamente 125 gr de papas con PVP (1,5 %) y ditioneitol (DTT) a una concentración de 0,2 mM para prevenir la oxidación de polifenoles, y luego buffer Tris-HCl 0,1 M de pH = 7,2 bien frío. Se sedimentó el almidón mediante incubación durante 30 min en la heladera y el respectivo sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se procedió a centrifugar a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Por último se recogió el sobrenadante en eppendorfs para su almacenamiento a -80 °C.
- e) Se mezclaron las papas procesadas (aproximadamente 125,57 gr) con ditioneitol (DTT) a una concentración de 0,2 mM para prevenir la oxidación de polifenoles y luego con agua bien fría. Se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 min en la heladera y el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50 ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se procedió a centrifugar a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en eppendorfs para su almacenamiento a -80 °C.
- f) Se mezclaron 125,57 g de papas peladas y cortadas con ditioneitol (DTT), a una concentración de 0,2mM para prevenir la oxidación de polifenoles, con agua bien fría. Se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 min en la heladera, el sobrenadante fue centrifugado a 5000 rpm por 60 min. a 4 °C en tubos de muestra de 50ml. Luego se trasvasaron los sobrenadantes a eppendorfs y se procedió a centrifugar a 11000 rpm por 60 min. a 4 °C. Se recogió el

sobrenadante para luego proceder a filtrarlo con filtro de Orange Sci PES de 0,2 μm con jeringa BD Plastipak de 1 ml. Se recogió el sobrenadante en eppendorfs para su almacenamiento en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

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

Macrométodo:

Reactivo de Bradford.....2500 μl

Muestra.....50 μl .

Micrométodo:

Reactivo de Bradford.....2000 μl

Muestra.....150 μl .

Se realizó el blanco correspondiente utilizando el reactivo de Bradford.

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

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

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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se siguieron dos procesos para poner en evidencia la inhibición, sin preincubación y con una preincubación de 15 minutos de la muestra y enzima.

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

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

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

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

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor)	100 μ l
Solución de enzima	100 μ l
Buffer de reacción	750 μ l
Solución de sustrato	50 μ l

Determinación de actividad inhibitoria de papaína:

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

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

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

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

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

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor)	100 μ l
Solución de enzima	100 μ l
Buffer de reacción	750 μ l
Solución de sustrato	50 μ l

Determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA):

La actividad fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm mediante medidas continuas durante 120 seg a 37 °C. La inhibición causó disminución en la

velocidad de hidrólisis del sustrato, lo cual se tradujo en la atenuación de la pendiente de la señal registrada.

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

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

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

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

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor)	100 μ l
Solución de enzima	100 μ l
Buffer de reacción	750 μ l
Solución de sustrato	50 μ l

Determinación de actividad inhibitoria de subtilisina:

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

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

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

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

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

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Protocolo utilizado:

Muestra (inhibidor)	100 μ l
Solución de enzima	100 μ l
Buffer de reacción	750 μ l
Solución de sustrato	50 μ l

5) Liofilización

Proceso que consistió en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Fue por lo tanto, el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtuvo un producto seco, esponjoso mejorando su estabilidad y fue fácilmente redisolto en agua. Se realizó a temperaturas inferiores a la de solidificación total, o sea, el producto debió 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 colocó el producto en un contenedor o cámara hermética y se procedió a realizar vacío en la misma hasta que alcanzó 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 comenzó a suministrar el calor necesario para la sublimación del hielo. Los vapores producidos en la sublimación fueron retenidos en un condensador que se encontraba a una temperatura inferior a la del producto congelado. Cuando todo el hielo fue eliminado, se dice que el secado primario fue terminado. El secado secundario o desorción se realizó para eliminar las últimas trazas de agua ligada al producto, esta etapa requirió de un alto vacío y de calefacción a la temperatura máxima que admitía el mismo sin desnaturalizarse. Finalizado el proceso el producto debió almacenarse en un contenedor hermético ya que por su estado era ávido de captar humedad ambiente.

Ventajas de la técnica de liofilización:

- La temperatura a la que fue sometida el producto, estaba por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
- Debido a la baja temperatura que a la que se operó, la pérdida de los constituyentes volátiles fue mínima, se redujo el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufrieron alteraciones.
- Se eliminaron los fenómenos de oxidación, dado que se operó y envasó a alto vacío.
- La gran porosidad del producto facilitó con rapidez la reconstitución por la adición de agua o del solvente adecuado.

- Al haber sido despreciable la humedad remanente, el producto pudo ser almacenado por tiempo ilimitado, constituyendo productos de larga estabilidad.

6) Metodologías de purificación

6.a) Tratamiento térmico al extracto crudo

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuros, ésta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas.

Las muestras fueron tratadas térmicamente. Se calentaron las muestras a 60, 70, 80 y 90 °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.

A cada uno de los sobrenantes obtenidos se les hizo determinación de actividad inhibitoria.

6.b) Cromatografía de afinidad utilizando tripsina inmovilizada

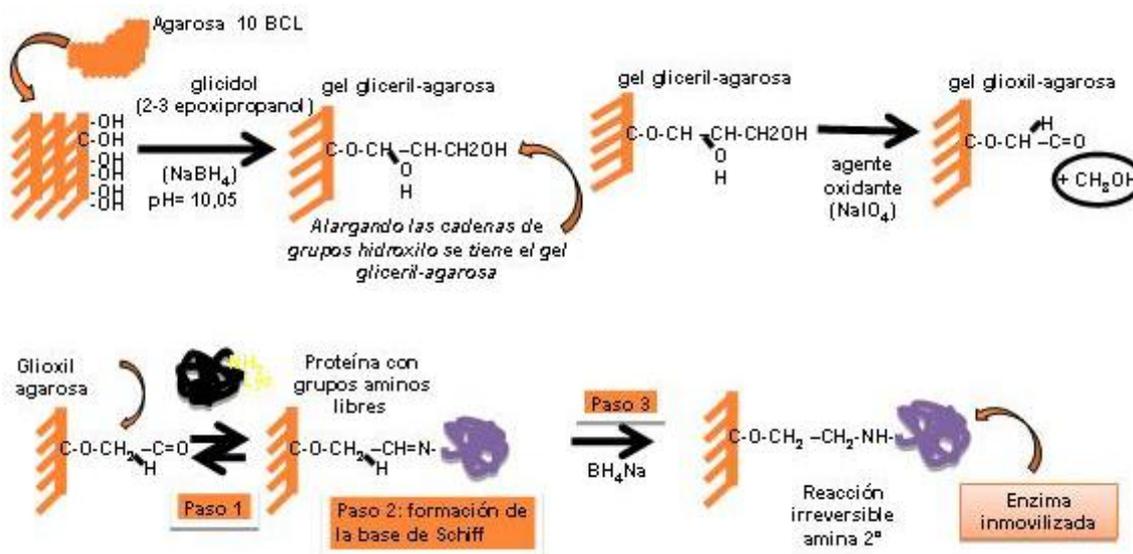
6.b.1) *Inmovilización sobre gel de agarosa:*

El soporte utilizado para la inmovilización de la enzima comercial tripsina fue agarosa 4 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado por la adición de grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoacídicos de la enzima, utilizando el protocolo de activación de Guisán *et al.*, (1997).

Se preparó una solución de agarosa a la cual se le adicionó una solución de NaOH y NaBH₄ y luego se agregó glicidol gota a gota. De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel con NaIO₄ para oxidar a los grupos alcoholes a aldehído formándose finalmente el gel de glioxil-agarosa. Por último, se lavó el gel con abundante agua destilada dejándolo listo para la inmovilización enzimática.

La inmovilización se realizó a 4° C, pH: 10, con bicarbonato de sodio 100 mM, glicerina al 25 % (v/v) y NaBH₄ para reducir los grupos aldehídos libres. La tripsina se adicionó en una relación de 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml y en presencia de un inhibidor reversible (benzamidina). En el proceso de inmovilización el uso de un inhibidor reversible se justifica debido a que tiene un efecto de protección durante estos procesos de multi-interacción; ya que en ausencia de

inhibidor las enzimas insolubilizadas pierden un importante porcentaje de actividad catalítica (Obregón *et al.* 2001). En la siguiente figura se muestra un esquema que describe la técnica empleada.



Luego el gel se lava con abundante agua destilada y se seca por filtrado en vacío. 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.b.2) Verificación de la actividad de la tripsina inmovilizada

Se realizó una prueba de actividad enzimática de la tripsina inmovilizada en glioxil-agarosa (la cual se convirtió en el relleno de la columna de afinidad) con el protocolo de actividad de tripsina con BAPNA. Se realizaron medidas a 410 nm a 37 °C durante 300 segundos. La medida de la tripsina inmovilizada se hizo con una punta de espátula de la misma. Se agregaba en la cubeta 1,6 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂·2H₂O 50 mM, pH: 7,2 y se utilizó como sustrato 40 µl de BAPNA 10 mM. Una vez que se verificó que el relleno es activo se procedió a evaluar si la muestra (extracto crudo de Imillanegra) poseía actividad inhibitoria sobre el inmovilizado de tripsina.

Se incubó la enzima inmovilizada con el sustrato en buffer de reacción hasta que la lectura de la absorbancia se mantuvo con una pendiente constante (se mantenía una concentración de sustrato saturante). Luego se agregó *in situ* 50 µl de muestra y se

observó si la pendiente se mantenía constante o iba disminuyendo hasta caer a cero. Cuando la pendiente caía a cero, se comprobaba entonces que la muestra inhibía la proteasa inmovilizada, por lo tanto, ese relleno pudo ser utilizado posteriormente para ensayos de cromatografía de afinidad.

También el ensayo se pudo hacer por incubación previa de la tripsina inmovilizada junto con la muestra, y luego se agregó a lo último el sustrato, de esta manera si no se observaba aumento de absorbancia significaba que el extracto inhibía a la proteasa inmovilizada.

6.b.3) Purificación a baja escala empleando microcolumnas de tripsina-agarosa

Se realizó una micropurificación empleando como soportes pequeños tubos de plástico adaptados, con entrada superior y salida de líquido inferior regulable, de una capacidad de alrededor de 200 μ l (Empty spin column SP-25, Agarose Beads Technologies) El problema de este tipo de columnas es que la muestra que se sembraba tenía que estar límpida y sin partículas debido a que se tapaba fácilmente, debido a esto el extracto crudo fue clarificado por centrifugación durante 60 minutos a 14000 rpm. La separación constó de 5 pasos: lavado de la columna con 50 μ l buffer de reacción (Tris-HCl 0,1 M; CaCl_2 50 mM; pH: 7,2) para equilibrado de la misma, sembrado de 50 μ l de EC, lavado de la columna con buffer de reacción para provocar la salida de partículas no retenidas en la columna, y elución con solución de HCl 1 M a pH: 3 que lograba la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor.

6.b.4) Purificación a mayor escala

Para la purificación a mayor escala del inhibidor de tripsina se utilizaron columnas más grandes con capacidades desde 2 ml hasta 15 ml de relleno dependiendo el sistema elegido. Los sistemas de separación fueron dos, ambos utilizaban distintos dispositivos para el proceso cromatográfico, el primero fue un sistema de bombas peristálticas a presión normal, y el segundo un equipo ÄKTA purifier. En ambos casos el seguimiento de la cromatografía de afinidad fue realizada también en 5 pasos tal como se describió en el inciso anterior.

