

## **CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO**

### **Informe Científico<sup>1</sup>**

PERIODO <sup>2</sup>: 2015

#### **1. DATOS PERSONALES**

*APELLIDO: Aphalo*

*NOMBRES: Paula*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: La Plata CP: B1900ASS Tel:*

*Dirección electrónica (paphalo@gmail.com)*

#### **2. TEMA DE INVESTIGACION**

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

#### **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 N°: 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 Particular: Calle:*

*Localidad: La Plata CP: B1900AWZ Tel:*

*Dirección electrónica: mcacidca@gmail.com*

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

.....  
Firma del Investigador

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

<sup>2</sup>El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2014 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2012 al 31-12-2013, para las presentaciones bianuales.

## 6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

*Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.*

En Argentina, 34% de los adultos y 60% de los mayores de 60 años son hipertensos. La prevención y estudio de enfermedades cardiovasculares, fundamentalmente 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 convertidora de angiotensina (ACE) de brotes de amaranto y sus digeridos. Actualmente trabajo con aislados, hidrolizados y péptidos sintéticos (VIKP y ALEP) 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 músculo cardíaco y anillos de aorta. En paralelo me encuentro trabajando en colaboración con la Dra. Avanza en la caracterización estructural de cowpea (*Vigna unguiculata*) y con la Ing. Pinciroli en el estudio de la actividad biológica de arroz (Nutriar FCA yF) Programa Arroz.

## 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.*

En este período, y de acuerdo a los resultados ya descritos en el informe pasado (período 2014), se pudieron concretar los siguientes objetivos que pueden dividirse en varios ejes.

### Eje 1 Estudio de la posible capacidad inhibitoria de péptidos de amaranto sobre diferentes enzimas del sistema renina angiotensina (RAS)

1a. Brotos de amaranto y sus digeridos (*Amaranthus hypochondriacus*): Estos resultados, junto con la caracterización estructural de las proteínas contenidas en los brotes antes y después de una digestión gastrointestinal simulada, permitieron la elaboración de una publicación cuyos datos se incluyen en el inciso 8.1 del presente informe.

1b. Hidrolizado extensivo con alcalasa de amaranto en agua a pH 9 (*Amaranthus hypochondriacus*)

En una primera etapa de ensayos se realizó una caracterización de la muestra de partida para posteriormente analizar su posible actividad fisiológica.

*Composición centesimal*: Los cálculos se realizaron en base seca arrojando los siguientes valores: Proteínas  $80,5 \pm 2,2$  %, Cenizas  $10,3 \pm 0,3$  %, el valor remanente del 9.2% correspondería básicamente al contenido de hidratos de carbono totales ya que este hidrolizado se preparó a partir de una harina previamente desgrasada con hexano por lo que se espera un muy bajo contenido de lípidos.

*Caracterización estructural*: Se determinó, mediante el ensayo del o-phthaldialdehído OPA (Dinella 2002), el grado de hidrólisis alcanzado luego de 6 horas de hidrólisis enzimática obteniendo un valor de  $21 \pm 4$  %.

Con la finalidad de completar la caracterización cualitativa del hidrolizado obtenido, se realizó una electroforesis SDS-PAGE con tricina y una cromatografía de exclusión molecular. Los perfiles electroforéticos mostraron una disminución en la proporción de péptidos de mayor tamaño en comparación de lo encontrado en el aislado de amaranto;

luego de 6 horas de tratamiento enzimático se observó además que, los péptidos de naturaleza básica (20 kDa) son los más resistentes a la acción de la alcalasa.

El análisis de los resultados obtenidos por cromatografía, evidenciaron en el hidrolizado péptidos con masas moleculares entre 1855 y 179,14 Da, valores correspondientes a péptidos formados por 4-5 aminoácidos. De acuerdo a datos bibliográficos, éstos péptidos serían capaces de atravesar el epitelio intestinal y ser absorbidos sin sufrir ninguna hidrólisis posterior, y alcanzar el órgano blanco responsable de llevar adelante la actividad biológica (Vermeirssen y col. 2004; Mizuno y col. 2004 y Vij y col 2016)

**Actividad biológica.** Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron, mediante el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo*, la capacidad de este hidrolizado de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina I (ACE). Dado que la regulación de la presión arterial no depende solamente de la ACE, en este período se iniciaron estudios tendientes a determinar la posible capacidad de este hidrolizado de inhibir a otras enzimas como la renina y otro grupo de enzimas alternativas (ruta de las quimasas) cuyo producto final sería la formación de angiotensina II que es un potente vasoconstrictor.

