

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Perfeccionamiento

PERIODO 2013-2014

1. **APELLIDO:** Prospitti

NOMBRES: Anabela

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: **CP:** **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información):

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

“Fitoproteasas e inhibidores de proteasas (IPs). Aislamiento y caracterización bioquímica y estructural”

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2011

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2012

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2013

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: UNLP

Facultad: Cs. Exactas

Departamento: Cs. Biológicas

Cátedra: -

Otros: LIProVe

Dirección: Calle: 47 *N°:* y 115

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 4230121

5. **DIRECTOR DE BECA**

Apellido y Nombres: Natalucci Claudia L.

Dirección Particular: Calle: *N°:*

Localidad: *CP:* *Tel:*

Dirección electrónica:

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material). Se adjunta Informe Científico.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

"Balansain R as Hydrolytic Agent for the Production of Antioxidant Peptides from Bovine Whey"

Balansain R, a partially purified extract from ripe fruits of Bromelia balansae Mez containing cysteine peptidases, was used for the hydrolysis of commercial bovine whey proteins (WPC 80) and their peptide patterns were reported. Caseinolytic activity of balansain R at 40 °C and pH 8.5 was 4.0 Ucas/mL. Hydrolysis of whey proteins was performed by the pH-stat method (40 °C, pH 8.5, 10 mmol/L Cys). Characteristic proteolytic patterns (SDS-Tricine-PAGE gels) were obtained for the main whey components. The rate of degradation for β -lactoglobulin and α -lactalbumin were 80% and 15% after 120 min, respectively. New peptides appeared in all hydrolysates within the range of 5-15 kDa. Whey hydrolysates exhibited higher antioxidant activities than WPC 80. The hydrolysate obtained with 10% balansain R after 120 min of reaction showed the highest DPPH radical scavenging activity (about 88% of residual concentration of DPPH free radicals) as well as higher chelating ability and reducing power, mainly due to peptides of 5-10 kDa.

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

"Fitoproteasas e inhibidores de proteasas (IPs)". Póster presentado en el Primer Congreso Internacional Científico y tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Organizado por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) los días 19 y 20 de septiembre, La Plata, Buenos Aires, Argentina

"Nueva fitoproteasa de Phytolacca dioica y su acción hidrolítica sobre suero lácteo". Póster presentado en el XI Simposio Argentino, XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica y I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, realizado en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas los días 20 a 22 de noviembre de 2013 en la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina.

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Ver ítem 7.5

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. 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)

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

“Fitoproteasas e inhibidores de proteasas (IPs). Aislamiento y caracterización bioquímica y estructural”

Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).
-

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

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

“Caracterización de la Actividad Proteolítica de los Frutos Maduros del Ombú (*Phytolacca dioica* L.)”

Objetivos

El ombú (*Phytolacca dioica*) es una planta arborescente nativa de la pampa argentina y uruguaya, perteneciente a la familia *Phytolaccaceae*. Su equivalente norteamericano (*Phytolacca americana* L.) ha sido ampliamente estudiado y se han hallado dos proteasas principales. El objetivo del estudio propuesto es caracterizar la actividad proteolítica de los frutos maduros de *P. dioica*, la que fuera localizada en el periodo de beca de estudio (2011-2013).

Material Vegetal Utilizado

Se utilizaron frutos maduros de *Phytolacca dioica* L. que fueron recolectados en zonas adyacentes al Museo de Ciencias Naturales de La Plata. Los mismos son preservados a -80 °C.

Obtención del Extracto Vegetal Parcialmente Purificado

Para obtener el extracto se procesaron en baño de hielo 4 g de frutos maduros en presencia de 20 ml de buffer cítrico-citrato 0.05 M pH 6,2 con EDTA 5 mM. La suspensión así obtenida fue filtrada por malla gruesa para eliminar restos groseros y centrifugada a 4500 rpm durante 15 min, conservándose el sobrenadante. De esta manera se obtuvo el extracto crudo que posteriormente fue parcialmente purificado por precipitación acetónica. El PAR (precipitado acetónico redissuelto) fue conservado en freezer a -80 °C hasta el momento de su uso. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976), obteniéndose 1,1 mg de proteínas por ml de PAR.

Ensayo de Actividad Caseinolítica

Para determinar la actividad proteolítica de la enzima se utilizó como sustrato una solución conteniendo caseína al 1% (p/v) preparada en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 adicionado con 10 mM de cisteína. La mezcla de reacción (1,1 ml de sustrato y 0,1 ml de PAR) se incubó a 30 °C deteniendo la reacción luego de 5 minutos por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v). Los blancos se prepararon añadiendo el TCA al preparado enzimático antes de añadir el sustrato. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 4500g durante 20 min y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 280 nm. Se define una Ucas como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto bajo las condiciones de ensayo. Se obtuvo buena actividad caseinolítica específica: 1 Ucas/mg. Si bien la actividad caseinolítica está en el orden de lo esperado, es levemente menor que la obtenida en el extracto preparado inmediatamente después de la recolección de los frutos; este es un fenómeno asociado al almacenamiento.

Análisis Electroforético e Isoelectroenfoque

La muestra fue sometida a electroforesis en gel de Tricina desnaturalizante en un sistema compuesto por un gel de apilamiento (4% T, 3% C) y un gel separador (10% T, 3% C). La electroforesis se llevó a cabo en una celda Mini-Protean III placa dual (Bio-Rad, Hercules, CA 94547, EE.UU.), se realizó por duplicado y a temperatura ambiente. Los geles así obtenidos fueron fijados durante 30 minutos con una solución fijadora conteniendo metanol, ácido acético y agua (5:1:4) y teñidos con solución de Coomassie R-250 según técnica de Wu y Gales, 1996. La decoloración de los geles se llevó a cabo con sucesivos lavados con solución decolorante (ácido acético y agua destilada, en relación 1:9). Las imágenes de los geles fueron procesadas por medio de un software específico (Scion Image Beta 4.03 para Windows, Scion Corporation, Frederick, Maryland 21701, EE.UU.) para la obtención de los correspondientes densitogramas.

