

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2016

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: APHALO

NOMBRES: Paula

Dirección Particular:

Localidad: La Plata CP: Dirección electrónica

(donde desea recibir paphalo@gmail.com información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

Péptidos de amaranto con capacidad antihipertensiva: acción biológica, mecanismo de acción y su posible aplicación en alimentos.

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) capacidad antihipertensiva amaranto
alimentos funcionales

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 01/10/2009

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 01/10/2009

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos (CIDCA-CONICET-UNLP-CIC)

Facultad: Ciencias Exactas

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 47 esquina 116 Nº: s/n

Localidad: La Plata CP: B1900AJJ Tel: 221 425 4853

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: Añón María Cristina

Dirección electrónica: mcacidca@gmail.com

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

La prevención de la hipertensión, constituye un tema de interés para la salud pública nacional y provincial. He analizado, desde mi ingreso a CIC-PBA la posible capacidad inhibitoria sobre la enzima conversora de angiotensina (ACE) utilizando diferentes matrices proteicas. Actualmente trabajo con aislados, hidrolizados y péptidos sintéticos (VIKP y ALEP) de amaranto sobre la capacidad inhibitoria de ACE, renina y la ruta de las quimasas (vía alternativa que sintetiza un potente vasoconstrictor: angiotensina II). A corto plazo, se profundizarán los análisis de los mecanismos de acción de estos inhibidores y se realizarán estudios in vivo en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) junto con ensayos ex vivo de vasodilatación en anillos de aorta. Se determinará la actividad de las enzimas ACE y renina en plasma de ratas mediante la utilización de técnicas inmunoquímicas. Se separarán, purificarán y sintetizarán los péptidos de mayor actividad (RP-HPLC y MALDI-TOF) de manera de analizar su comportamiento biológico in vitro y se realizarán ensayos de docking para la enzima renina

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

La línea de trabajo presentada en el informe anterior (2015), referente al estudio de la posible capacidad inhibitoria de péptidos de amaranto sobre diferentes enzimas del sistema renina angiotensina (RAS) se continuó durante el año 2016. Los resultados obtenidos permitieron concretar la escritura de un trabajo enviado para su publicación. El mismo tal como se indica a continuación (inciso 8.3- Trabajo 1) fue nuevamente enviado con las revisiones corregidas al Journal of Agricultural and Food Chemistry para su pronta publicación. Los resultados obtenidos in vitro a partir de este trabajo nos permitieron concluir que son necesarios diferentes tipos de estudios de manera de tener una idea más acabada del mecanismo de los péptidos activos de amaranto sobre las enzimas involucradas en el sistema RAS.

En 2016, se realizaron estudios in vivo, utilizando como modelo animal para estos ensayos ratas espontáneamente hipertensas (cepa SHR). Se les administró diferentes tipos de muestras provenientes de semillas de amaranto (aislado, hidrolizado y péptido sintético VIKP). A los animales (6-8 ratas/lote) se les administró 2 ml de las muestras mediante una sonda orogástrica y se les midió la presión antes y después de 3 horas de administradas las mismas. Los resultados obtenidos mostraron que el hidrolizado de amaranto es quien registra una disminución más significativa de la presión arterial de 20 mm de Hg frente al aislado que mostró una disminución neta de 12,5 mm de Hg.

Se realizaron además ensayos ex vivo utilizando anillos de aorta provenientes de los ensayos mencionados anteriormente. Se midió la reactividad vascular de los mismos en presencia de las diferentes muestras analizadas con resultados promisorios en cuanto a la interacción de los péptidos, no sólo sobre los canales de potasio sino también sobre los receptores de norepinefrina. Los registros de fuerza obtenidos para ambas condiciones mostraron una disminución significativa en la fuerza ejercida en los mismos para el aislado y el péptido sintético VIKP.

A partir de los resultados obtenidos in vitro, se está trabajando en la identificación de secuencias activas en las fracciones con capacidad inhibitoria para posteriormente

realizar un análisis in silico haciendo uso de la técnica de docking, que permita analizar su interacción con el sitio activo de la renina.

Los resultados obtenidos a partir de los modelos in vivo junto con el análisis in silico de las fracciones más activas y los ensayos utilizando plasma serán enviados para su publicación en el segundo semestre de 2017.