Los resultados obtenidos nos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- El hidrolizado es capaz de inhibir a la renina presentando un comportamiento dosis-respuesta que nos permitió calcular un  $IC_{50} = 0,6$  mg/ml.
- Esta misma muestra no fue capaz de inhibir a la enzima principal de la ruta de las quimasas.

Otros estudios realizados sobre este mismo hidrolizado incluyeron:

- el análisis de los parámetros cinéticos de inhibición sobre renina.
- el fraccionamiento por HPLC de los péptidos que lo componen y la medida de actividad inhibitoria sobre la renina de cada fracción.

En conjunto estos resultados formarán parte de una futura publicación a concretarse en el transcurso del semestre en curso. Los mismos fueron realizados en colaboración con la Dra. Alejandra Quiroga, investigadora del CIDCA, quien trabaja bajo la dirección de la Dra. Añón.

Se analizó además la posible capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la renina de dos péptidos sintéticos VIKP y ALEP. Los mismos no fueron capaces de inhibir a esta enzima, pero si inhibieron la ACE (Vecchi y Añón 2009)

### **Eje 2 Estudio estructural de las proteínas mayoritarias del poroto cowpea (*Vigna unguiculata*).**

El trabajo en colaboración con la Dra. María Victoria Avanza de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en la caracterización estructural de las proteínas mayoritarias de una variedad de poroto cowpea (*Vigna unguiculata*) de interés regional fue publicado en el International Journal of Food and Nutritional Sciences cuya cita se hace mención en el inciso 8.1 del presente informe. Los resultados de este trabajo fueron presentados en un congreso internacional indicado en el inciso 8.5 del presente informe.

### **Eje 3: Análisis estructural y actividad biológica de proteínas de un cultivar de arroz (*Oryza sativa* L cv Nutriar FCA y F) con alto contenido de proteína luego de una digestión gastrointestinal simulada**

Las proteínas de arroz, poseen un alto valor nutricional además de ser hipoalergénicas. Se conoce que en la secuencia de estas proteínas, están contenidos péptidos con actividad biológica. Se trabajó con un cultivar de arroz, con alto contenido de proteína; desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (cv Nutriar FCAyF), obteniéndose tres muestras diferentes a partir de harina, previamente desgrasada y tamizada.

**Muestras:** a. Extracción a pH 12 en agua de la harina (relación 1:10- **muestra A**), b. Extracción con agua de la harina a pH 10 (relación 1:5) con agregado de alcalasa en una relación de 2 g enzima/ 100 g proteína. Tiempo de hidrólisis: 1 hora (**muestra H**) y c. Hidrólisis ácida de la muestra A a pH 2 con pepsina en una proporción de 10 g enzima/100 g de proteína. Tiempo de hidrólisis: 1 hora. Frenado de hidrólisis enzimática por cambio de pH a 5,5 (**muestra P**). Las tres muestras fueron neutralizadas y posteriormente liofilizadas.

A continuación, las muestras obtenidas fueron sometidas a una digestión gastrointestinal simulada. Se les determinó el contenido de proteínas, la composición polipeptídica (SDS PAGE tricina), grado de hidrólisis (ensayo de OPA), cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75), actividad antioxidante (ensayo de decoloración del radical ABTS) y medida de la capacidad inhibitoria sobre la enzima convertora de angiotensina ACE.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

- El grado de hidrólisis obtenido para cada una de las muestras fue: H  $10,68 \pm 1,0$  y P  $5,46 \pm 0,07$  mientras que para el caso de las muestras digeridas los valores fueron: Ad  $28,51 \pm 1,29$ ; Hd  $25,70 \pm 0,64$  y Pd  $28,64 \pm 2,07$ .
- Las muestras H y P mostraron péptidos de menor tamaño que la muestra A. El tamaño de los péptidos obtenidos luego de la digestión fue aún menor que los anteriores (con valores menores a los 5 kDa). Las muestras antes de la digestión mostraron perfiles cromatográficos diferentes entre sí sugiriendo que las mismas estarían conformadas por diferentes especies proteicas como resultado de los diferentes tratamientos aplicados.
- Las muestras digeridas mostraron una mejora en los valores obtenidos de porcentaje de solubilidad.
- Actividades biológicas (habría que sacar las viñetas que siguen, pues ambos puntos se corresponden con las actividades biológicas determinadas)

**Capacidad inhibitoria sobre ACE:** Las muestras H y P presentaron un mayor porcentaje de inhibición que la muestra A, a diferencia de las muestras digeridas cuyos porcentajes de inhibición no fueron significativamente diferentes.