Se obtuvo el perfil electroforético esperado: una banda principal de 25,7 kDa (característica de la mayoría de las fitoproteasas cisteínicas) y tres bandas poco intensas de menor peso molecular.

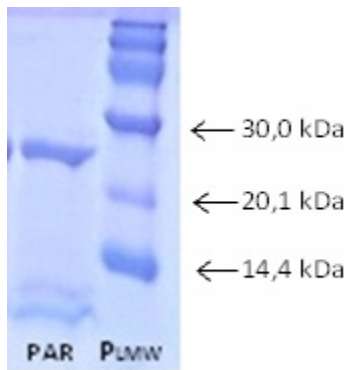


Fig. 1: Electroforesis. PAR: precipitado acetónico redissuelto; P_{LMW}: patrón proteico de bajo peso molecular.

La muestra fue sometida a isoelectroenfoque haciendo uso de una celda MINI IEF Model 111 (Bio-Rad, Hercules, CA 94547, EE.UU.) y una mezcla de anfólitos de rango de pI 4,0-7,0. Se observaron nueve bandas: las ubicadas en el rango de pI entre 5,20 y 6,55 son las que presentan mayor actividad caseinolítica (evidenciado en zimogramas anteriores).

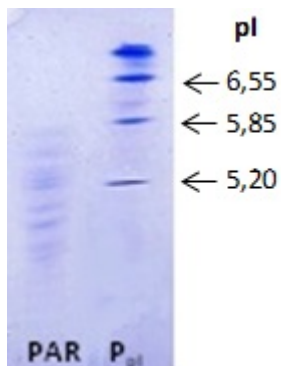


Fig. 2: Isoelectroenfoque. PAR: precipitado acetónico redissuelto; P_{pI}: patrón de pI rango 5-10.

Efecto del PAR Sobre el Lactosuero

Preparación del Sustrato para la Hidrólisis

Se trabajó con un concentrado comercial de lactosuero (WPC 80), el cual fue reconstituido en agua destilada a 40 °C a una concentración final del 5% (p/v). La suspensión acuosa de WPC 80 se mantuvo con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora para lograr la hidratación del polvo suspendido. El pH de la solución se ajustó a 4,6 con HCl 1 N y se centrifugó a 8500g durante 15 min. El sobrenadante de la centrifugación fue sometido a un tratamiento térmico de 80 °C durante 30 min para desnaturalizar las proteínas. Una vez que la preparación llegó a temperatura ambiente, se le agregó cisteína 10 mM.

Hidrólisis Enzimática

Para realizar la hidrólisis se utilizó el método de pH-STAT descrito por Adler-Nissen (1986). El pH de la suspensión de suero WPC 80 pretratado se ajustó a 8,0 con NaOH 0,25 mM antes de la adición del preparado enzimático. La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 2 horas con una relación proteína/enzima de 10:1 (v/v). A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 200 ul de la mezcla de reacción, deteniendo la reacción con 50 ul de HCl 1 M. Luego de la neutralización con 50 ul de NaOH 1 M las muestras fueron almacenadas en freezer. El grado de hidrólisis (%GH) se calculó a partir del volumen y la molaridad de álcali utilizados para mantener un pH constante (Adler-Nissen, 1986), resultando en un valor de %GH = 25 a los 5 minutos de iniciada la reacción, aumentando levemente en tiempos subsiguientes.

Al agregar el extracto enzimático, el pH pasó drásticamente de 8,0 a 6,8, lo que produjo un gasto de NaOH cercano a los 5 ml. Para poder definir si este cambio se debió a la acción de las enzimas sobre el sustrato de suero o a la presencia del buffer contenido en el extracto enzimático se realizó un ensayo para calcular el gasto inicial de NaOH. Para ello se preparó un blanco de sustrato a pH 8,0 al que se le agregó el volumen de extracto enzimático correspondiente al ensayo y finalmente se midió el pH. Se constató que sólo hubo una variación de 0,15 unidades de pH, determinándose el gasto inicial real de NaOH y confirmándose la elevada actividad hidrolítica del extracto.

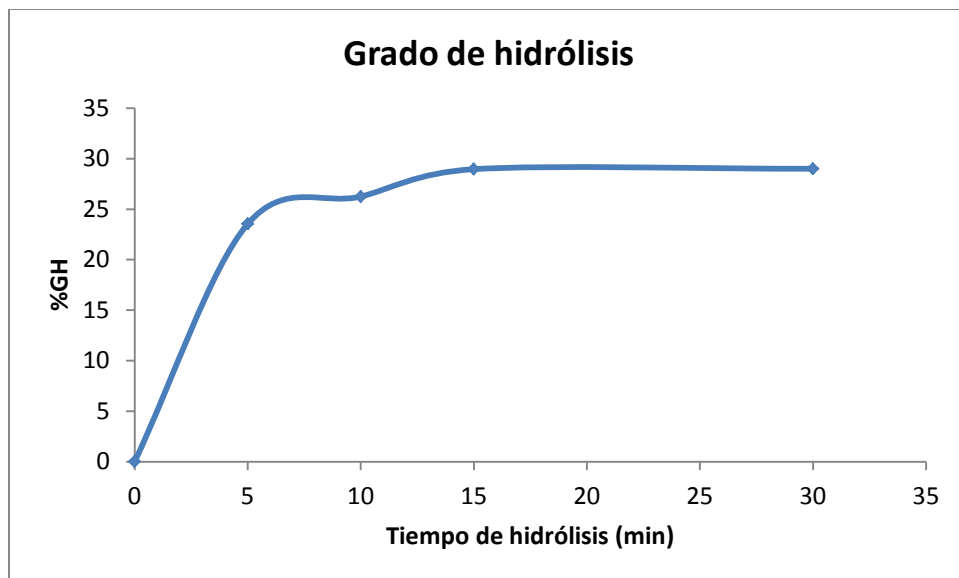


Fig. 3: %GH vs tiempo de hidrólisis.