En una segunda etapa de ensayos, se evaluará in vitro los posibles mecanismos de transporte de los péptidos bioactivos a través del epitelio intestinal. Se analizarán la capacidad de diferentes péptidos con actividad comprobada ya sintetizados y a sintetizar.

En otra línea de trabajo, durante el 2016 se concluyó con la escritura del trabajo con proteínas de arroz, también detallado en el inciso 8.3- Trabajo 2 del presente informe. El mismo fue enviado para su publicación a la revista Cereal Chemistry.

8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

8.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

8.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

Trabajo 1

El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible capacidad inhibitoria de un hidrolizado de amaranto sobre diferentes enzimas del sistema RAS. Para concretar este objetivo, se realizó la:

- Caracterización estructural del mismo mediante cromatografía de exclusión molecular (obteniéndose péptidos de masa molecular menor a los 2000 Da, con

elevada capacidad inhibitoria) , SDS- PAGE tricina y grado de hidrólisis (GH $21 \pm 4\%$) calculado por ensayo de OPA.

En cuanto a su actividad biológica se pudo constatar:

- Una Inhibición de la renina de manera competitiva (análisis gráfico: Lineweaver-Burk) obteniendo además parámetros cinéticos que permitieron ratificar el mecanismo de acción de ésta enzima en presencia su sustrato. Esta inhibición es de naturaleza dosis-dependiente.

A partir de estos resultados se realizó una separación de los péptidos que lo conforman mediante: A). Cromatografía de exclusión molecular (Superdex 30 Peptide), B). RP-HPLC C8 (columna preparativa): análisis de actividad de cada una de las fracciones obtenidas y C). Pasaje de fracciones activas obtenidas en el paso B, por columna RP-HPLC C18 (columna analítica): encontrando que las subfracciones de mayor actividad son las que poseen mayor naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, los porcentajes de inhibición obtenidos fueron más importantes en el hidrolizado completo frente al porcentaje alcanzado en cada una de las fracciones analizadas.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, sumados a los previamente obtenidos durante el año 2015 (presentados en informe respectivo) dieron origen a un trabajo elaborado durante el año 2016 que se envió para su publicación en enero 2017.

“Antihypertensive Properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein-derived Peptides: Alternative Blood Pressure Regulating Mechanisms Different from ACE Inhibition.(Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Trabajo 2

En este trabajo el objetivo prioritario fue otorgarle mayor valor agregado a un sub producto obtenido en la comercialización del arroz pulido desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCA y F UNLP), dentro del Programa Arroz, la variedad desarrollada por este programa es cv Nutriar. Las proteínas de arroz, son de interés para la industria de los alimentos ya que su harina esta libre de gluten. Se realizaron tratamientos enzimáticos a diferentes pHs (con alcalasa y pepsina) de manera de poder evaluar la mejor condición que permita una buena liberación de péptidos con posible actividad biológica (antioxidante y antihipertensiva). Los hidrolizados obtenidos, fueron posteriormente sometidos a una digestión gastrointestinal simulada con la finalidad de evaluar el comportamiento de las actividades biológicas estudiadas.

El trabajo incluye una caracterización estructural mediante electroforesis, cromatografía, grados de hidrólisis alcanzados y medida de actividad biológica (capacidad de inhibición de la ACE y decoloración del radical ABTS) de las muestras antes y después de haber sido sometidas a la digestión gastrointestinal simulada.

Durante el año 2016, se elaboró este trabajo científico con los resultados descritos anteriormente. El trabajo se realizó junto a la Ing. Pinciroli perteneciente al Programa Arroz. “Biological and structural properties of proteins from a high-protein-content rice cultivar before and after the in vitro digestion” (Cereal Chemistry)

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.
Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

8.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

8.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

9.2 PATENTES O EQUIVALENTES *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

9.5 *Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.*

10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

13. DIRECCION DE TESIS. *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Evento: 2º Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos (CIIAL 2016)

Carácter de participación: expositor.

Trabajo: “Estudio del efecto de un hidrolizado de amaranto sobre la enzima renina. Un mecanismo de regulación de la presión arterial poco estudiado”
Autores: Quiroga Alejandra V., Aphalo P y Añón M.C.
Lugar: Punta del Este, Uruguay
Fecha: Noviembre de 2016.