**Capacidad antioxidante:** En este caso fueron las muestras H y P quienes presentaron la mayor capacidad antioxidante, a diferencia de lo observado luego de la digestión gastrointestinal simulada donde el aislado digerido presentó el valor más bajo de IC<sub>50</sub>.

El resumen de estos resultados se incluye en el inciso 8.4 (Trabajo 2); estos formarán parte de una futura publicación a concretarse en el transcurso del semestre en curso. Los ensayos descriptos fueron realizados en colaboración con la Dra. Alejandra Quiroga, investigadora del CIDCA, quien trabaja bajo la dirección de la Dra. Añón junto con la Ing. María Pincioli, docente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales quien además pertenece al Programa Arroz de dicha Facultad.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en un congreso internacional dato incluido en el inciso 8.5 del presente informe.

## **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.*

1. **Paula Aphalo**, E. Nora Martínez y Ma. Cristina Añón (2015) "Amaranth Sprouts: A Potential Health Promoting and Nutritive Natural Food" International Journal of Food Properties, 18:12, 2688-2698,

**Abstract**

Amaranth sprouts are an edible food with good nutritional qualities and potential biological activities of their proteins. The chemical composition, angiotensin converting enzyme inhibitory activity and antioxidant activity of the sprouts were determined. Sprouts showed a protein content similar to the seeds' on a dry basis (16%) and a high fiber content (17%). Amaranth sprout proteins presented a capacity to inhibit angiotensin converting enzyme activity similar to other plant proteins ( $IC_{50} = 0.9 \pm 0.6$  mg/mL). This capacity increased after in vitro gastrointestinal digestion ( $IC_{50} = 0.26 \pm 0.07$  mg/ mL). Besides other non protein molecules, the amaranth sprout proteins also presented ABTS+ scavenging activity (TEAC =  $0.32 \pm 0.05$   $\mu$ mol/mg) that increased after in vitro gastrointestinal digestion (TEAC =  $0.72 \pm 0.08$   $\mu$ mol/mg) and oxygen radical antioxidant capacity. According to these results amaranth sprouts are a nutritive food with potential health promoting properties.

*En ésta publicación participé en el diseño de los ensayos, la discusión de los resultados y en la escritura del trabajo. Cabe destacar que, la producción de estos brotes es una tarea bastante laboriosa debido al tamaño reducido de la semilla a analizar. Cabe señalar que son muy escasos los estudios existentes en bibliografía relacionados con la actividad biológica de los péptidos como potenciales compuestos activos (antihipertensiva y antioxidante) en brotes.*

2. María V. Avanza, Belén A. Acevedo, María G. Chaves, **Paula Aphalo** y María C. Añón.(2015) " Physicochemical and structural properties of major protein fractions of two varieties of NEA- cowpea (*Vigna unguiculata* L): a comparative study" International Journal of Food and Nutritional Sciences. Vol. 4, Iss 4 eISSN 2320-7876.

In both cowpea varieties, the globulin was the major protein fraction followed by albumins, glutelins and prolamins with  $48 \pm 2$  g/100 g,  $33 \pm 2$  g/100 g,  $8 \pm 1$  g/100 g and  $2 \pm 0.5$  g/100 g of the total seed protein content, respectively. Under non-reducing conditions, the CU and CO globulin fractions, showed four major polypeptides with molecular masses of  $80 \pm 3$ ,  $65 \pm 3$ ,  $56 \pm 2$  and  $52 \pm 2$  kDa and some polypeptides with molecular masses ranging 45-25 kDa. Albumin and globulin fractions of CU showed the lowest values of enthalpy ( $\Delta H$ ) suggesting an initial partial denaturation. Globulin fraction showed a higher content of aromatic amino acids than the albumin fraction, displaying a more hydrophobic behaviour. Results provide useful data that will be supplemented with further studies on functional properties of these proteins fractions, followed by the development of legume protein products.

*Esta publicación fue el resultado de una colaboración con el grupo de la Dra María Victoria Avanza, investigadora del CONICET – CCT Corrientes, quien trabaja con este producto del NEA (cowpea o caupí). Mi grado de participación estuvo relacionado con la caracterización estructural de este producto, la discusión y escritura de los resultados obtenidos.*

**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.

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

### **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 llevó a cabo la:

- Caracterización estructural del mismo mediante cromatografía de exclusión molecular, SDS- PAGE tricina y grado de hidrólisis alcanzado por ensayo de OPA..

En cuanto a su actividad biológica se pudo constatar:

- Determinación de la capacidad inhibitoria de los péptidos presentes en el hidrolizado de la enzima renina.