6.b.5) Cromatografía de afinidad a presión normal a mayor escala

Se empleó un dispositivo que emplea bombas peristálticas para regular la presión de salida y de siembra de la columna. Una bomba peristáltica es un tipo de

bomba de desplazamiento positivo usada para bombear una variedad de fluidos. El fluido es contenido dentro de un tubo flexible empotrado dentro de una cubierta circular de la bomba (aunque se han hecho bombas peristálticas lineales). Un rotor con un número de 'rodillos', 'zapatas' o 'limpiadores' unidos a la circunferencia externa comprimen el tubo flexible. Mientras que el rotor da vuelta, la parte del tubo bajo compresión se cierra (o se ocluye) forzando, de esta manera, el fluido a ser bombeado para moverse a través del tubo. Adicionalmente, mientras el tubo se vuelve a abrir a su estado natural después del paso de la leva ('restitución'), el flujo del fluido es inducido a la bomba. Este proceso es llamado peristalsis.

Ventajas: Debido a que la única parte de la bomba en contacto con el fluido que es bombeado es el interior del tubo, las superficies internas de la bomba son fáciles de esterilizar y limpiar. Además, puesto que no hay partes móviles en contacto con el líquido, las bombas peristálticas son baratas de fabricar. Su carencia de válvulas, de sellos y de arandelas, y el uso de mangueras o tubos, hace que tengan un mantenimiento relativamente de bajo costo comparado a otros tipos de bombas.

Una vez terminados los ensayos preliminares se armó una columna que tenía como relleno la tripsina inmovilizada. Se lavó una columna de 10 ml con etanol al 20%. Luego, se limpió esta columna que contenía el relleno de tripsina inmovilizada, con buffer de HCl de pH: 3 (2 volúmenes de columna) hasta que la absorbancia fue casi cero. Después se procedió a pasar buffer Tris-HCl 0,1 M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH: 7,2. Estos pasos se volvieron a repetir para asegurarnos que no hubiera ningún contaminante en el procedimiento.

El problema de este tipo de columnas es que la muestra que se siembra tiene que estar límpida y sin partículas debido a que se tapa fácilmente, debido a esto, la muestra fue clarificada por centrifugación durante 60 minutos a 10000 rpm. A 50 ml de muestra clarificada se la diluyó con buffer de reacción de tripsina (Tris-HCl 0,1 M; CaCl_2 50 mM; pH: 7,2) hasta 250 ml para disminuir lo mayor posible la densidad de la muestra a pasar por la columna. Estos 250 ml fueron pasados 2 veces a 0,5 ml/min por la columna para que la muestra corra y esté en contacto con la tripsina inmovilizada en óptimas condiciones para su interacción, y luego se lavó la misma con buffer de reacción de tripsina juntando el no retenido y midiendo la absorbancia a 280 nm hasta llegar a 0 (de modo que las demás proteínas ya no se encuentren en la columna), momento en el cual se eluye el retenido con HCl a pH: 3 para lograr la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor (suponiendo que ahora salió todo el inhibidor de tripsina acumulado

en la columna). Finalmente para guardar el relleno se vuelve a pasar el buffer de pH 7,2 por la columna. Cada salida de la columna era en tubos de 2 ml. Las muestras con absorbancias consideradas importantes, salidas con el buffer de pH: 3, se neutralizaban a pH 7 u 8 para estabilizar la estructura proteica del supuesto inhibidor.

6.b.6) Cromatografía de afinidad automatizada empleando un equipo ÄKTA purifier

La cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC), es una forma de cromatografía líquida similar a la cromatografía líquida de alta presión que se utiliza para separar o para purificar las proteínas de mezclas complejas. El sistema de FPLC es un sistema completo para las separaciones cromatográficas de la escala de laboratorio de proteínas y de otras biomoléculas. El nombre de cromatografía líquida hace referencia a la fase móvil líquida. Mientras que la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. FPLC es un tipo de cromatografía líquida donde las velocidades de los solventes son controladas por las bombas para controlar el flujo constante de los mismos.

Para ello se utilizó un equipo de separación ÄKTA purifier de General Electric Company, que permite hacer corridas FPLC de tipo intercambio iónico, filtración en gel, etc.

El sistema incluye una bomba P-901 capaz de proporcionar flujos de 0.01-100 ml/min hasta una presión máxima de 10 MPa (1450 psi). Además incluye un mezclador de gradiente M-925 con una cámara de 2 ml capaz de utilizar dos tampones simultáneamente hasta flujos de 30 ml/min. La inyección de la muestra se realiza mediante un módulo INV-907 que permite emplear "loops" o lazos de diferentes volúmenes o utilizar una bomba P-960 para la carga de volúmenes grandes de muestra capaz de alcanzar flujos de hasta 50 ml/min a presiones de hasta 2 MPa (290 psi).

Para el control de la separación cromatográfica el sistema incluye un módulo de detección de absorbancia UV-900 capaz de monitorizar hasta 3 longitudes de onda simultáneamente en el rango 190-700 nm, junto con un módulo pH/C-900 que incluye un detector de conductividad y una sonda de pH que permiten controlar los gradientes de solventes empleados. A continuación una válvula de separación PV-908 permite la separación de productos de desecho o la recolección de fracciones mediante un colector de fracciones Frac-900. El sistema es compatible con todo tipo de columnas con conexiones Valco 1/16" o aquellas otras para las que se disponga de adaptadores para este estándar, incluyendo las columnas Tricorn, HiTrap, HiPrep, HiLoad, RESOURCE,

etc. El funcionamiento del equipo se controla mediante una computadora utilizando el programa UNICORN que permite controlar todos los aspectos del proceso cromatográfico, desde el solvente empleado y la inyección de la muestra hasta la recolección de fracciones, además de registrar y almacenar todos los datos e incidencias que se pudieron haber dado a lo largo de cada separación, lo que permite un mayor control de los resultados obtenidos (AKTA design Purification Method Handbook. Amersham Biosciences).

Se realizó una cromatografía de afinidad con tripsina inmovilizada en agarosa. El extracto crudo fue clarificado por centrifugación durante 60 minutos a 13000 rpm y a 4°C. 20 ml de este extracto crudo clarificado fueron concentrados por liofilización parcial hasta volumen final de 2 ml, y posteriormente sembrado en el AKTA y eluidos a una velocidad de 1 ml/min por la columna. Luego se lavó la misma con buffer de reacción de tripsina (Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂.H₂O 50 mM y pH 7,2) juntando el no retenido y midiendo la absorbancia a 280 nm hasta llegar a 0, momento en el cual se eluye el retenido con HCl pH: 3 para lograr la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor y se recolectó en fracciones de 2 ml.

Por último la columna se lavó con Tris-HCl 0,1M, CaCl₂.H₂O 50 mM y pH 7,2 y se guardó para posteriores usos. Posteriormente se le verificó la actividad inhibitoria y la concentración de proteínas.

7) Caracterización proteica

7.a) Electroforesis

Protocolo de alta resolución con tris-tricina (AR SDS-Tricina-PAGE)

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina (Laemmli 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T¹ y 3% C²), 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.

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

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

Preparación de las muestras

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

Buffer de muestra 6X:

Tris	9,42 gr
SDS	12,00 gr
Mercaptoetanol	30,00 ml
Glicerol	48,00 ml
Azul de bromofenol	12,00 mgr
Se llevó a pH: 6,8 con HCl 1 M	
AD, c.s.p.	100 ml

Preparación de los geles

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

Buffer del gel:

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

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

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

Gel de resolución (16,5%T, 3%C):

Acril-Bis (49,5:3)	3,300 ml
Buffer del gel	3,300 ml
AD	3,400 ml
PSA 10 %	0,040 ml
TEMED	0,007 ml

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

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

Buffer Anódico 2 M:

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

Buffer Catódico 1 M:

Tris	12,1 gr
Tricina 0,1 M	17,9 gr
SDS 0,1 %	1,0 gr
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.

Fijación y Tinción

Tinción con Coomasie Brilliant Blue R-250:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados 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. Los péptidos no se fijan completamente, pueden difundir si no se respetan los tiempos.

Solución fijadora:

Acido acético glacial	100 ml
Metanol	400 ml
AD, c.s.p	1000 ml

Solución colorante:

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

Solución decolorante:

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

Tinción con Coomassie Coloidal:

La tinción de proteínas por éste método (Neuhoff et al. 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng (permite detectar al cabo de una hora cantidades menores a 100 ng de seroalbúmina bovina). Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metanólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (*background*) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel.

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo.

Solución colorante:

Sulfato de amonio	17,0 gr
Acido acético glacial	0,5 ml
Metanol	34,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 gr

AD, c.s.p.

100 ml

Para la determinación de los pesos moleculares de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas patrones de bajo peso molecular (14.3 Kda, 20.1 Kda, 30 Kda, 45 Kda, 66 Kda y 97 Kda, Protein Molecular Weight Markers, GE Healthcare) y otra de patrones peptídicos (16,9 Kda; 14,4 Kda; 10,7 Kda; 8,2 Kda; 6,2 Kda y 2,5 Kda, Peptide Marker Kit GE Horse myoglobin peptides) . La determinación de los valores de PM se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los log del PM de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés.

7.b) Isoelectroenfoque

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

Preparación de las muestras

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

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

Preparación de los geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el

vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Solución de poliacrilamida al 5%:

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

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

Reactivos de polimerización:

Riboflavina (sol. saturada)	100 μ l
TEMED	5 μ l
PSA al 10 %	70 μ l

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

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

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

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

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

Fijación y Coloración

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

Solución fijadora:

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

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

Solución colorante:

CuSO ₄ (se disolvió primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie brilliant blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante I:

Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante II:

Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Estimación de los pI

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

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

7.c) Coloración de los geles de ELF e IEF con plata

En los casos en que fue necesario se coloreó mediante la tinción de plata, que alcanza una sensibilidad hasta 100 veces mayor que la tinción de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Hames, 1996).

Para realizar esta coloración se siguió el método de Burdick y Stults (Burdick et al. 1997), basado en la unión de los iones plata a las proteínas y su posterior reducción; la propiedad del tiosulfato de formar complejos solubles de plata permite eliminar luego el “background” producido por precipitación de sales insolubles.

Para IEF se fija con fijadora de IEF y se lava con solución de MeOH-TCA (30%-12%) en agua milli Q como paso previo al protocolo de tinción.

Fijación

Las proteínas fueron fijadas por inmersión de los geles en solución fijadora durante 60 min, este procedimiento previene la difusión de las proteínas y remueve sustancias interferentes.

Solución fijadora:

Acido acético glacial	12 ml
Metanol	50 ml
Formaldehído 37 %	0,05 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Lavado y Sensibilización de los Geles

Luego de la fijación, los geles fueron lavados con etanol al 30% (3 veces de 20 min c/u) y luego con AD (10 min) para eliminar el ácido acético, cuya acidez interfiere en la siguiente etapa. Posteriormente y con el fin de sensibilizarlos fueron sumergidos en una solución de tiosulfato de sodio (0,2 g/l), denominada solución de pretratamiento, durante un minuto. El exceso de tiosulfato fue removido mediante dos lavados sucesivos con AD.

Tratamiento con Plata

Los geles previamente sensibilizados fueron sumergidos en una solución de AgNO_3 (2,0 g/l) se mantuvieron en oscuridad durante 20 min. Posteriormente fueron lavados con AD 3 veces durante 20 segundos cada vez, para remover el AgNO_3 en exceso.

Solución de plata:

Nitrato de plata	0,2 gr
Formaldehído 37 %	0,1 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Desarrollo de la Coloración

Los geles se sumergieron en la solución de desarrollo entre 30 segundos y 2 minutos hasta que no se observó la aparición de nuevas bandas, evitando la sobrecoloración del gel por depósito de precipitados de AgS. La reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de “stopping” durante 10 min.