El grado de participación en esta presentación incluyó la elaboración de ensayos, discusión de resultados obtenidos y escritura y/o corrección del material escrito.

15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

En el marco de la Especialización en Docencia Universitaria de la UNLP se realizaron los siguientes cursos en el período informado:

Asignaturas cursadas y aprobadas con examen.

- Perspectivas sociopolíticas del sistema universitario. Duración del curso: 36 horas. Nota : 8 (ocho)

16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Las tareas docentes desarrolladas durante el período a informar se llevan adelante en la cátedra de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

Me desempeño como Jefe de Trabajos Prácticos con dedicación simple dicha actividad me demanda 6 horas por semana de dictado de clase frente a alumnos. Además de ello, dedico un total entre 2-3 horas por semana a preparación de trabajos prácticos y/o corrección de parciales.

21. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

PÉPTIDOS DE AMARANTO CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA: ACCIÓN BIOLÓGICA, MECANISMO DE ACCIÓN Y SU EVALUACIÓN in vivo, in vitro, ex vivo e in silico.

Introducción

Según la OMS, se producen 17,1 millones de muertes por enfermedades cardiovasculares por año. Se estima que para el año 2025, haya 1,5 billones de personas que padezcan hipertensión. Esto hace del estudio, tratamiento y prevención de la misma un tema de gran interés a nivel mundial.

Si bien diversos grupos de investigación han realizados trabajos in vitro e in vivo sobre la capacidad inhibitoria de diferentes péptidos sobre la enzima convertidora de angiotensina I y la renina (Aluko 2015 a y b), son pocos los trabajos en los que se han utilizado a los péptidos de amaranto. (Medina –Godoy y col 2013; Barba de la Rosa y col 2010)

Objetivo general

Estudiar a las proteínas de amaranto como potenciales ingredientes para ser incorporados en matrices alimentarias con posible capacidad antihipertensiva.

Objetivos específicos

- Estudiar en modelos in vivo y ex vivo la capacidad inhibitoria de péptidos presentes en hidrolizados y péptidos sintéticos (VIKP y ALEP) provenientes de amaranto.
- Esbozar un posible mecanismo de inhibición de acuerdo a los resultados obtenidos in vitro, ex vivo, in vivo e in silico.
-
- Analizar la capacidad de los posibles péptidos activos de atravesar un modelo in vitro de epitelio intestinal y analizar su actividad.

Antecedentes

En la actualidad ha habido un resurgimiento de los llamados cultivos andinos (amaranto, chía y quinoa) cuyos granos presentan conocidos beneficios a nivel nutricional y con posibilidad de encontrar péptidos y/o ingredientes con posibles propiedades biológicas.

Por ésta razón, los péptidos bioactivos se han transformado en un tema de interés para el sector industrial. Los consumidores, buscan adquirir alimentos alternativos no sólo con posibles beneficios nutricionales sino que además colaboren en el mantenimiento de su buena salud. (Udenigwe y Aluko 2012). En este sentido han sido estudiados péptidos provenientes de diferentes fuentes (animal, vegetal y/o productos subindustrializados) capaces de inhibir a las enzimas involucradas en el sistema renina angiotensina (principalmente ACE y renina). Estas secuencias de aminoácidos con posible actividad (Aluko 2015 a y b) deben ser capaces de atravesar el sistema gastrointestinal y llegar al órgano blanco manteniendo su actividad intacta. Nuestro grupo ha ensayado hidrolizados con actividad in vitro e in vivo (Vecchi y Añón 2009, Fritz y col 2011, Quiroga y col 2012 y Aphalo y col 2015), al igual que otros autores (Luna- Suarez 2010). Se han obtenido resultados promisorios, pero aún continúan discutiéndose distintos aspectos relacionados con los mecanismo de acción, transporte y alcance del órgano blanco en modelos in vivo (Udenigwe 2014). Más allá de la capacidad de los péptidos de inhibir la ACE, se ha demostrado la existencia de otros mecanismos de acción como inhibición de la enzima renina y otros efectos directos en el sistema vascular mediante la ruta de las quimasas (Hirota y col., 2007; Sipola y col., 2002).