Los resultados obtenidos mostraron una inhibición de tipo competitiva de renina por peptidos de amaranto, dependiente de su concentración.

En base a estos resultados se realizó una separación de los péptidos que conforman el hidrolizado 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.

### **Trabajo 2**

En este trabajo el objetivo fue :

Otorgarle mayor valor agregado a un producto desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCA y F UNLP) en el marco del Programa Arroz utilizando una de las variedades desarrolladas, cv Nutriar).

Se realizaron tratamientos enzimáticos a diferentes pHs (con las enzimas alcalasa y pepsina) de manera de obtener la mejor condición de liberación de péptidos con posible actividad biológica, en particular antioxidante y antihipertensiva.

Los hidrolizados obtenidos, fueron posteriormente sometidos a una digestión gastrointestinal simulada con la finalidad de evaluar la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos detectados.

El trabajo incluye una caracterización estructural de los hidrolizados mediante electroforesis, cromatografía así como la determinación de los grados de hidrólisis

alcanzados y la 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.

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

*Evento:* 7° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA 2015). X Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA)

*Carácter de participación:* expositor

*Trabajo:* "Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre propiedades funcionales de harinas de *Cajanus cajan* y *Dolicho lab lab*"

*Autores:* Fernandez Sosa E.; Thompson C.; Acevedo B.A.; Aphalo P.; Chaves M.G.; Avanza M.V.

*Lugar:* Montevideo, Uruguay

*Fecha:* Octubre de 2015.

*Evento:* 7° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (INNOVA 2015). X Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA)

*Carácter de participación:* expositor

*Trabajo:* "Proteínas de arroz: propiedades biológicas y su posible aplicación tecnológica"

*Autores:* Pinciroli, M; Quiroga, A.V; Aphalo, Paula; Añón, Maria Cristina.

*Lugar:* Montevideo, Uruguay

*Fecha:* Octubre de 2015.

**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.*

## **9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**

**9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación 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**
  
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.*
  
15. **CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
  
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. 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 TÍTULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

Durante este período inicié la Especialización en Docencia Universitaria (UNLP) habiendo cursado y aprobado las siguientes materias:

- Desarrollo e Innovación Curricular. (sin final rendido)
- Diseño y coordinación de procesos formativos (9 nueve)

**22. TÍTULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicité 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 EN MODELOS ANIMALES.**

**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 e in vivo.
- 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, chíca 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 dos 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 normotensas e hipertensas espontáneas (SHR) y por clipado renal mediante ensayos *in vivo* y *ex vivo*, 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 ALEP, VIKP o el hidrolizado enzimático y se medirá la presión indirecta cada 1 h en un período de 8 h. También se administrarán las distintas muestras por gastrostomía y se medirá la presión directa mediante canulación carotídea.

Para descartar efectos cardíacos ocasionados por las muestras se determinará el volumen minuto y la acción de las diferentes muestras en músculos papilares obtenidos de ventrículo izquierdo de corazón de acuerdo al procedimiento descrito por Fritz y col. (2011).

Los modelos animales más utilizados para el estudio de la presión arterial es el constituido por ratas hipertensas espontáneas (SHR). En este estudio utilizaremos dicho modelo animal y un segundo modelo constituido por ratas hipertensas por clipado de la arteria renal. Se trabajará con un modelo de 2 riñones-2 clips en arteria renal, sin nefrectomía. Este modelo de hipertensión por isquemia renal y activación del sistema renina-angiotensina, podría ser especialmente susceptible al eventual efecto inhibitor de ACE. Como control se utilizarán ratas normotensas.

#### 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 CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub> (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 (noradrenalina, acetilcolina, 10<sup>-4</sup>-10<sup>-8</sup> M) y se realizará una curva *dosis-respuesta* (concentración-fuerza). Se llevarán a cabo además experimentos en presencia de las muestras. En experimentos adicionales se determinarán las curvas concentración-fuerza

del agente vasoactivo luego de una preincubación de los anillos con las muestras adicionadas de 100 mM de L-NAME para inhibir la producción de NO endotelial (Fritz y col., 2011). Por último se analizará el efecto vasoactivo de las muestras en presencia de HOE-140, un potente antagonista de la bradiquinina.

*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 de la institución. Las ratas serán mantenidas en cajas de acero inoxidable con camas de viruta esterilizada, que se cambiará diariamente. El bioterio cuenta con aire acondicionado y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas respectivamente. 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.*

#### **- 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, 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 descriptas. 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., Martínez 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-phthalaldehyde 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: [infinvest@cic.gba.gob.ar](mailto:infinvest@cic.gba.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 peticionar 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.