Solución desarrolladora:

Na_2CO_3 anhidro	2 gr
Solución de pretratamiento	1 ml
Formaldehído 37%	0,075 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Solución de “stopping”:

Acido acético	12 ml
Metanol	10 ml
AD, c.s.p.	00 ml

8) Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas MALDI-TOF descrita inicialmente por Hillenkamp (Hillenkamp et al. 1990) es una técnica precisa y muy sensible para la determinación de masas moleculares de hasta 200000 Da. La técnica consiste en mezclar la muestra a ser determinada con una matriz, la cual es introducida al espectrómetro e irradiada con un láser pulsátil al máximo de absorción de la matriz. La interacción de los fotones con la matriz y la muestra resulta en la formación de iones intactos relacionados con la masa molecular de la muestra, que en nuestro caso es una proteína. Este mecanismo acoplado con un espectrómetro de masas TOF permite calcular las masas de la muestra basado en el tiempo que tarda el ión formado en recorrer la distancia entre el lugar de formación del ión y el detector. El cuadrado de este tiempo es proporcional a la masa del ión e inversamente proporcional a la carga del mismo. Esta técnica tiene una sensibilidad demostrada de detectar masas de hasta 200000 Da de muestras de apenas 5 pmol.

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

m= masa molecular

z= carga de la molécula

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

9) Métodos Proteómicos

9.a) Intensity Fading

Intensity Fading (IF) por MALDI-TOF/MS

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

El método fue desarrollado para identificar inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs) a partir de mezclas naturales complejas mediante su capacidad de interacción con

las proteasas que inhibe. La formación del complejo se detecta mediante la atenuación total o parcial de la intensidad iónica molecular de una proteína, después de adicionar su contraparte molecular, cuando se compara con un espectro de masas control de la muestra inicial. Una variante desarrollada posteriormente, incluye una etapa de afinidad con la proteasa inmovilizada en micropartículas poliméricas. El inhibidor retenido en la micropartícula puede ser eluído 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 eluída, corrobora la presencia de una molécula capaz de interactuar con la proteasa inmovilizada y descarta la posibilidad de interacciones inespecíficas. Esta metodología ha permitido identificar IPP en extractos heterogéneos que fueron posteriormente purificados y caracterizados por métodos convencionales.

Desalado de extractivos

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

Condiciones experimentales para IF MALDI-TOF MS

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

La técnica abarca actualmente dos tipos de métodos de análisis:

Método directo: En el cual el complejo proteína-ligando es directamente desorbido e ionizado por espectrometría de masas MALDI (Villanueva *et al.* 2003; Yanes *et al.* 2007)

Método indirecto: La muestra fue sometida (previamente al análisis por MALDI-TOF/MS) a una cromatografía de afinidad usando enzimas inmovilizadas en resinas tales como agarosa 10 BCL activada con glicidol (Guisán, Penzol et al 1997) y Sepharose® 4B activada con CNBr (Yanes et al. 2007). El procedimiento adecuado indica en primera instancia, analizar los extractos desalados por MALDI-TOF/MS a fin de obtener un espectro de masas control. Luego, los extractos fueron sometidos a una cromatografía de afinidad con proteasas inmovilizadas, el material proveniente del lavado fue sometido a un nuevo análisis de MALDI-TOF y las fracciones que tenían señales diferentes o desaparición de señales fueron consideradas para los posteriores experimentos. Luego se eluyó con ácido fórmico 1% y esas muestras fueron analizadas también por MALDI-TOF para verificar la presencia del inhibidor que se había unido a la matriz (Yanes et al. 2005).

9.b) Huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint)

La huella peptídica o Peptide mass fingerprint (PMF) es una técnica analítica para la identificación de proteínas. Un aspecto clave para el PMF es que el genoma del organismo debe ser conocido y estar disponible. Brevemente, la proteína de interés desconocida es cortada en péptidos por una enzima (una de las mas usadas es la tripsina) que no crea muchos péptidos. La masa absoluta (todavía sin saberse) de estos péptidos es determinada por espectrometría de masas (por ejemplo, MALDI-TOF). La gran ventaja de este método para la identificación de proteínas es que sólo se debe saber las masas de los péptidos. El principal inconveniente es que la auténtica secuencia proteica (u homóloga cercana) debe estar presente en las bases de datos disponibles.

9.b.1) *Digestión triptica*

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas por tinción de los geles de acuerdo al método de Coomassie coloidal. Las bandas seleccionadas fueron cortadas, lavadas con agua milli Q y acetonitrilo varias veces para remover el colorante y secadas en vacío. Los fragmentos del gel fueron cubiertos por una solución de NH_4HCO_3 100 mM conteniendo DTT 10 mM por 30 min a 37 °C, luego fueron centrifugadas y lavadas con acetonitrilo por 5 min. Los fragmentos fueron incubados en una solución de NH_4HCO_3 100 mM conteniendo iodoacetamida 50 mM por 20 min a temperatura ambiente y oscuridad, y lavados con agua milli Q y acetonitrilo alternativamente. La digestión triptica fue lograda usando buffer NH_4HCO_3 100 mM

pH: 8,5 conteniendo tripsina (4ng/μl) por 12 hs a 37 °C. Los péptidos resultantes fueron recuperados por extracción con acetonitrilo al 50 % (v/v) y luego secados en un SpeedVac, redisolventes en TFA al 0,1 % (v/v).

9.b.2) PMF por MALDI-TOF/MS

Los péptidos, productos de la digestión triptica, fueron sembrados en una placa ground steel MP 384 utilizando como matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-HCCA) y fueron analizados por MALDI-TOF/MS. La identificación del mapa triptico se intentó obtener usando el programa Mascot tool (<http://www.matrixscience.com>) según los siguientes parámetros de búsqueda: (1) Tipo de búsqueda, Peptide mass Fingerprint; (2) Enzima, tripsina; (3) Base de datos, SwissProt 55.2; (4) Taxonomía, Viridiplantae; (5) Modificaciones variables, Metilcarbamida (C), Oxidación (M); (6) Valores de masas, monoisotópico; (7) Peso de la Proteína, 24 kDa; (8) Tolerancia del peso de la proteína, \pm 1000 ppm; (9) Carga de la proteína, +1. Valor de probabilístico de MOWse: El valor de la proteína es $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad que el apareamiento observado es un evento al azar. Los valores de la proteína mayores que 56 son significantes ($p < 0,05$) (Obregon et al. 2009; Obregon et al. 2009; Obregon et al.).

10) Espectrometría de masas (EM) en tándem (MALDI-TOF-TOF/MS-MS)

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

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

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

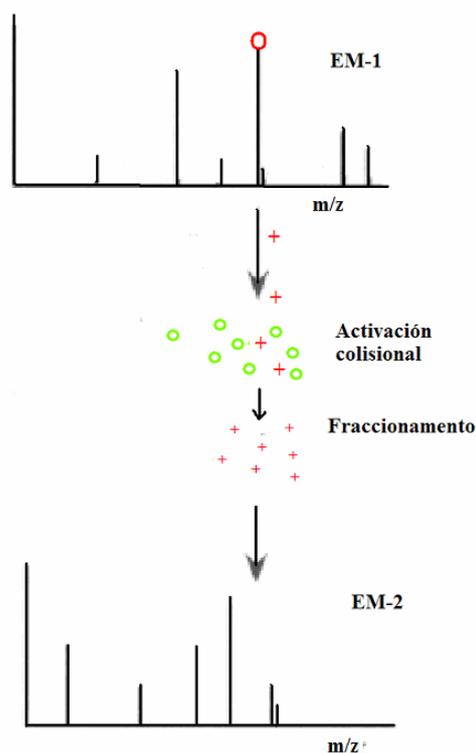
El principio del procedimiento de la espectrometría de masas en tándem, se ilustra en la figura adjunta en ésta página.

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

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

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

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



RESULTADOS:



1. Elección del medio de extracción:

El proceso de obtención del extracto crudo (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 (punto f en materiales y métodos).

Al probar con todas estas opciones se eligió la f) debido a que al realizar las determinaciones experimentales no había sales y tampoco compuestos que oxidaban las muestras cada vez q se descongelaba el extracto crudo. De esta manera no se veían interferidas las distintas determinaciones experimentales como por ejemplo; medidas espectrofotométricas, SDS-PAGE, IEF, técnicas proteómicas, etc.

Los demás extractivos: a, b, c, d y e fueron descartados por diferentes motivos, entre los cuales destacamos pardeamiento y alto contenido salino que interfiere en los ensayos de determinación de actividad, entre otras cosas.

La concentración de proteínas del EC final elegido para los posteriores ensayos de caracterización fue de 577,46 µg/ml.

2. Evidencia de la presencia de inhibidores de proteasas: Ensayos de inhibición proteolítica:

El paso siguiente consistió en determinar la presencia de inhibidores de proteasas en dicho extracto. Para ello se realizó un screening de cinética de inhibición enzimática y se pudo detectar las siguientes actividades inhibitorias:

de serinproteasas (tripsina y subtilisina), de cisteinproteasas (papaína) y de metalocarboxipeptidasas (carboxipeptidasa A).

Las curvas de inhibición con respecto a la proteasa blanco en ausencia de EC se muestran en la figura 1, 2, 3 y 4.

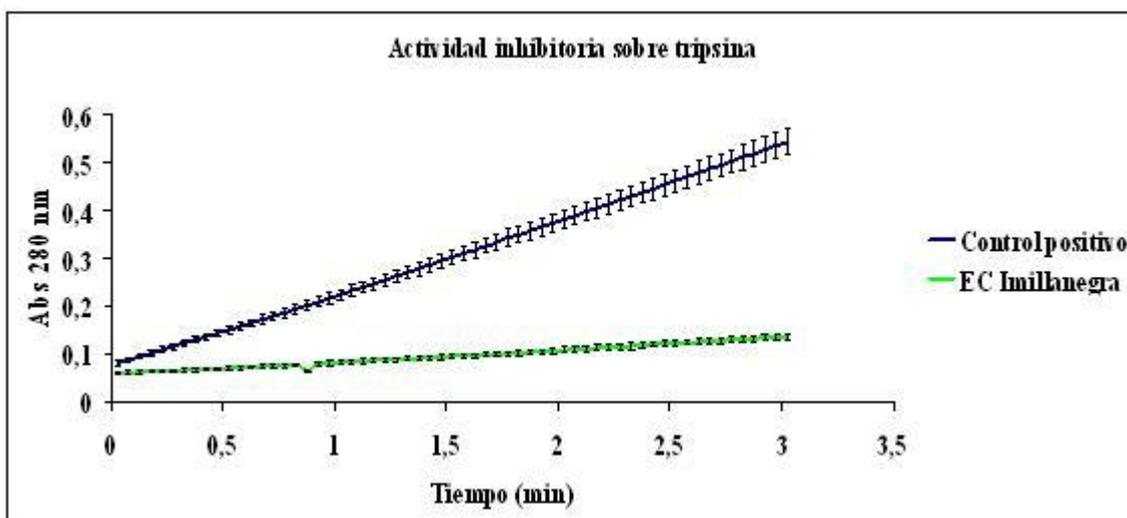


Figura 1: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato con inhibidor.