Actividades y metodología

- Dilucidar posibles mecanismos de acción de los péptidos con actividad antihipertensiva. Comprobar su actividad in vivo haciendo uso de sistemas animales

Se estudiará la acción antihipertensiva de péptidos previamente identificados en nuestro laboratorio, ALEP y VIKP y de hidrolizados extensivos. Se analizarán mecanismos de acción alternativos al ya establecido de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina relacionados con la regulación de la presión sanguínea. Se evaluará además el efecto de las muestras antes indicadas sobre la presión arterial, renina y reactividad vascular en ratas hipertensas espontáneas (SHR). respectivamente.

Análisis de efectos agudos

Se utilizarán distintos lotes de ratas, integrados por aproximadamente 8-10 animales cada uno, de 3-4 meses de edad y peso entre 220-270 g, a las que se les administrará por sonda orogástrica VIKP y el hidrolizado enzimático. Se medirá la presión indirecta luego de tres horas de administrada la muestra.

Análisis bioquímicos

Se obtendrá plasma de los animales tratados, tal como se indicó anteriormente, y se determinará la actividad de renina (Angiotensin I RIA kit, IBL Internacional GmbH, Hamburgo, Alemania) y de ACE (Quantikine-ACE Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU).

Reactividad vascular

Se obtendrá la aorta torácica de los animales tratados según se indicó previamente, se eliminará el tejido conectivo y se cortarán anillos de 2 mm de longitud sin dañar la capa de células endoteliales ni distender los anillos (Fritz y col., 2011). Los anillos serán suspendidos entre dos hilos de acero inoxidable y serán colocados en un baño a 37 °C conteniendo solución salina fisiológica, burbujeada con una mezcla de 5 % de CO₂ y 95 % de O₂ (pH 7,4). El hilo superior se conectará a un transductor de fuerza (Grass FT.03D, Grass Telefactor, West Warwick, CT, EEUU). La reactividad vascular se evaluará determinando la fuerza necesaria para mantener las dimensiones del anillo. Los anillos se expondrán a diferentes agentes vasoactivos (norepinefrina 10⁻⁵ y 10⁻⁷ M) y se realizará una curva dosis-respuesta (concentración-fuerza). Los animales serán alimentados y mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNLP, estando todos los procedimientos experimentales supervisados y aprobados por el Comité de Ética (CICUAL). Las ratas serán mantenidas en cajas de acero inoxidable con camas de viruta, que se cambiará diariamente. Los animales tendrán acceso libre al agua, provista en botellas esterilizadas con boquilla de acero inoxidable y alimentos bajo la forma de chips extrusados de Purina.

Separación, purificación y secuenciación de los péptidos bioactivos detectados.

Se partirá de hidrolizados de amaranto que hayan mostrado actividad biológica según los ensayos anteriores. Estos hidrolizados serán fraccionados mediante ultrafiltración, HPLC de intercambio iónico y/o RP-HPLC y se analizarán los potenciales efectos biológicos de las fracciones obtenidas haciendo uso de las técnicas in vitro previamente mencionadas. Los péptidos presentes en las fracciones más activas serán purificados con la misma metodología. Las fracciones obtenidas serán sometidas a digestión trípica y secuenciadas parcialmente mediante espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF o ESI-ORBITRAP. Estos ensayos se realizarán en colaboración con Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa (IQUIBICEN). La identificación de las proteínas se llevará a cabo mediante la comparación de los datos obtenidos utilizando el programa MASCOT (Matriz Science) contra los bancos de datos Uniprot restringido a especies de Viridiplantae 674,044 y NCBI Genbank restringido a especies de Amaranthus.

Síntesis de los péptidos potencialmente más activos. Comprobación de la actividad de los péptidos mediante ensayos in vitro

Los péptidos identificados en la secuenciación, mencionados anteriormente serán analizados mediante técnicas in silico que estudian la unión ligando-proteína. Para estos estudios utilizaremos técnicas de docking donde las estructuras blanco se extraerán de la base de datos PDB (www.rcsb.org). Estos estudios serán realizados en colaboración con la Dra. Agustina Nardo cuya tesis doctoral aborda este tipo de ensayos bioinformáticos. De estos estudios se derivarán constantes de afinidad y los residuos intervinientes en la unión. Esto nos permitirá evaluar las causas estructurales de los cambios de actividad detectados en las enzimas. Aquellos péptidos que sean más promisorios en cuanto a la inhibición de alguna de las enzimas estudiadas serán sintetizados y se comprobará su acción usando las técnicas in vitro.