Electroforesis de los Hidrolizados

Los hidrolizados de las muestras almacenadas fueron tratados con la adición de buffer de muestra para electroforesis (Tris-HCl 125 mM de pH 8,5 conteniendo SDS 40 g/L, 2-mercaptoetanol 100 g/L, azul de bromofenol 4 g/L y glicerol 200 ml/ L). La mezcla se calentó a ebullición durante 5 min y se centrifugó a 8500g durante 10 minutos. El estándar de peso molecular se preparó en el mismo buffer de muestra. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de Tricina desnaturalizantes en un sistema compuesto por un gel de apilamiento (4% T, 3% C), un gel separador (10% T, 3% C) y un gel de separación (16,5% T, 3% C), sistema que es especialmente adecuado para la resolución de mezclas de péptidos de bajo peso molecular (Pardo y Natalucci, 2002). Las electroforesis se llevaron a cabo de la manera previamente descrita. En la figura 4 se observa la degradación de las bandas correspondientes a la α -lactoalbúmina (14,2 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) y lactoferrina (80 kDa) a medida que avanza la hidrólisis. A los 5 minutos de hidrólisis se evidencia gran degradación de dichas bandas, variando poco en los tiempos subsiguientes. Se puede visualizar también la degradación completa de la albúmina sérica bovina (66,4 kDa). Estos resultados son compatibles con la escasa modificación del grado de hidrólisis a lo largo de la reacción enzimática luego de los primeros 5 minutos.

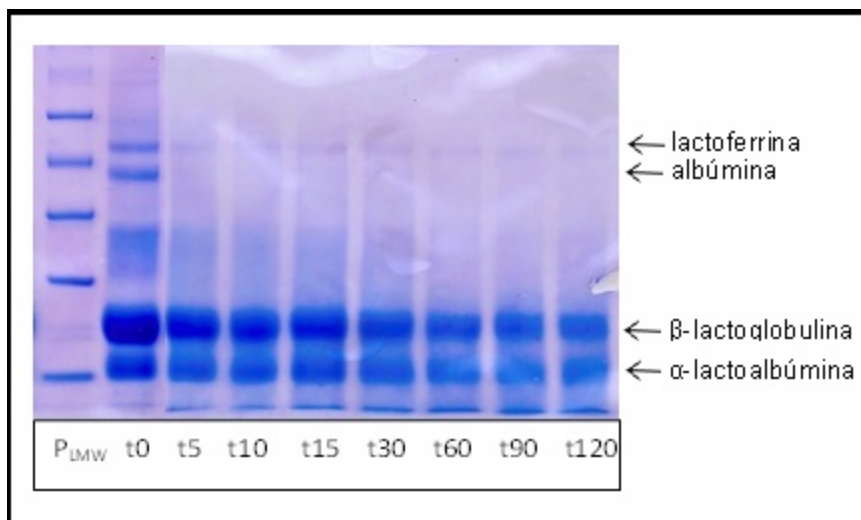


Fig. 4. Electroforesis de hidrolizados obtenidos. t₀, t₅, t₁₀, t₁₅, t₃₀, t₆₀, t₉₀, t₁₂₀ corresponden a las muestras obtenidas a los 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de hidrólisis. P_{LMW}: patrón de bajo peso molecular.

Determinación de la Actividad Antioxidante de los Hidrolizados de Lactosuero usando el Método de Depuración de Radicales Libres de DPPH

La actividad de captación de radicales libres de los hidrolizados de lactosuero se midió por la disminución de la absorbancia a 517 nm de soluciones etanólicas de DPPH (**2,2-difenil-1-dipicril-hidracilo**) 0,05 mM en presencia de la muestra (Marxen *et al.*, 2007). Para la reacción se mezcló una alícuota (0,1 ml) de los hidrolizados (dilución etanólica 1/10) con 0,9 ml de solución de DPPH, dejando reposar 30 min. La actividad antioxidante se expresó como: **%Disminución** = [(Acontrol - Amuestra)/Acontrol] * 100, donde A representa la absorbancia. El lactosuero de partida contiene péptidos con actividad antioxidante. Dicha actividad aumentó aproximadamente un 20% luego de 10 minutos de hidrólisis.