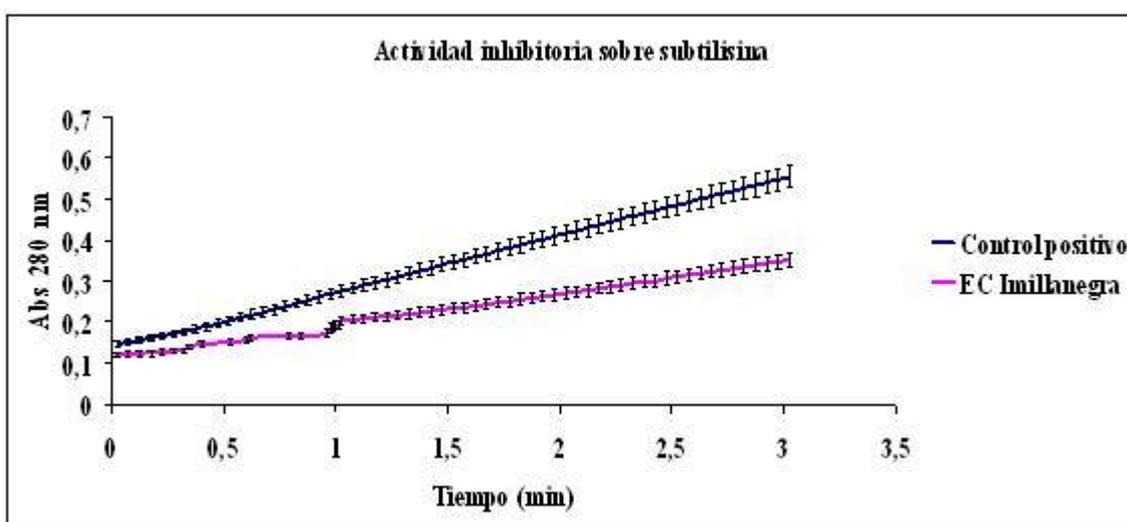


Figura 2: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la subtilisina con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva de que corresponde a la actividad de la subtilisina con el sustrato y el inhibidor.

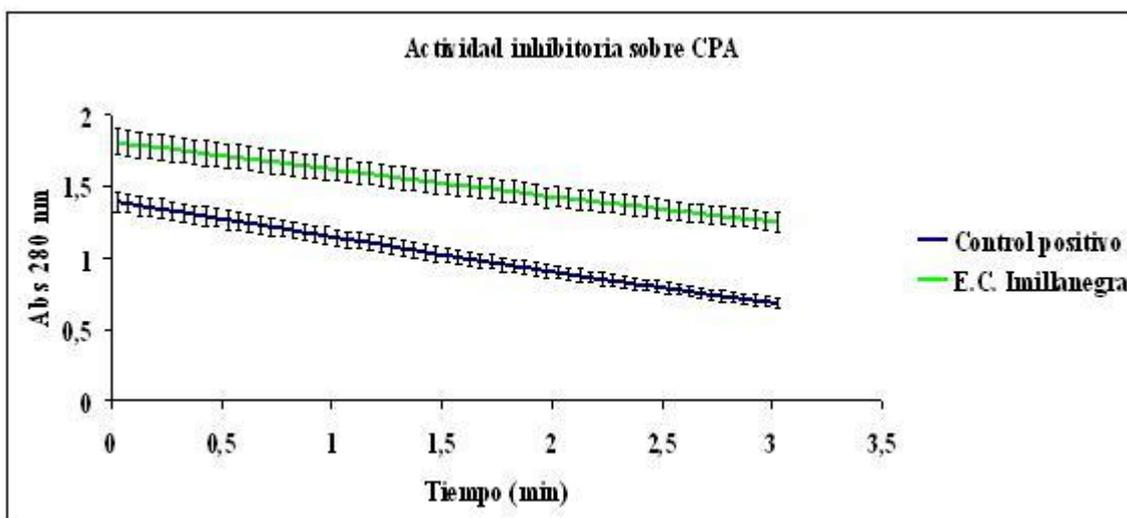


Figura 3: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva de que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato y el inhibidor.

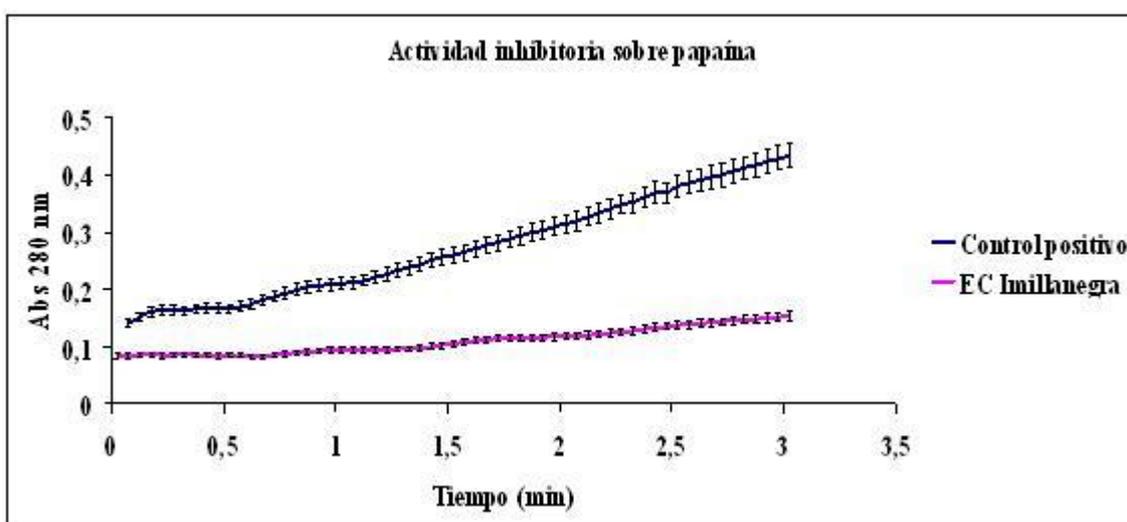


Figura 4: En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato sin inhibidor (E.C. Imillanegra). En verde se muestra la curva de que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato y el inhibidor.

3. Perfil proteico mediante SDS PAGE:

El perfil electroforético del EC mostró la composición proteica por tamaños moleculares que abarcaron desde los 3000 Da hasta los 100000 Da. (Figura 5).

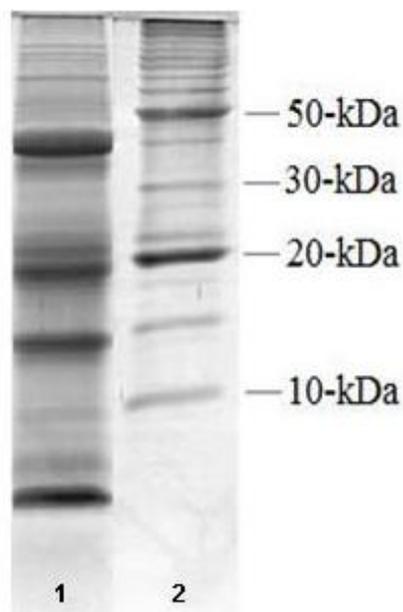


Figura 5: SDS-PAGE del extracto crudo de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad imillanegra. Calle 1: Extracto crudo. Calle 2: Patrones moleculares.

4. Purificación de los inhibidores:

4.1 Tratamiento térmico

Con el fin de obtener algunos de los inhibidores de menor tamaño molecular presentes en el EC de “imillanegra”, se procedió a un tratamiento térmico del extracto crudo como segunda etapa de purificación, ya que la formación de un extracto crudo clarificado y libre de pigmentos la consideramos como una primera y muy importante etapa de aislamiento. Se sabe que los inhibidores de proteasas de tamaño molecular menor a 30000 Da 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.

Por el motivo expresado anteriormente, el EC obtenido en agua fría con DTT y filtración con membrana se incubó a 60 °C, 70 °C, 80 °C, y 90 °C durante 60 minutos. Luego se centrifugó durante 90 minutos a 11000 rpm, descartando el pellet y quedándonos con el sobrenadante. A cada sobrenadante se lo denominó: TT60, TT70,

TT80 y TT90 según el respectivo tratamiento. Con este tratamiento el EC se clarificó notablemente especialmente con los tratamientos de 70°C, 80°C y 90 °C, donde la concentración final de proteínas fue de alrededor de 100 µg/ml, correspondientes a un 16% de las proteínas presentes en el EC original. Por otro lado el tratamiento a 60°C arrojó un valor cercano a 400 µg/ml, conservando un 66 % de proteínas con respecto al mismo extractivo.

4.2 Concentración de proteínas determinadas por el método de Bradford

Tabla 1:

<u>Muestra</u>	<u>Concetración</u>
Extracto Crudo	577,46 µg/ml
Extracto Crudo a 60 °C	419,89 µg/ml
Extracto Crudo a 70 °C	105,68 µg/ml
Extracto Crudo a 80 °C	102,78 µg/ml
Extracto Crudo a 90 °C	100,68 µg/ml

Puedo observarse en la tabla 1 la gran pérdida de proteínas que se obtuvo debido a la desnaturalización térmica de las mismas. Las proteínas que quedan luego de estos tratamientos térmicos son principalmente inhibidores de proteasas presentes en el EC de Imillanegra. Es de destacar que los tratamientos a 70°C, 80°C y 90°C prácticamente no difieren en la concentración final de proteínas obtenidas.

4.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de tripsina a cada tratamiento térmico

A partir de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de inhibición de las distintas proteasas blanco utilizadas se observó que existe en el extracto crudo una gran población de moléculas de inhiben serán proteasas, es por ello que se decidió continuar el trabajo buscando inhibidores de este tipo mecanístico.

Se eligió tripsina como proteasa “target” para los posteriores ensayos de aislamiento y caracterización. De esta manera, a cada tratamiento térmico se les hizo actividad inhibitoria de tripsina para evaluar el porcentaje de recuperación de estos inhibidores frente a los diferentes ensayos calóricos.

La actividad inhibitoria recuperada con el tratamiento térmico a 60°C fue de un 80 % con respecto al extracto crudo original (Figura 6). Por lo que este tratamiento arroja

una pérdida de 34 % de proteínas y sólo un 20 % de actividad inhibitoria con respecto al EC original.

El tratamiento térmico a 70°C recupera un 40% de la actividad inhibitoria original, y la pérdida de proteínas es de un 84 % con respecto a la cantidad original.

El tratamiento a 80°C y 90°C brinda una recuperación de un 10% de la actividad inhibitoria original y una pérdida del 84% de proteínas solubles.

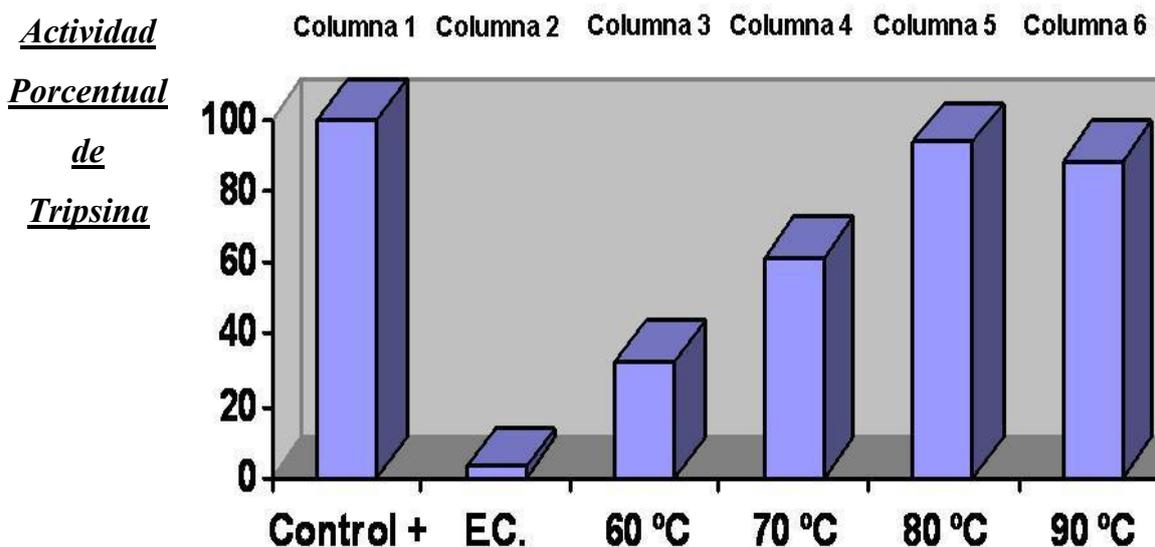


Figura 6: Columna 1: Control positivo que corresponde a la actividad de la tripsina libre con el sustrato (BAPNA) sin extracto crudo. Columna 2: Tripsina libre con el sustrato en contacto con el extracto crudo sin tratamiento térmico. Columna 3: Tripsina libre con el sustrato en contacto con el tratamiento térmico del extracto crudo a 60 °C. Columna 4: Tripsina libre con el sustrato en contacto con el tratamiento térmico del extracto crudo a 70 °C. Columna 5: Tripsina libre con el sustrato en contacto con el tratamiento térmico del extracto crudo a 80 °C. Columna 6: Tripsina libre con el sustrato en contacto con el tratamiento térmico del extracto crudo a 90 °C.

