

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Perfeccionamiento

PERIODO 2013-2015

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:* 01/04/2014

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: UNLP

Facultad: Cs. Exactas

Departamento: Cs. Biológicas

Cátedra: -

Otros: CIProVe (ex 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: 43 **N°:** 183

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.)

"Balansain R as Hydrolytic Agent for the Production of Antioxidant Peptides from Bovine Whey". Anabela Prospitti, Lorena N. Cancelarich, Jonatan Perrando, Néstor O. Caffini, Marcelo F. Pardo, and Claudia L. Natalucci

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

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

"Enzimas vegetales capaces de degradar colágeno y queratina". Errasti, M. Eugenia; de Araújo Viana, Carolina; Torres, M. José, Prospitti, Anabella; Natalucci, Claudia; Caffini, Néstor; Viana Ramos, Marcio; López, Laura M.I., póster presentado en el 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio) los días 9 y 10 de diciembre del 2014 en la ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

"Proteolytic fraction isolated from Phytolacca dioica L. berries" Prospitti, A.; Errasti, M.E.; Natalucci, C.L., póster presentado en la L Reunion Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) del 11 al 14 de noviembre del 2014, en la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina.

"Fitoproteasas e inhibidores de proteasas (IPs)". Prospitti, A. 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 del 2014, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

"Nueva fitoproteasa de Phytolacca dioica y su acción hidrolítica sobre suero lácteo". Prospitti, A.; Errasti, M.E.; Pardo, M. F. y Natalucci, C.L.; 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)

Asistencia a las Jornadas de Celebración – 40 años de actividad del IMBICE. 28 y 29 de noviembre de 2014. La Plata, Bs. As., Arg. Certificado de asistencia.

"Proteolytic fraction isolated from *Phytolacca dioica* L. berries" Prospitti, A.; Errasti, ME.; Natalucci, C.L., póster presentado en la L Reunion Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) del 11 al 14 de noviembre del 2014, en la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina.

"Fitoproteasas e inhibidores de proteasas (IPs)". Prospitti, A. 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 del 2014, La Plata, Buenos Aires, Argentina

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)

Curso de Posgrado: "Estrategias de purificación de proteínas vegetales". Del 1 al 9 de noviembre de 2014. 45 horas presenciales. Facultad de Cs. Exactas, UNLP. Evaluación final aprobada (8).

Curso para profesionales: "Actualización en Diabetes". Organizado por la Fundación Weiner. 16 de octubre de 2014. 6 hs presenciales. Distrito I, La Plata. Evaluación aprobada.

Curso de Posgrado: "Introducción a la epistemología y a la filosofía de la ciencia". Agosto y septiembre de 2014. 30 horas presenciales. Facultad de Cs. Exactas, UNLP. Evaluación final aprobada (10).

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)

El laboratorio del cual soy integrante ha sido recientemente ascendido a la categoría de Centro por decreto de la Universidad Nacional de La Plata. A partir de febrero del 2015 ha

sido aprobado el Consejo Directivo del CIProVe (Centro de Investigación de Proteínas Vegetales), en el cual he sido elegida como consejera por mi calidad de becaria doctoral.

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 y Purificación de Proteasas Contenidas en 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.

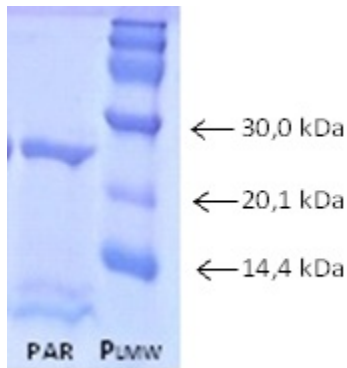


Fig. 1: Electroforesis. PAR: precipitado acetónico redissuelto; P_{LMW}: patrón proteico de bajo peso molecular.

Se le realizó además un 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).

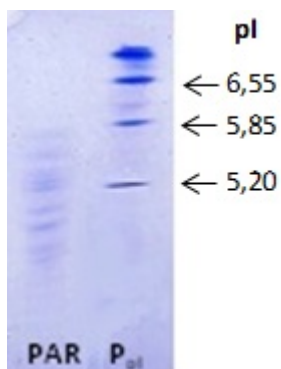


Fig. 2: Isoelectroenfoque. PAR: precipitado acetónico redissuelto; P_{pi}: patrón de pI rango 5-10.

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.

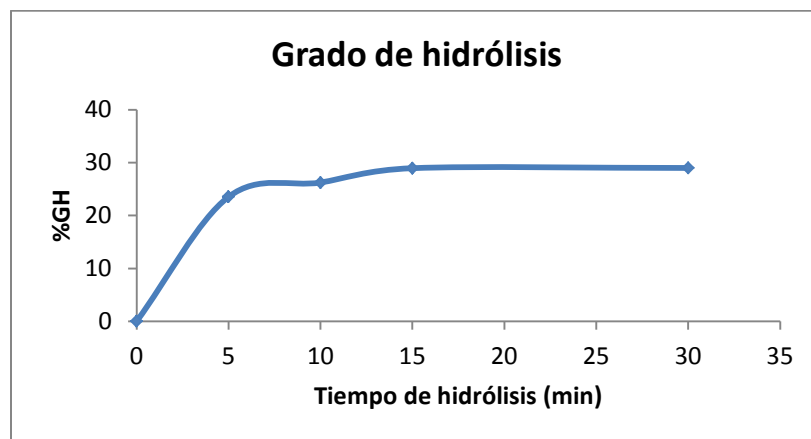


Fig. 3: %GH vs tiempo de hidrólisis.

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.