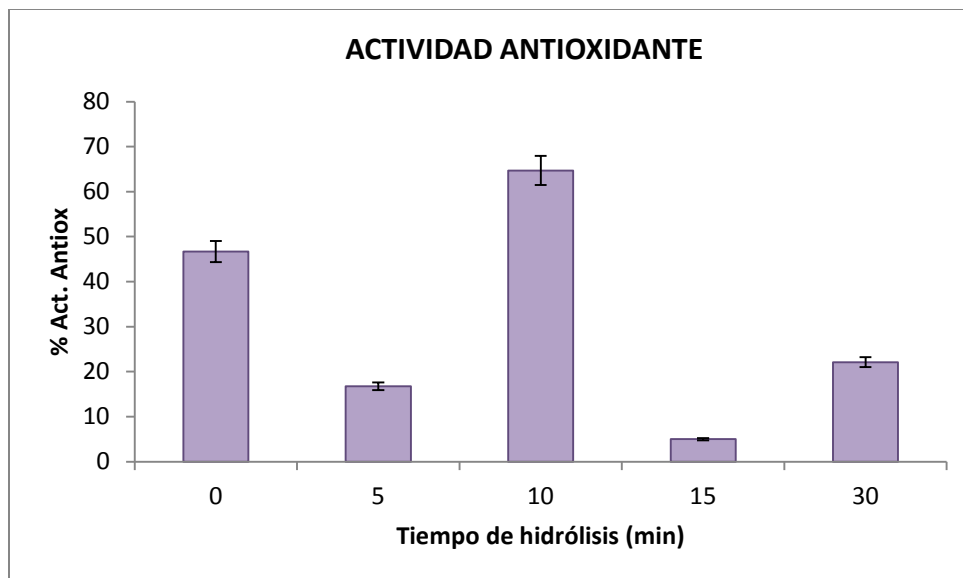


Fig. 5. Actividad antioxidante en función del tiempo de hidrólisis.

Se trató de eliminar los péptidos bioactivos de la muestra original, para poder evidenciar de mejor manera la actividad de los péptidos generados por hidrólisis. Para ello, al sustrato de hidrólisis se le agregaron 5 volúmenes de acetona fría para precipitar las proteínas principales y así eliminar los péptidos en el sobrenadante. Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en igual volumen de buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. Con dicha solución de proteínas se ensayó una hidrólisis de la manera previamente explicada. A los hidrolizados obtenidos se les midió la capacidad depuradora de radicales libres DPPH. Los resultados de varios ensayos realizados no fueron concluyentes.

Purificación del PAR por Cromatografía de Intercambio Iónico

Con el fin de separar las enzimas constituyentes del extracto proteolítico, PAR, se realizaron cromatografías de intercambio iónico utilizando un equipo cromatográfico Äkta Purifier. Se seleccionó una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP de 1 ml (GE Healthcare), adecuada para el rango de pI de las proteínas de interés.

Como muestra se utilizó el PAR previamente pasado por filtro de 22 μ m. En la cromatografía se utilizaron dos soluciones buffer Bis-Tris 0,02 M de pH 6,5: una con y otra sin NaCl 1M. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de buffer sin NaCl, se sembraron 500 μ l de muestra y se eluyó con un gradiente de 0% a 100% de NaCl en 5 volúmenes de columna (VC). La absorbancia de seguimiento fue 280 nm, característica de grupos aromáticos proteicos. El cromatograma obtenido (cromatograma 1) se muestra en la figura 6. En la misma se puede observar una porción no retenida y 3 picos retenidos.

A las fracciones obtenidas por cromatografía se les realizó un isoelectroenfoco usando mezcla de anfólitos 4-5 y patrón de pI 3-10 (bandas dispuestas sobre el cromatograma). Tanto el no retenido como el primer pico eluido mostraron el patrón de bandas característico de la muestra. Asimismo, se ensayó la actividad caseinolítica de las mismas, siendo positiva para el no retenido y en menor cantidad para el primer pico eluido.

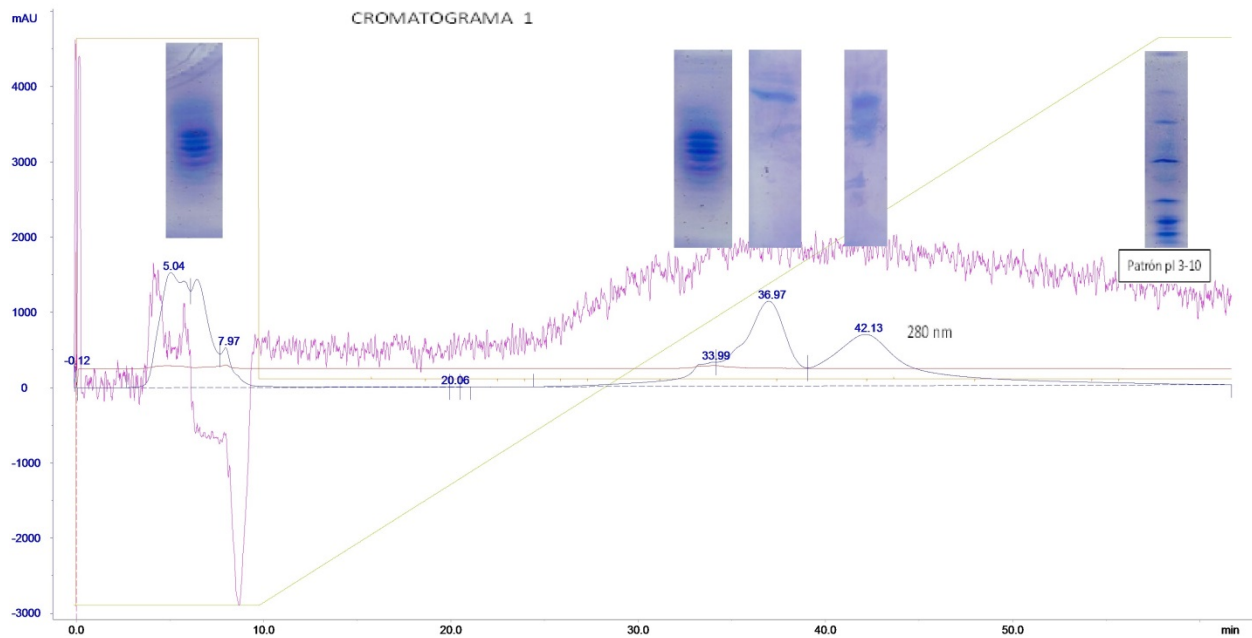


Fig. 6. Cromatografía de intercambio aniónico usando buffer Bis-Tris 0,02 M pH 6,5.