En la figura 6 se compara la inhibición de la tripsina en ausencia y presencia de E.C. de Imillanegra conjuntamente con los distintos tratamientos térmicos. El Control + se refiere a la actividad de la tripsina con el sustrato solamente. Se puede observar que hay un marcado descenso de la actividad inhibitoria en las muestras tratadas a 80 °C y 90 °C.

Por lo tanto, observamos que el tratamiento a 60°C y 70°C serían los mejores para continuar con los etapas de purificación, ya sea porque uno, el de 60°C, recupera mas actividad inhibitoria pero también más proteínas contaminantes y el otro, el de 70°C, que recupera menos proteínas pero con mayor cantidad de inhibidores de proteasas en su constitución.

4.4 Perfil electroforético de los tratamientos térmicos

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

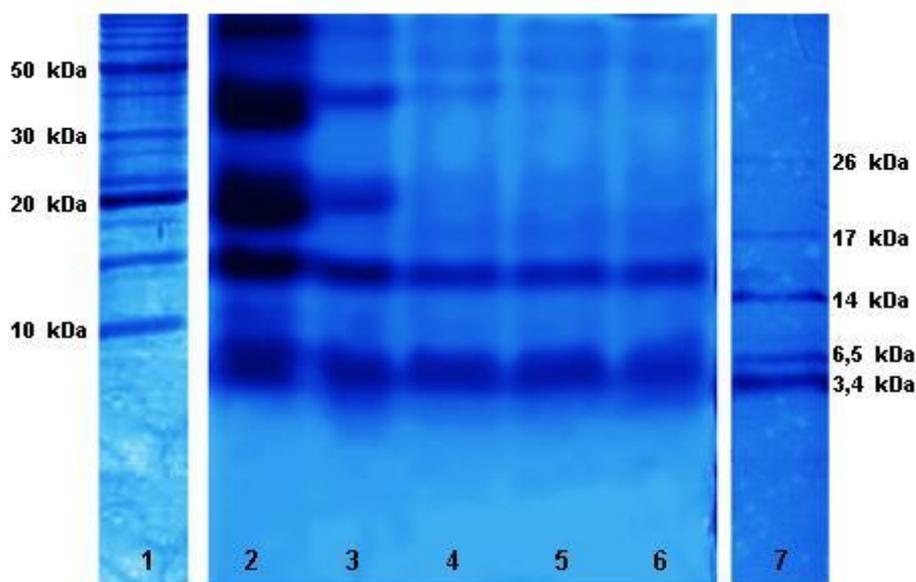


Figura 6: SDS-PAGE. Calle 1: Marcadores de alto peso molecular. Calle 2: Extracto crudo sin tratar. Calle 3: Tratamiento térmico del extracto crudo a 60 °C. Calle 4: Tratamiento térmico del extracto crudo a 70 °C. Calle 5: Tratamiento térmico del extracto crudo a 80 °C. Calle 6: Tratamiento térmico del extracto crudo a 90 °C. Calle 7: Marcadores peptídicos.

Se puede observar que el tratamiento a 60°C (calle 3) mantiene las proteínas de peso molecular menor a 20 KDa en casi toda su totalidad, sin embargo las proteínas de tamaño molecular mayor se conservan aunque en menor proporción. Con los

tratamientos térmicos de 70°C, 80°C y 90°C se ve que prácticamente desaparecen todas las proteínas mayores a 20 KDa y solo permanecen las más pequeñas. Este marcado descenso de la cantidad de proteínas en el EC tratado a 70°C, 80°C y 90 °C es coincidente con los resultados de concentración de proteína y actividad inhibitoria de tripsina presentados en los incisos anteriores.

4.5 Determinación del punto isoelectrico (pI)

Para estimar el punto isoelectrico de los distintos EC tratados y el EC sin tratar, se realizó un isoelectroenfoque empleando patrones de pI de amplio rango (3,6-9,3) según lo indicado en Materiales y Métodos.

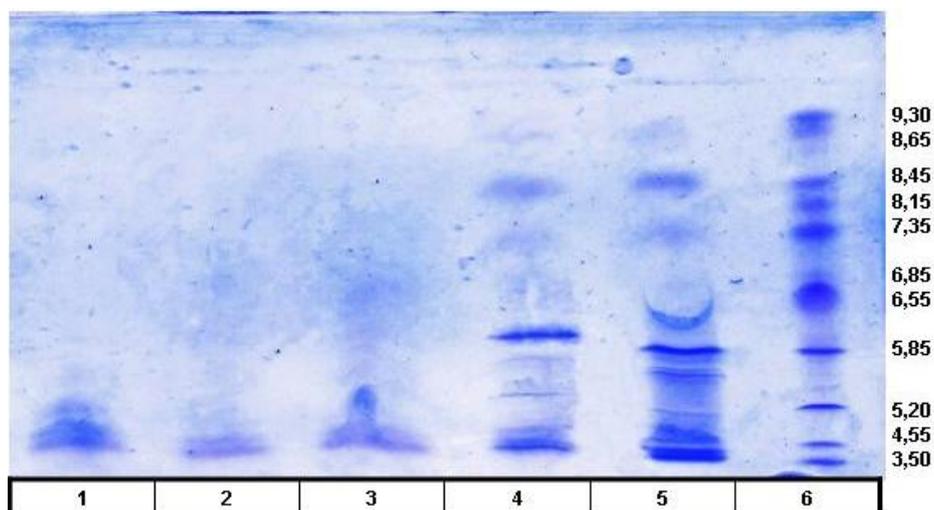


Figura 7: Isoelectroenfoque. Se muestra la purificación parcial del inhibidor de tripsina. Calle 1: Tratamiento térmico del extracto crudo a 90 °C. Calle 2: Tratamiento térmico del extracto crudo a 80 °C. Calle 3: Tratamiento térmico de l extracto crudo a 70 °C. Calle 4: Tratamiento térmico del extracto crudo a 60 °C. Calle 5: Extracto crudo. Calle 6: Marcadores de pI.

Se verifica una disminución muy importante de las proteínas solubles luego de los tratamientos a 70, 80 y 90 °C, notándose la permanencia de algunas proteínas en la zona de pI más ácidos.

4.6 Purificación por cromatografía de afinidad del inhibidor de tripsina

4.6.1 *Cromatografía de afinidad:*

Para realizar la cromatografía de afinidad se decidió usar tripsina inmovilizada como soporte. Tal como lo expresé anteriormente, en base a los resultados preliminares se decidió iniciar la búsqueda de inhibidores de serín proteasas, pero se utilizaron columnas de afinidad con tripsina inmovilizada ya que la obtención de subtilisina inmovilizada no fue posible debido a su elevado costo.

Como primera medida, 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. Se utilizó el protocolo de actividad para tripsina utilizando BAPNA como sustrato (ver M&M inciso 4).

Una vez verificada la actividad de la tripsina inmovilizada se procedió al armado de la columna de afinidad y a posterior desarrollo de la cromatografía. Se realizaron varias cromatografías de afinidad: Las muestras fueron las siguientes: EC, TT60 y TT70.

En todos los casos como primer ensayo se realizó una cromatografía de afinidad en batch utilizando tripsina-agarosa activada, equilibrando con Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂.H₂O 50 mM y pH 7,2 y eluyendo con ácido acético pH 3. Todos los tubos de las fracciones eluidas fueron inmediatamente neutralizadas para evitar la posible desnaturalización irreversible de los supuestos inhibidores peptídicos.

Todas las cromatografías obtuvieron una fracción retenida con alto porcentaje de actividad inhibitoria. El cromatograma típico de estas cromatografías se puede observar en la figura 8.

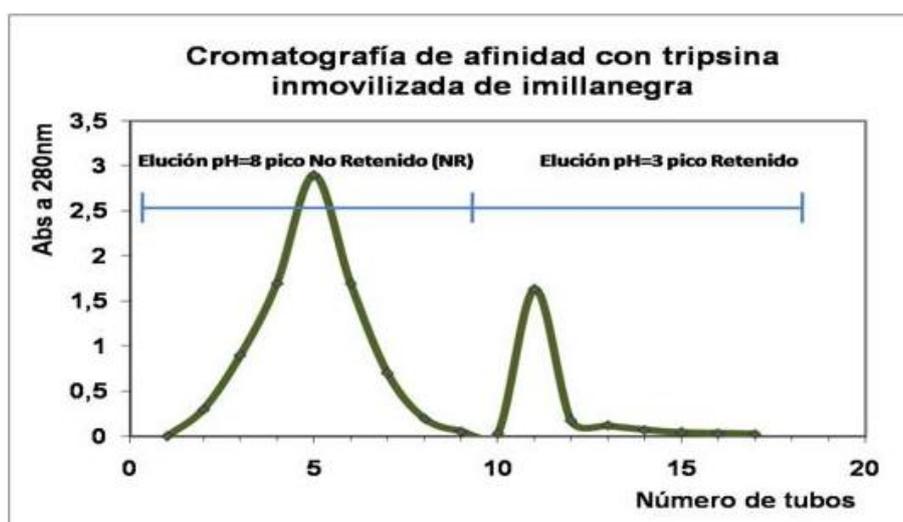


Figura 8: La figura nos muestra un ejemplo típico de estos tipos de cromatografía de afinidad. Se observa una fracción no retenida que salió con el lavado y una fracción retenida fue eluída con la solución de HCl a pH: 3 y que en este caso presentó un máximo de absorbancia de 1,722.

5. Screening preliminar de inhibidores de proteasas utilizando técnicas proteómicas:

Se utilizaron técnicas proteómicas tales como la Espectrometría de Masas (MS), la determinación de huella peptídica (PMF), la espectrometría de masas en tándem(ES/ES) o el Intensity Fading (IF/MS) para hallar nuevos inhibidores de proteasas a partir de los extractos de “imillanegra”.

Para ello, en primera instancia se realizó una electroforesis del EC y se cortó cada una de las bandas para su posterior análisis proteómico.

De la electroforesis que se muestra en la figura 5 se puede observar que hay una gran población de proteínas de alrededor de 40 KDa. A estas proteínas se les hizo una digestión trípica y luego se obtuvo la huella peptídica mediante MALDI–TOF/MS. Los resultados de identificación obtenidos usando el buscador MASCOT demuestran que esta fracción corresponde a un grupo de proteína llamadas “patatinas” con función oxidoreductasas, tales proteínas forman parte de alrededor del 40 % del contenido proteico de los tubérculos (Nissen et al. 2009).(datos no mostrados)

Las restantes bandas intensas corresponderían a inhibidores de proteasas, los cuales tienen una diversidad de tamaños moleculares, que van desde los 4 Kda (inhibidores de carboxipeptidasas) hasta los más pesados de 80 kDa (inhibidores de cisteinproteasas). (datos no mostrados).