- Evaluación in vitro de los posibles mecanismos de transporte de los péptidos bioactivos a través del epitelio intestinal.

Cultivo celular: Se utilizará medio de cultivo DMEM con suero fetal bovino, adicionado con antibióticos, pH 7,4. Se obtendrán monocapas celulares confluentes de las células caco-2 TC7 por siembra en insertos de policarbonato e incubación (37 °C, 5 % de CO₂, 90 % de humedad relativa).

Medición de la resistencia transepitelial (TEER)

Se determinará empleando un voltímetro Millicell (Millipore) y permitirá evaluar la confluencia celular e integridad de la monocapa.

Determinación de la actividad transportadora

Se utilizarán monocapas con valores constantes de TEER. Se colocarán insertos sembrados en placas de cultivo, agregando PBS en las cámaras apical y basolateral e incubando a 37 °C (5 % de CO₂, 90 % de humedad relativa, 20 min). Luego se removerá el PBS de ambas cámaras (blancos iniciales). En la cámara apical se inoculará la muestra, mientras que en la basolateral se colocará PBS. Las cajas se incubarán en las condiciones antes descritas. Se tomarán muestras de las cámaras a distintos tiempos, reponiendo la cantidad tomada con PBS (Yamashita y col., 2002).

Análisis de los péptidos: en aquellos casos en los que se ensayarán péptidos de secuencia conocida, su presencia en la cámara basolateral y apical será seguida por RP-HPLC y espectroscopía de masa. Las respectivas actividades biológicas serán determinadas con los ensayos in vitro indicados previamente.

Bibliografía

- Aluko Rotimi E. "Antihypertensive peptides from food proteins" Annual Review of Food Science and Technology 2015, 6, 235-262. a).
- Aluko Rotimi E. "Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides" Current Opinion in Food Science 2015, 4, 44-50. b).
- Aphalo P., Martinez E.N. y Añón M.C. "Amaranth sprouts: a potential health promoting and nutritive natural food" International Journal of Food Properties 2015,18, 2688-2698.
- Barba de la Rosa A.P., Barba Montoya A., Martínez-Cuevas P., Fernández-Ledesma B., León-Galván M.F., De León-Rodríguez, A. and González C. " Tryptic amaranth glutelin digests induce endotelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. Nitric Oxide 2010, 23, 106-111.
- Dinnella C., Gargaro M.T., Rossano R. y Monteleone E. "Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein" Food Chemistry, 2002, 78, 363-368.
- Fritz M., Vecchi B., Rinaldi G. and Añón M.C. " Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity" Food Chemistry 2011, 126, 878-884.

- Hirota, T.K., Ohki, R., Kawagishi, Y., Kajimoto, S., Mizuno, Y., Nakamura, L., Kitakaze, M. 2007. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.*, 30: 489-496.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., Paredes-López, O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 148: 240-247
- Medina- Godoy S., Rodriguez-Yañez S.K., Bobadilla N.A., Pérez- Villalba R., Valdez-Ortiz R., Hong E., Luna-Suárez S., Paredes-López O., Valdez- Ortiz A. “Antihypertensive activity of AMC-3, an engineered 11S amaranth globulin expressed in *Escherichia coli*, in spontaneously hypertensive rats” *Journal of Functional Foods*, 2013, 5, 1441-1449.
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Ventureira, J.L., Martínez, E.N., Añón, M.C. 2012. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *J. Sci. Food Agric.*, 92: 397-403.
- Sipola, M.P., Finckenberg, R., Korpela, H., Vapaatalo, S., Nurminen, N.L. 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J. Dairy Res.*, 69: 103-111.
- Udenigwe, C.C. and Aluko, R.E. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits., 77: R11-R24.
- Udenigwe, C.C. 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research.
- Vecchi B. and Añón M.C. “ACE-inhibitory tetrapeptides from *A. hypochondriacus* 11S globulin” *Phytochemistry* 2009 70, 864-870.
- Yamashita, S., Konishi, K., Yamasaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H., Furuyama, Y. 2002. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system, *J. Pharm. Sci.*, 91: 669-679.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda “Informe Científico Período”.
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.qba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

C. Sistema SIBIPA:

a. Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.