Se repitió la corrida para determinar reproducibilidad de la misma y poder recolectar algún pico no considerado en la primera corrida. Se obtuvo un perfil similar (figura 7, cromatograma 2) y se recolectó un nuevo pico. Presentaron actividad caseinolítica el no retenido y los dos primeros picos eluidos (probablemente coincidentes con el primer pico eluido en el cromatograma 1).

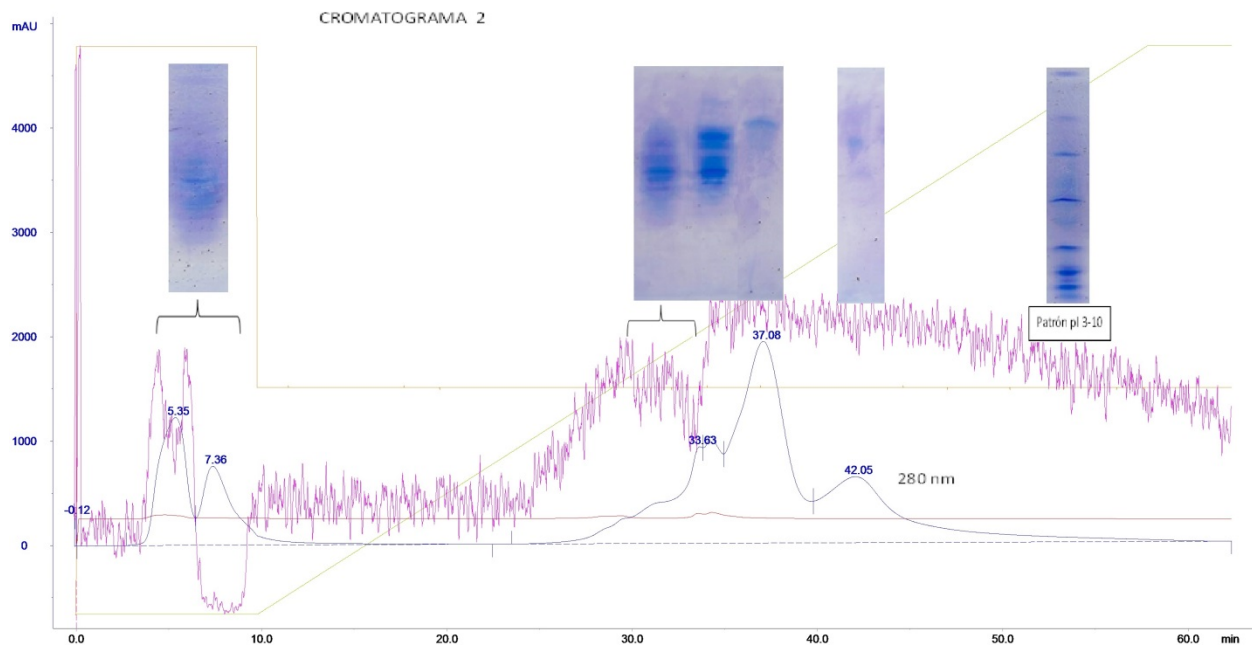


Fig. 7. Cromatografía de intercambio aniónico. Repetición del cromatograma 1.

Con el objetivo de mejorar la cromatografía se trabajó con un gradiente escalonado (0-15% B en 0,5 VC; 15-35% B en 0,5 VC; 35-75% B en 4 VC; 75-100% B en 1 VC), lográndose la separación de dos picos en el no retenido y una mejor resolución de los picos retenidos (figura 8, cromatograma 3). La actividad siguió siendo positiva en el no retenido (siendo mucho mayor en el segundo pico del mismo) y en los dos primeros picos retenidos (siendo mayor en el segundo pico, el cual mostró el perfil de bandas de isoelectroenfoco característico de la muestra)