Como veremos más adelante se pudo identificar en una banda tenue de 21 KDa una proteína que corresponde a un inhibidor de tripsina. Este inhibidor es uno de los que se conserva en el tratamiento a 60°C pero que luego desaparece con los posteriores tratamientos térmicos (Figura 6). Con estos resultados se podría suponer que el inhibidor de tripsina se desnaturaliza a dicha temperatura, y esto no resultaría sorprendente ya que dicho inhibidor podría estar estabilizado por pocos puentes disulfuros y ser relativamente grande (alrededor de 20 kDa); a diferencia de otros inhibidores que poseen hasta tres puentes disulfuro y un tamaño menor (4,3 kDa), lo que determina una estructura mucho más compacta y termoestable.

6. Caracterización de uno de los inhibidores de tripsina:

6.1 Determinación de la masa molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y Confirmación de la identificación del inhibidor mediante una técnica proteómica denominada Intensity Fading MALDI-TOF:

Se confirmó la presencia un IPP 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.

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

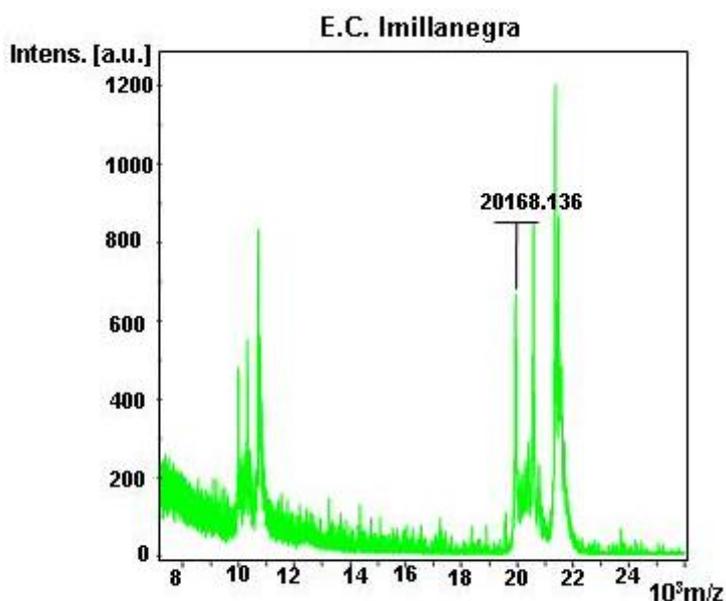
El inhibidor detectado fue un inhibidor de tripsina, ya que el mismo que interactuó con la tripsina inmovilizada y se verificó posteriormente su actividad inhibitoria luego de la elución. En las figuras 10, 11 y 12 se muestran algunos de los espectros correspondientes a algunos de los pasos mencionados anteriormente.

La ionización que se logró con el láser del MALDI pudo aportar una o dos cargas positivas a la proteína, y como esta técnica resuelve según la relación carga/masa la proteína doblemente cargada voló hacia el detector más lentamente que la monoprotonada, y el pico de la primera quedó exactamente a la mitad del peso que la monoprotonada. Como se pudo notar el pico de 10084 Da fue exactamente la mitad del de 20168 Da, que es la masa del pico mayoritario por lo tanto estos dos picos correspondieron a la misma proteína. En el espectro se pudieron ver picos cercanos al de 20168 Da. Esto se pudo deber a la presencia de isoinhibidores con pesos moleculares muy parecidos que generalmente no se detectan por electroforesis.

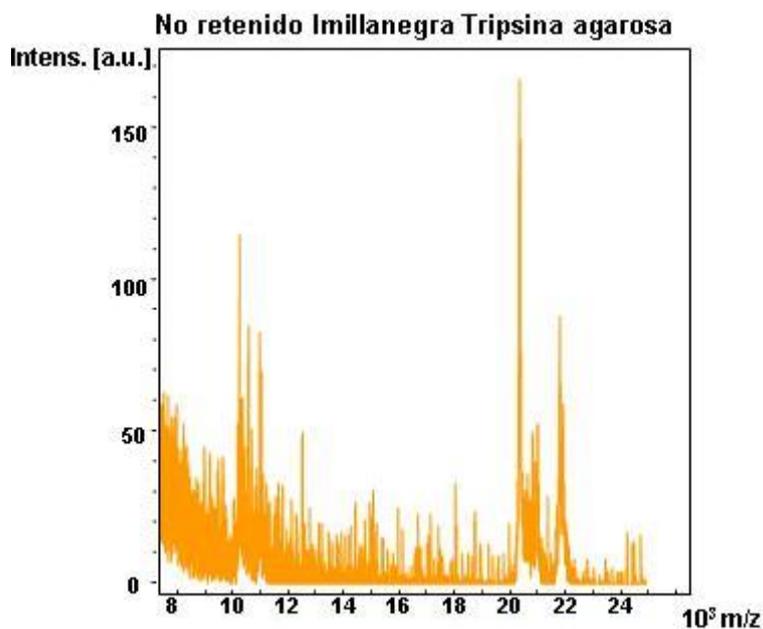
Figura 10:

En esta figura se puede ver el espectro de masas del extracto crudo de “Imillanegra”.

En la misma se observa el pico de 20168 Da, correspondiente al inhibidor, y también las demás proteínas constituyentes del extracto crudo que se encuentran en el rango de masas moleculares entre 8 kDa y 25 kDa.

Figura 11:

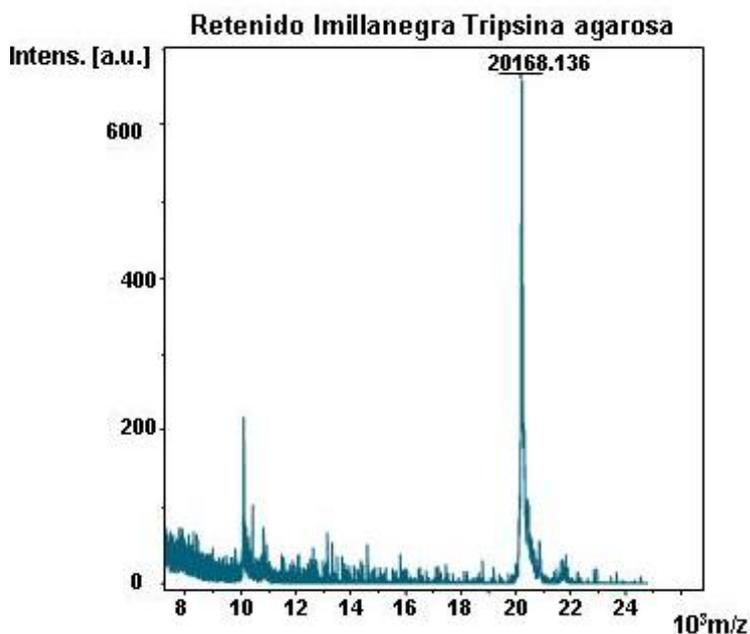
En esta figura se puede apreciar el espectro de masas del primer lavado luego de haber eluido la fracción no retenida de la cromatografía de afinidad realizada sobre el extracto crudo de “Imillanegra”. Se puede observar que las proteínas retenidas y no retenidas, no se encuentran en cantidades considerables



(observando las intensidades de las señales) debido a que las proteínas retenidas permanecían en la columna y las proteínas no retenidas habían sido eluidas.

Figura 12:

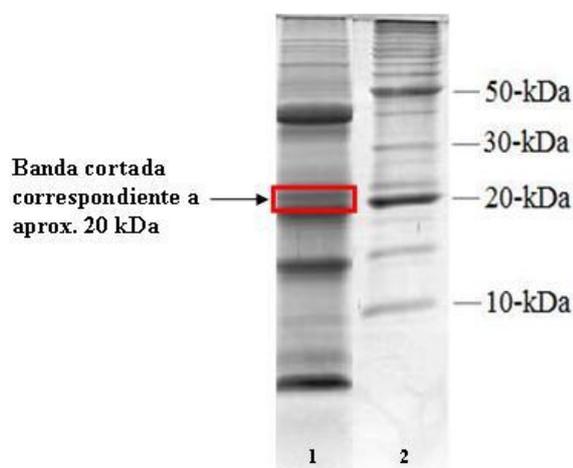
Esta figura corresponde a la elución final de la cromatografía de afinidad. En la misma se puede observar el pico mayoritario correspondiente a la proteína de 20168 Da, que quedaba retenido a la tripsina inmovilizada y que ahora eluye por cambio de pH (alterando la interacción tripsina-inhibidor). El pico que aparece con menor intensidad (10084 kDa) es exactamente la mitad del valor del pico mayoritario, correspondiente al mismo péptido (20168KDa) pero con doble carga, disminuyendo el tiempo de vuelo en el MALDI-TOF/MS.



6.2 *Huella peptídica o peptide mass fingerprint (PMF):*

Se ha identificado unos de los inhibidores de tripsina presente en estos extractos a partir de una huella peptídica de una digestión trípica de una de las bandas electroforéticas (Fig 5).

Los resultados mostraron que esa banda electroforética corresponde a un inhibidor de serín-proteasas.



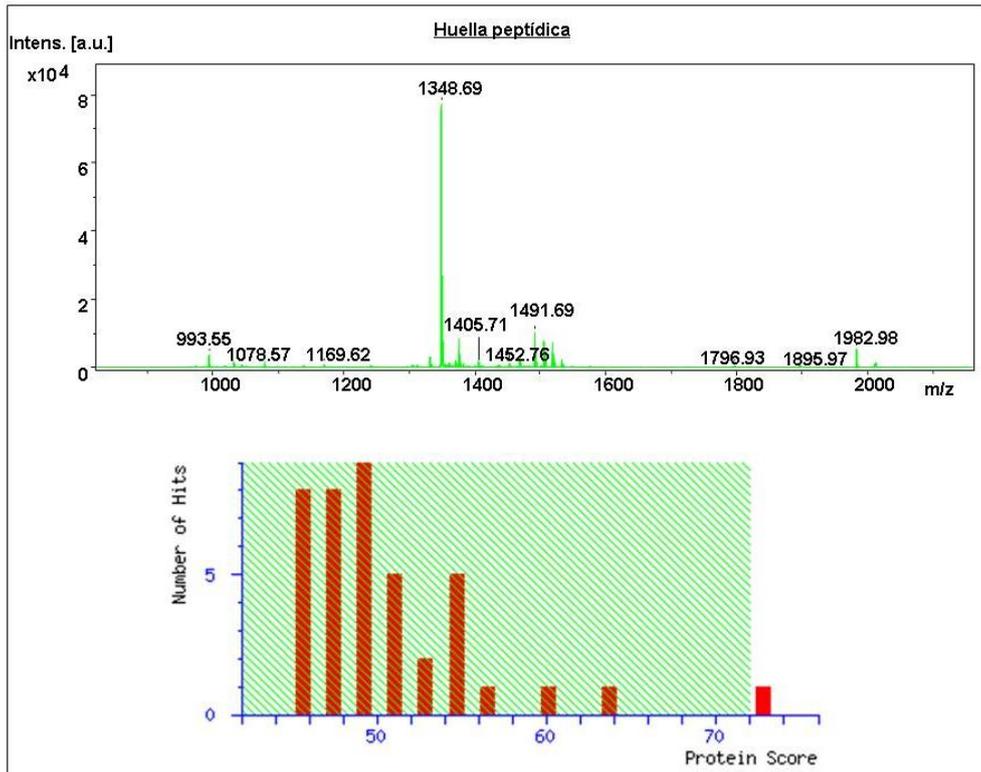


Figura 13: Database: NCBI nr 20110312 (13366630 sequences; 4577707277 residues). Taxonomy: *Viridiplantae* (Green Plants) (855878 sequences). Timestamp: 15 Mar 2011 at 04:28:29 GMT. Top Score: 73 for gi|238684515, Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 [*Solanum tuberosum subsp. andigena*].

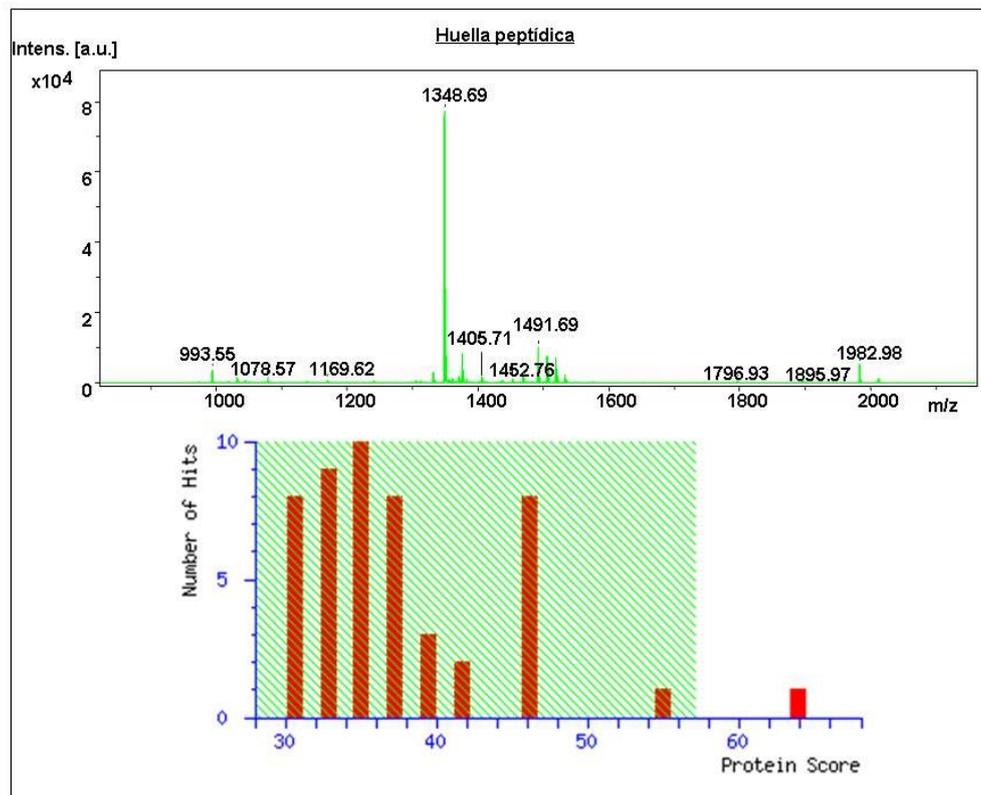


Figura 14: Database: SwissProt 2011_03 (525997 sequences; 185874894 residues). Taxonomy: *Viridiplantae* (Green Plants) (30765 sequences). Timestamp: 15 Mar 2011 at 04:03:14 GMT. Top Score: 64 for SPI2_SOLTU, Serine protease inhibitor 2 OS=*Solanum tuberosum* PE=1 SV=1.

En la figuras 13 y 14 se observa el espectro de los productos de la digestión triptica o huella peptídica de la banda electroforética. Ambos espectros dan resultados positivos utilizando dos bases de datos diferentes. En la figura 9 se muestran los resultados utilizando como base de datos a NCBIInr, la cual identificó al pico como un inhibidor de proteasa tipo Kunitz (grupo A1) de la especie *Solanum tuberosum subsp. andigena*. En la figura 14 se muestran los resultados utilizando como base de datos a SwissProt, la cual identificó al pico como un inhibidor de proteasa serínica perteneciente a la especie *Solanum tuberosum*.

Podemos concluir que esta etapa sirvió para saber hacer una identificación mediante la técnica de PMF o huella peptídica usando el servidor MASCOT y que arrojó un dato importante como el hallazgo de un inhibidor tipo Kunitz perteneciente a la familia *Solanum tuberosum* subespecie *andigena*.

7. Identificación por espectrometría de masas en tándem:

Como último paso de identificación se procedió al análisis de dos péptidos provenientes de la digestión triptica del componente de 20 kDa. Los péptidos fragmentados (de 1169 Da y 1348 Da) fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF/ MS-MS y arrojaron las siguientes secuencias:

- KLCVSYTIWKV (1169 Da).
- RYNSDVGPSGTPVRF (1348 Da).

A continuación se muestra la secuencia entera de la proteína con la cual se identificaron estos espectros:

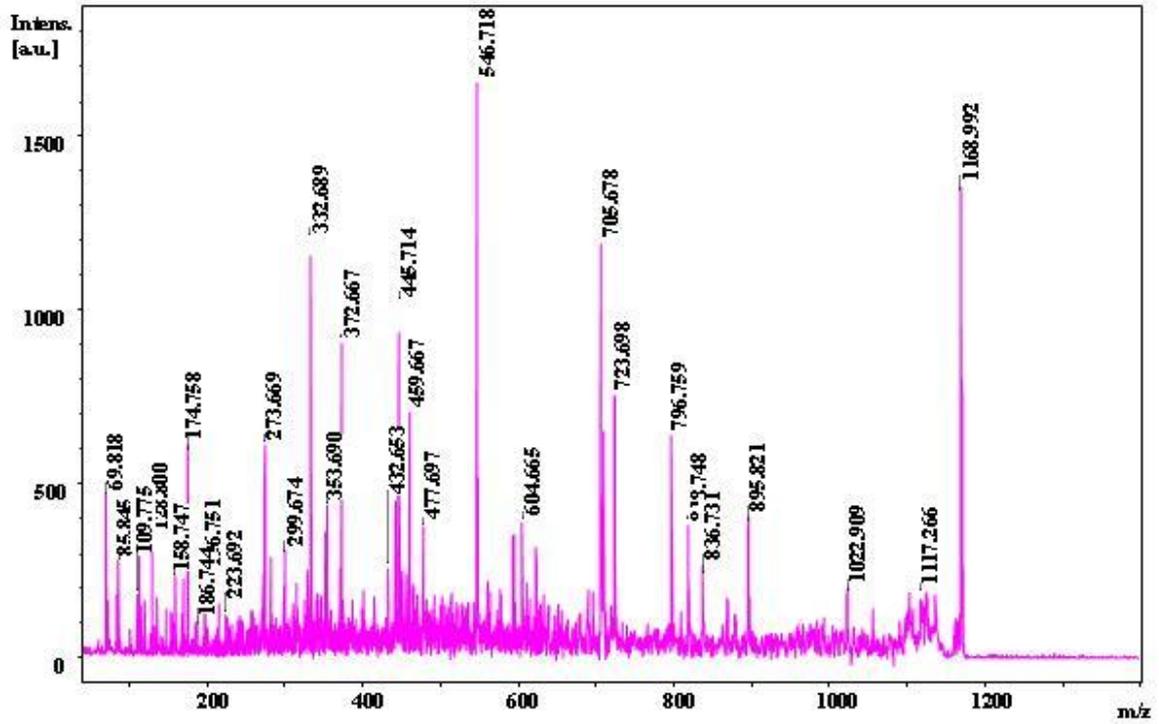
Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 [*Solanum tuberosum subsp. andigenum*]:

```

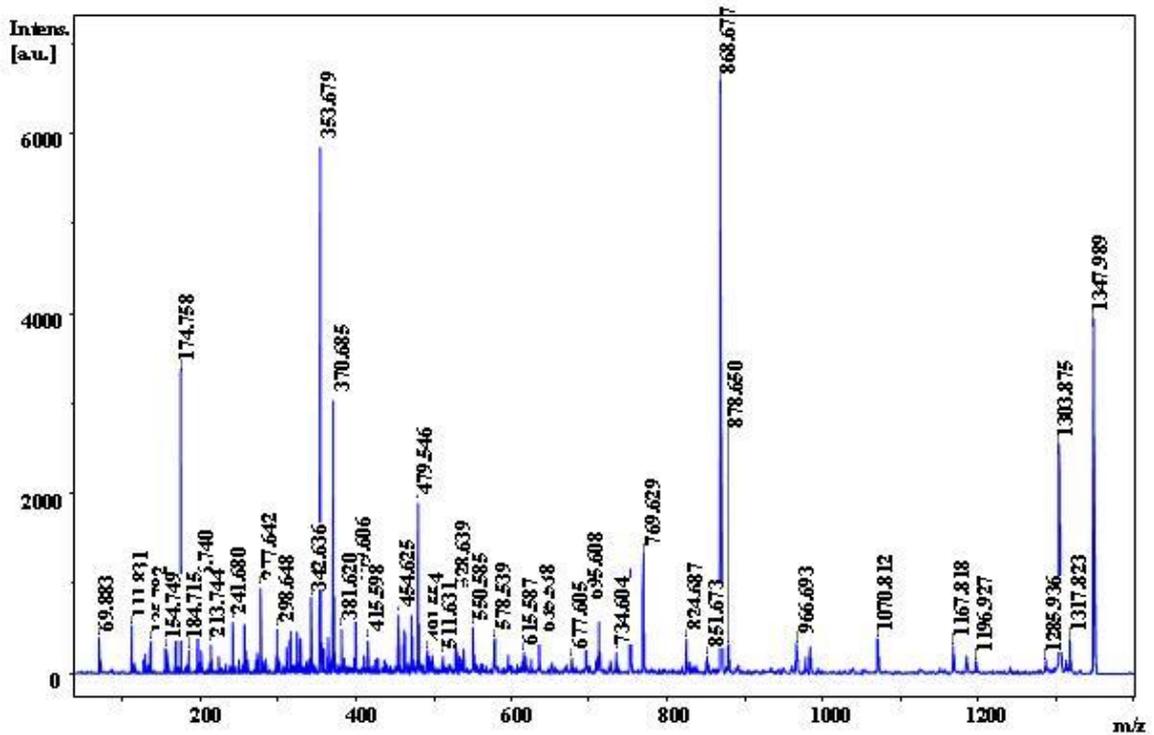
1 LPSESPVPKP VLDTNGKKNL PNSSYRIIST FWGALGGDVY LGKSPNSDAP
51 CPDGVFRYNS DVGPSGTPVR FIPLSTNIFE DQLLNIFNI PTVKLCVSYT
101 IWKVGNLNAH LRTMLLETGG TIGQADSSYF KIAKSSKLG Y NLLYCPISRH
151 FLCPFCDN FCAEVGVVIQ NGKRRLALVN ENPLDVLFQE V

```

Espectro correspondiente a la secuencia KLCVSYTIWKV (1169 Da)



Espectro correspondiente a la secuencia RYNSDVGPSGTPVRF (1348 Da):



El uso de esta metodología estableció la secuencia de aminoácidos de estos péptidos y por tanto, nos confirmó la identidad de la proteína buscada, en comparación con la información disponible en la base de datos utilizando la herramienta de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). De este modo, de acuerdo a los resultados de identificación obtenidos mediante PMF/MALDI-TOF-TOF/MS-MS, la banda electroforética correspondería a un inhibidor de serín-proteasas tipo Kunitz (grupo A1) perteneciente a *Solanum tuberosum subsp. Andigenum*, el cual coincide lógicamente con el hallado por la técnica de PMF/MALDI-TOF/MS, pero que por masa molecular no sería el mismo que el hallado mediante la técnica “Intensity Fading MALDI-TOF/MS”.