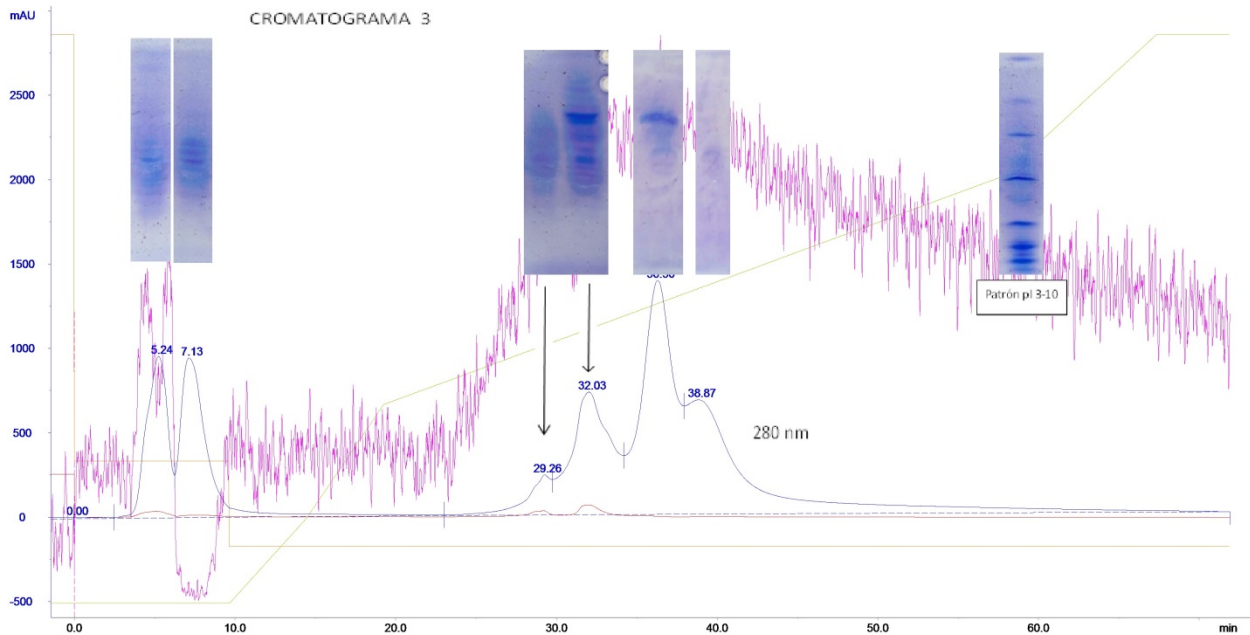


Fig. 8. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado (buffer Bis-Tris 0,02 M pH 6,5).

Debido a que gran parte de la actividad caseinolítica se perdía en la porción no retenida, se realizó un cambio de buffer de corrida. El buffer seleccionado fue el Tris-HCl 0,02 M pH 7,6. Para la elución se utilizó el mismo con el agregado de NaCl 1 M. El perfil obtenido se muestra en la figura 9 (cromatograma 4). Se obtuvo solamente un pico retenido no significativo, considerando la alta absorbancia a 280 nm de la porción no retenida.

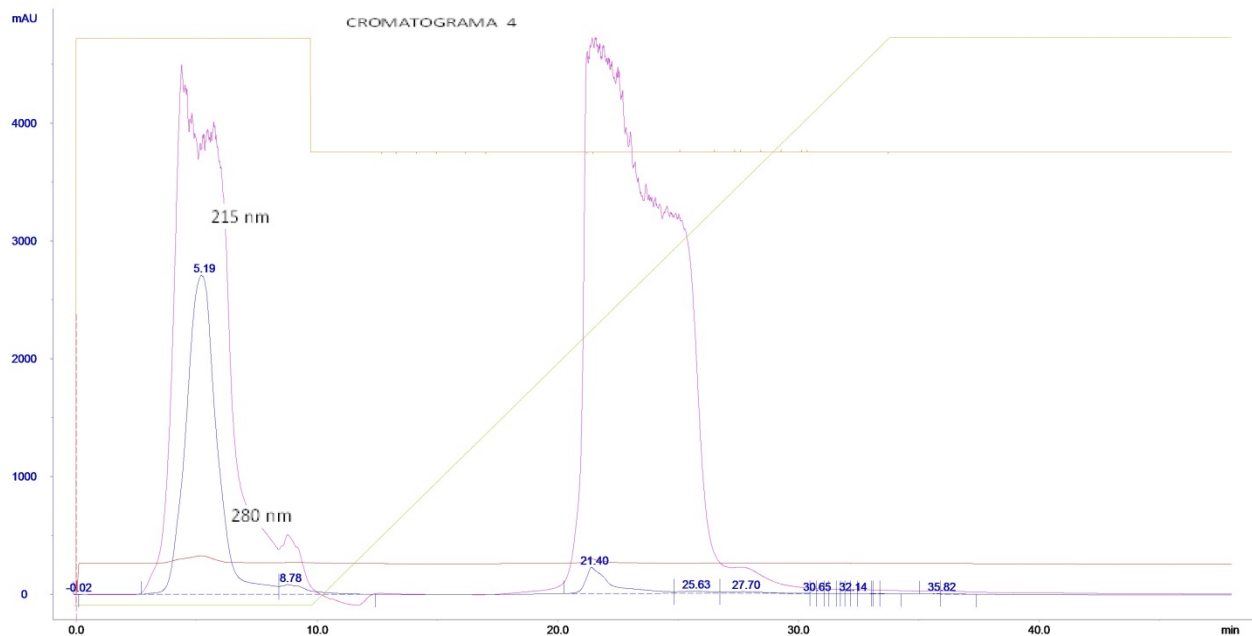


Fig. 9. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando buffer Tris-HCl 0,02 M pH 7,6.

Suponiendo que el perfil obtenido era debido a la competencia entre el buffer en el cual estaba redisuelta la muestra y el de corrida, se reprecipitó la muestra y se redisolvió en el buffer de corrida. El perfil cromatográfico obtenido fue similar al cromatograma 4. Considerando entonces que la columna no se hallaba en óptimas condiciones, se realizó una nueva corrida con una columna nueva. El resultado fue el mismo. Debido a esto se decidió descartar los buffers Tris-HCl usados y preparar nuevos bajo la suposición de alguna contaminación de los mismos.

La figura 10 (cromatograma 5) muestra el perfil obtenido al usar como buffer de corrida Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 y 100 µl de siembra. El pico retenido demostró tener actividad proteolítica, no así la porción no retenida.