CONCLUSIONES:

Las conclusiones de éste trabajo pueden dividirse en dos partes:

La primera parte son los objetivos de entrenamiento propuestos antes de empezar este trabajo y que se concretaron satisfactoriamente. Los mismos comprenden: aprender a hacer una búsqueda bibliográfica profunda sobre un tema específico de investigación, manejo de los materiales de laboratorio, integración a un grupo de trabajo, formación de un criterio experimental que permita poner a punto distintos tipos de ensayos y modificarlos según la situación lo requiera, resolver los problemas que se presenten (ya sean teóricos o experimentales). En este sentido he sido entrenado en técnicas experimentales como la preparación de buffers, homogenatos de extractos vegetales, utilización de diferentes técnicas electroforéticas y cromatográficas y fui capacitado

para interpretar los resultados que arrojaron cada una de las técnicas dentro de un esquema general de trabajo incluido en el tema que se presenta en esta tesina.

La segunda parte de las conclusiones es la del trabajo en sí, que es donde se volcó todo lo aprendido y se puso a prueba el criterio experimental. En esta etapa del trabajo experimental:

- Se obtuvieron extractos crudos en distintos buffers. Cada extracto fue caracterizado por electroforesis e isoelectroenfoque.
- Se realizaron medidas de inhibición frente a diferentes tipos de proteasas con el fin de tener un buen espectro y de abarcar varios tipos mecanísticos de enzimas.
- Los extractos crudos tuvieron actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A, tripsina, papaína y subtilisina.
- El inhibidor de tripsina fue parcialmente purificado y caracterizado a partir del extracto crudo.
- El inhibidor fue caracterizado por electroforesis e isoelectroenfoque (peso molecular 20168 Da, pI bajo a partir del tratamiento del E.C. a 70°C).
- Algunos inhibidores, los menores a 20 kDa, son estables a altas temperaturas, ya que resistieron un tratamiento térmico de 70°C durante 60 minutos recuperándose un alto porcentaje de la actividad inhibitoria.
- Los inhibidores de tripsina de 21 kDa son estables a un tratamiento térmico a 60°C durante una hora, pero a 70°C dejan de ser estables.
- Se han identificado en estos extractos, a partir de una huella peptídica de una digestión trípica de cada una de las bandas del SDS-PAGE, los distintos componentes mayoritarios presentes en dicho extracto.
- Mediante la técnica proteómica PMF/MALDI-TOF/MS se pudo identificar un inhibidor de proteasa serínica tipo KUNITZ de 21 kDa.
- Mediante la técnica proteómica PMF/MALDI-TOF-TOF/MS-MS se pudo identificar el mismo inhibidor de proteasa serínica tipo KUNITZ de 21 kDa.
- Mediante la técnica proteómica “Intensity Fading MALDI-TOF/MS” se pudo encontrar un inhibidor de tripsina de 20168 Da diferente del inhibidor hallado anteriormente que posee una masa de 21 kDa.

Referencias

- Abad-Zapatero, C., et al. (1998). "Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*. Implications for the design of antifungal agents." Adv Exp Med Biol **436**: 297-313.
- Alonso-del-Rivero, M., et al. (2009). "A novel metallocooxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases." FEBS J **276**(17): 4875-90.
- Batista, I. F., et al. (1996). "Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds." Phytochemistry **41**(4): 1017-22.
- Beavis, R. C., et al. (1989). "Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins." Rapid Commun Mass Spectrom **3**(7): 233-7.
- Bilfinger, T. V., et al. (2002). "The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena." Curr Pharm Des **8**(7): 505-9.
- Billings, P. C., et al. (1992). "A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 3120-4.
- Bode, W., et al. (1992). "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases." Eur J Biochem **204**(2): 433-51.
- Boos, C. J. (2004). "Cardiovascular protection with ace inhibitors--more HOPE for EUROPA?" Med Sci Monit **10**(12): SR23-8.
- Botella, M. A., et al. (1996). "Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate." Plant Physiol **112**(3): 1201-10.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

- Burdick, D. J., et al. (1997). "Analysis of peptide synthesis products by electrospray ionization mass spectrometry." Methods Enzymol **289**: 499-519.
- Cataldo, D. D., et al. (2003). "Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(6): 875-84.
- Dahlgren, A., et al. (2003). "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmepsin I and II." Bioorg Med Chem **11**(16): 3423-37.
- Dalton, J. P., et al. (1997). "The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae." Parasitology **114** (Pt 2): 105-12.
- Damle, M. S., et al. (2005). "Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree)." Phytochemistry **66**(22): 2659-67.
- Davies, D. R. (1990). "The structure and function of the aspartic proteinases." Annu Rev Biophys Biophys Chem **19**: 189-215.
- De Clercq, E. (2004). "Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster." Biochem Pharmacol **68**(12): 2301-15.
- De Leo, F., et al. (2002). "PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes." Nucleic Acids Res **30**(1): 347-8.
- Dunse, K. M., et al. "Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(34): 15011-5.
- Fontham, E. T., et al. (1993). "American Society of Preventive Oncology 17th annual meeting." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **2**(5): 499-504.
- Gladwell, T. D. (2002). "Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor." Clin Ther **24**(1): 38-58.
- Gladysheva, I. P., et al. (1994). "[High molecular weight soy isoinhibitors of the Bowman-Birk type. Isolation, characteristics, and kinetics of interaction with proteinases]." Bioorg Khim **20**(3): 281-9.
- Gomis-Ruth, F. X., et al. (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." Nature **389**(6646): 77-81.
- Greenblatt, H. M., et al. (1989). "Structure of the complex of *Streptomyces griseus* proteinase B and polypeptide chymotrypsin inhibitor-1 from Russet Burbank potato tubers at 2.1 Å resolution." J Mol Biol **205**(1): 201-28.
- Gueven, N., et al. (1998). "The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure." Cancer Lett **125**(1-2): 77-82.
- Habres, J. M., et al. (1992). "Intestinal epithelial cells contain a high molecular weight protease subject to inhibition by anticarcinogenic protease inhibitors." Cancer Lett **63**(2): 135-42.
- Hillenkamp, F., et al. (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." Methods Enzymol **193**: 280-95.
- Horn, M., et al. (2005). "Differential elicitation of two processing proteases controls the processing pattern of the trypsin proteinase inhibitor precursor in *Nicotiana attenuata*." Plant Physiol **139**(1): 375-88.
- Huber, A., et al. (1993). "Peri-operative elastase-alpha-1 proteinase inhibitor in patients with postoperative intervertebral discitis." Acta Neurochir (Wien) **120**(3-4): 150-4.
- Hugli, T. E. (1996). "Protease inhibitors: novel therapeutic application and development." Trends Biotechnol **14**(11): 409-12.

- Huntington, J. A., et al. (2000). "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation." Nature **407**(6806): 923-6.
- Ivanov, D., et al. (2006). "A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases." J Biol Chem **281**(25): 17246-52.
- Iwanaga, S., et al. (2005). "Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants." Biosci Biotechnol Biochem **69**(1): 220-3.
- Jedinak, A., et al. (2005). "Inhibitors of proteases as anticancer drugs." Neoplasma **52**(3): 185-92.
- Kapur, R., et al. (1989). "Isolation and Partial Characterization of a Subtilisin Inhibitor from the Mung Bean (*Vigna radiata*)." Plant Physiol **91**(1): 106-12.
- Kim, J. Y., et al. (2009). "Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity." Int J Mol Sci **10**(6): 2860-72.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laskowski, M., et al. (2000). "What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?" Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 324-37.
- Lin, C., et al. (2004). "In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms." J Biol Chem **279**(17): 17508-14.
- Lin, J. Y., et al. (1991). "Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*." J Biochem **110**(6): 879-83.
- Liu, G., et al. "Effect of protease inhibitors on the quantitative and qualitative assessment of oral microorganisms." FEMS Microbiol Lett **312**(1): 63-70.
- Mares, M., et al. (1989). "Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family." FEBS Lett **251**(1-2): 94-8.
- McManus, M. T., et al. (1994). "Posttranslational modification of an iso-inhibitor from the potato proteinase inhibitor II gene family in transgenic tobacco yields a peptide with homology to potato chymotrypsin inhibitor I." Plant Physiol **106**(2): 771-7.
- Miller, E. A., et al. (2000). "Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of *Nicotiana glauca*." Plant Mol Biol **42**(2): 329-33.
- Miyaji, T., et al. (2007). "Purification of a cysteine protease inhibitor from larval hemolymph of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) and functional expression of the recombinant protein." Insect Biochem Mol Biol **37**(9): 960-8.
- Negreiros, A. N., et al. (1991). "The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*." Phytochemistry **30**(9): 2829-33.
- Neuhoff, V., 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.
- Nissen, M. S., et al. (2009). "Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins." Plant Cell **21**(3): 861-75.
- Obregon, W. D., et al. (2009). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases." Protein Pept Lett **16**(11): 1323-33.

- Obregon, W. D., et al. (2009). "Characterization of papain-like isoenzymes from latex of *Asclepias curassavica* by molecular biology validated by proteomic approach." Biochimie **91**(11-12): 1457-64.
- Obregon, W. D., et al. "Biochemical characterization, cDNA cloning, and molecular modeling of araujain aII, a papain-like cysteine protease from *Araujia angustifolia* latex." Planta.
- Oliva, M. L., et al. (2000). "Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 64-74.
- Patick, A. K., et al. (1998). "Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir." Antimicrob Agents Chemother **42**(10): 2637-44.
- Pearl, L. H. (1987). "The catalytic mechanism of aspartic proteinases." FEBS Lett **214**(1): 8-12.
- Prakash, B., et al. (1996). "Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors." J Mol Evol **42**(5): 560-9.
- Qi, R. F., et al. (2005). "Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**(5): 283-92.
- Rawlings, N. D. "Peptidase inhibitors in the MEROPS database." Biochimie **92**(11): 1463-83.
- Rawlings, N. D., et al. (2004). "Evolutionary families of peptidase inhibitors." Biochem J **378**(Pt 3): 705-16.
- Ritonja, A., et al. (1990). "The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato." FEBS Lett **267**(1): 13-5.
- Saxena, L., et al. "Purification of a bifunctional amylase/protease inhibitor from ragi (*Eleusine coracana*) by chromatography and its use as an affinity ligand." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **878**(19): 1549-54.
- Sin, S. F., et al. (2004). "Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*." Planta **219**(6): 1010-22.
- Stein, P. E., et al. (1995). "What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?" Nat Struct Biol **2**(2): 96-113.
- Sumikawa, J. T., et al. "The defensive functions of plant inhibitors are not restricted to insect enzyme inhibition." Phytochemistry **71**(2-3): 214-20.
- Turk, B., et al. (1997). "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors." Biol Chem **378**(3-4): 141-50.
- Turk, V., et al. (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases." FEBS Lett **285**(2): 213-9.
- Vassar, R., et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-41.
- Villanueva, J., et al. (2003). "Identification of protein ligands in complex biological samples using intensity-fading MALDI-TOF mass spectrometry." Anal Chem **75**(14): 3385-95.
- Westergaard, J. L., et al. (1980). "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures." J Immunol Methods **34**(2): 167-75.
- Xu, Z. F., et al. (2001). "A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem." Plant Mol Biol **47**(6): 727-38.

- Yanes, O., et al. (2007). "Exploring the "intensity fading" phenomenon in the study of noncovalent interactions by MALDI-TOF mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **18**(2): 359-67.
- Yanes, O., et al. (2005). "Functional screening of serine protease inhibitors in the medical leech *Hirudo medicinalis* monitored by intensity fading MALDI-TOF MS." Mol Cell Proteomics **4**(10): 1602-13.
- Yanes, O., et al. (2007). "Detection of non-covalent protein interactions by 'intensity fading' MALDI-TOF mass spectrometry: applications to proteases and protease inhibitors." Nat Protoc **2**(1): 119-30.
- Yavelow, J., et al. (1985). "Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5395-9.