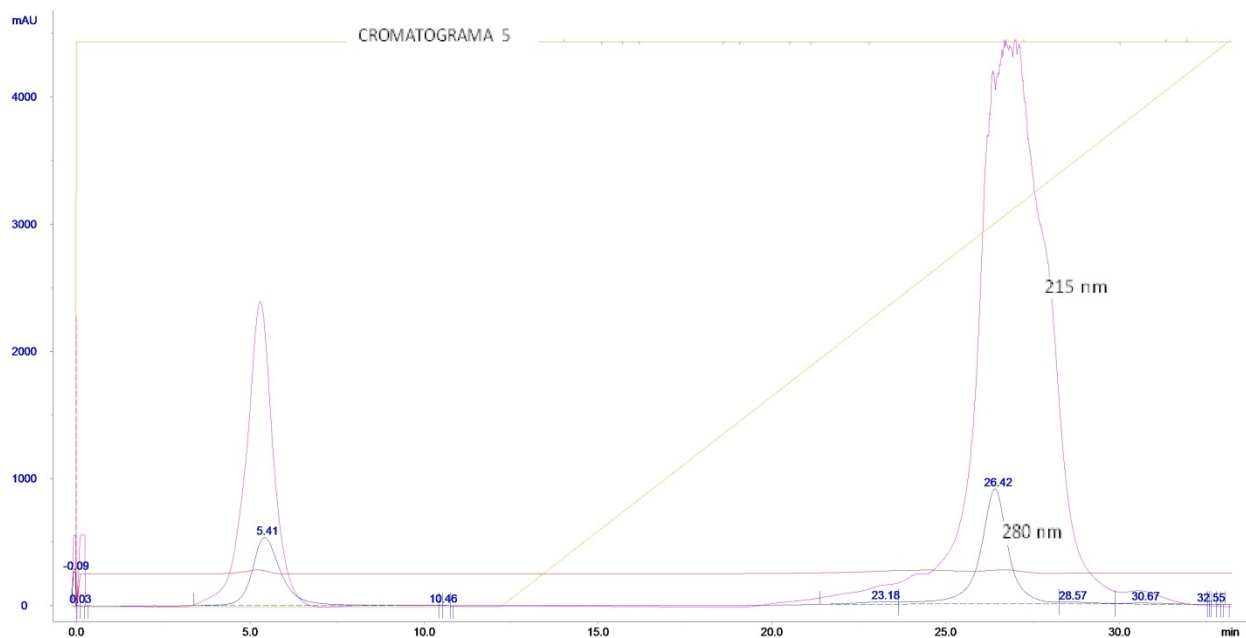


Fig. 10. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando buffer Tris-HCl 0,02 M pH 8,0.

Se ensayó una nueva corrida pero utilizando gradiente escalonado (0-35% B en 0,5 VC; 35-80% B en 4,5 VC; 80-100% B en 0,5 VC) para aumentar la resolución de los picos. No se logró recolección de nuevos picos (figura 11, cromatograma 6). Toda la muestra quedaba retenida en la columna. El pico retenido presentó actividad caseinolítica y el perfil isoelectroforético característico.

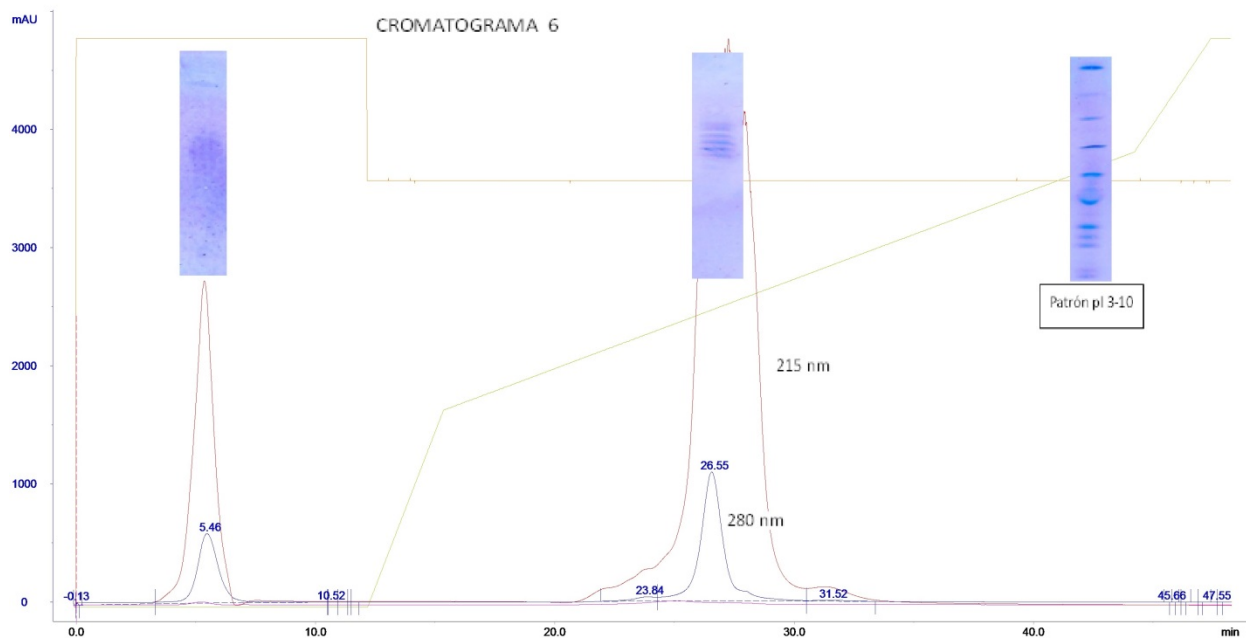


Fig. 11. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado.

Como próximo paso se optó por realizar una corrida con el mismo buffer pero a pH 7,5. Se logró la recolección de una porción no retenida y dos picos retenidos (figura 12, cromatograma 7). Al realizar la misma con el gradiente escalonado (0-40% B en 0,5 VC; 40-65% B en 5 VC; 65-100% en 0,5 VC), se obtuvo mayor resolución en el no retenido pero no así en los picos retenidos de interés (figura 13, cromatograma 8). Los picos 2 y 3 del cromatograma 7 presentaron actividad caseinolítica así como el pico 2 y 3 del cromatograma 8. Los isoelectroenfoces de ambos cromatogramas se encuentran en ensayo.

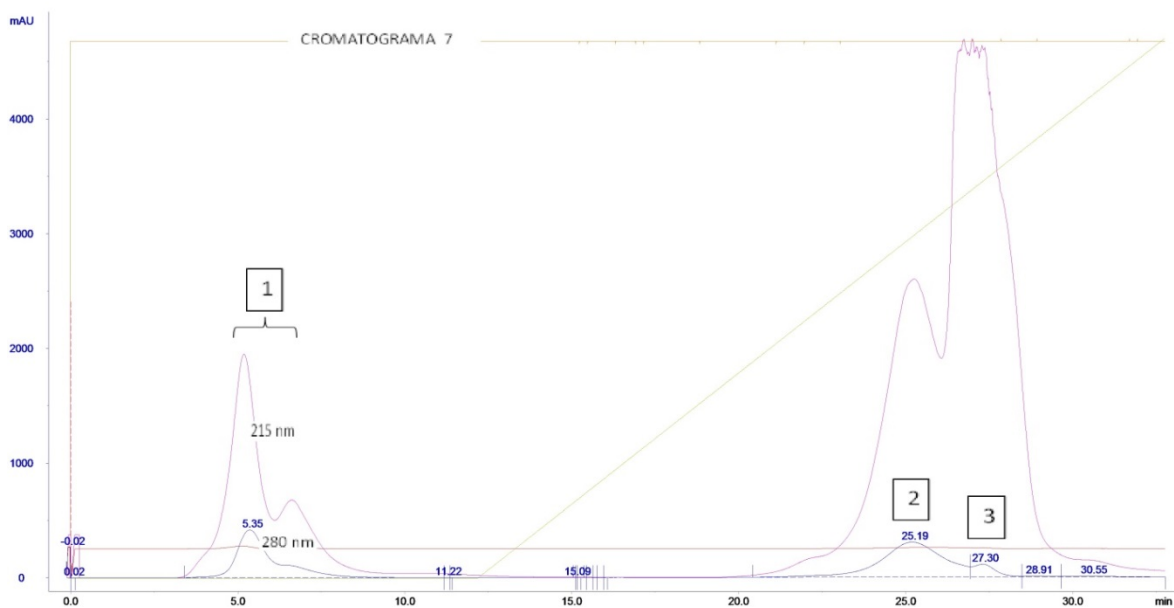


Fig. 12. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando buffer Tris-HCl 0,02 M pH 7,5.

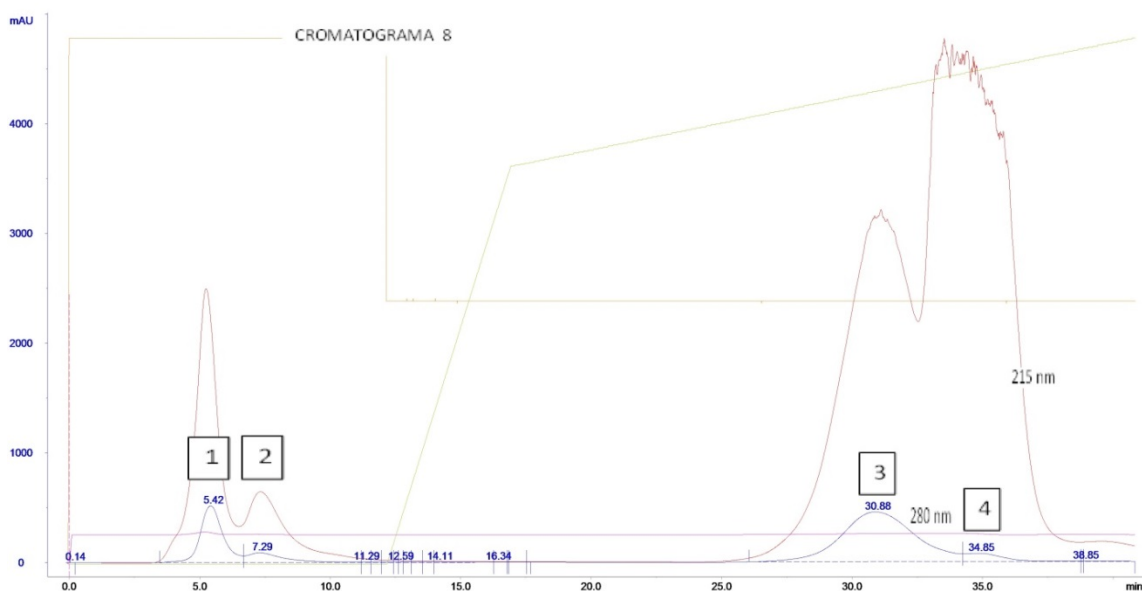


Fig. 13. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado.

De forma paralela a los ensayos expuestos, hemos terminado junto a mi directora la redacción de un trabajo científico próximo a enviarse para su evaluación y publicación. El título del mismo es: "**Balansain R as Hydrolytic Agent for the Production of Antioxidant Peptides from Bovine Whey**"

En mayo del 2013 hice uso de la licencia por maternidad (45 días, nacimiento por cesárea), por lo que el presente informe representa nueve meses y medio de trabajo.