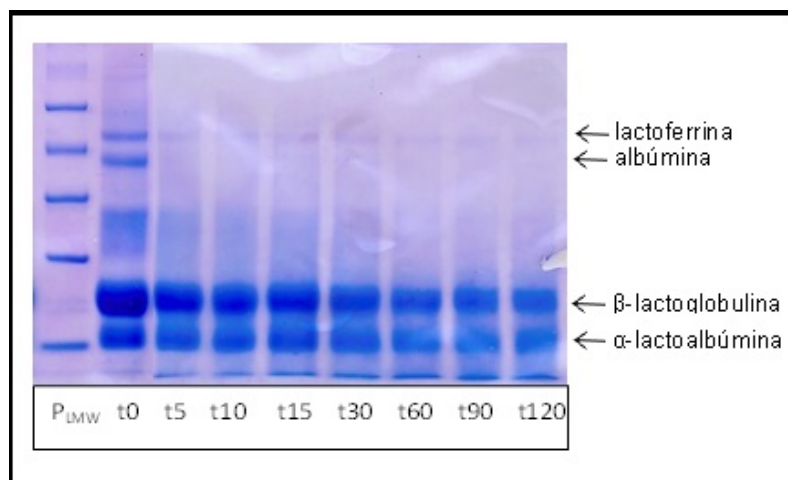


Fig. 4. Electroforesis de hidrolizados obtenidos. t₀, t₅, t₁₀, t₁₅, t₃₀, t₆₀, t₉₀, t₁₂₀ corresponden a las muestras obtenidas a los 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos de hidrólisis. P_{LMW}: patrón de bajo peso molecular.

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.

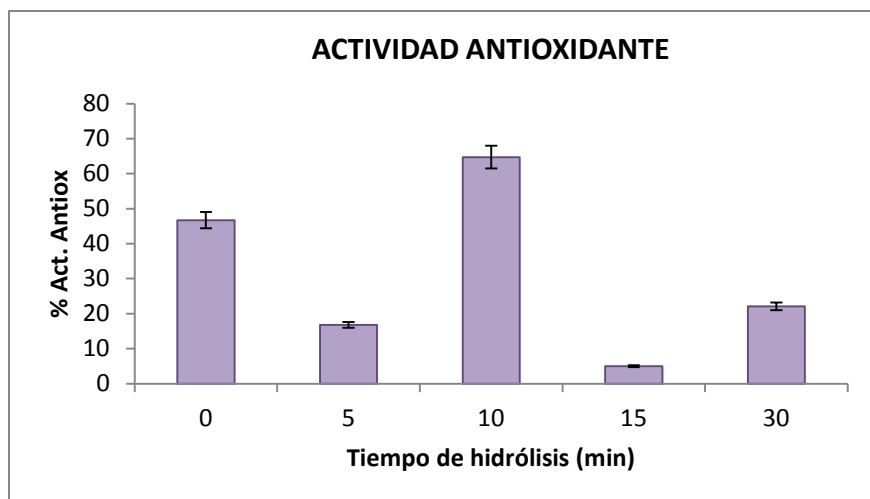


Fig. 5. Actividad antioxidante en función del tiempo de hidrólisis.

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

Cromatografía de intercambio aniónico con buffer Bis-Tris

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 isoelectroenfoque 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.

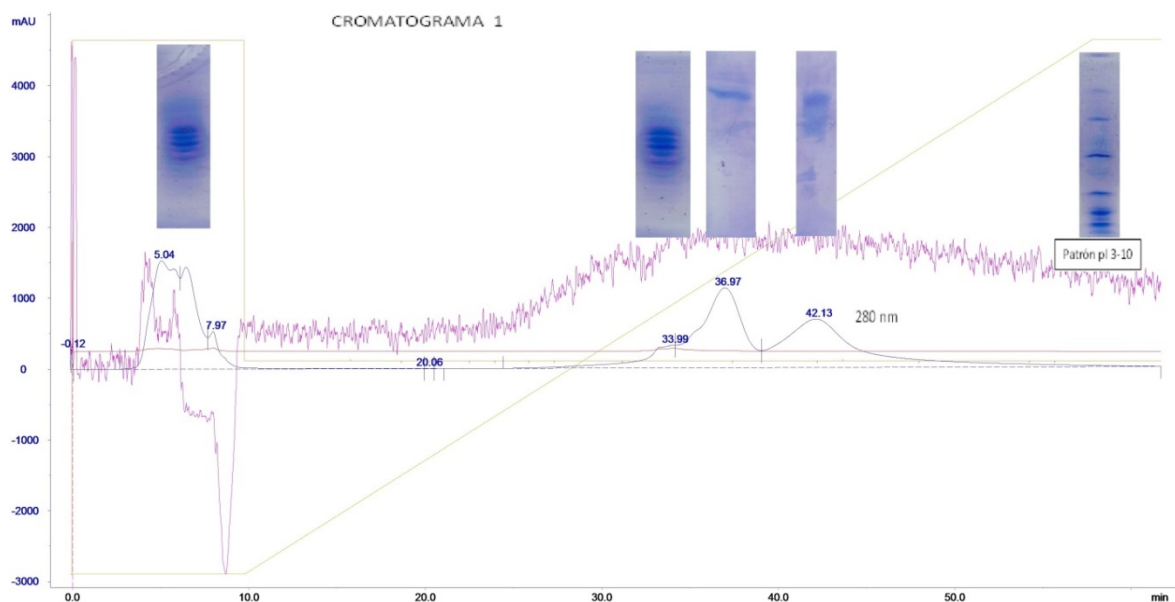


Fig. 6. Cromatografía de intercambio aniónico usando buffer Bis-Tris 0,02 M pH 6,5.

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) 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).

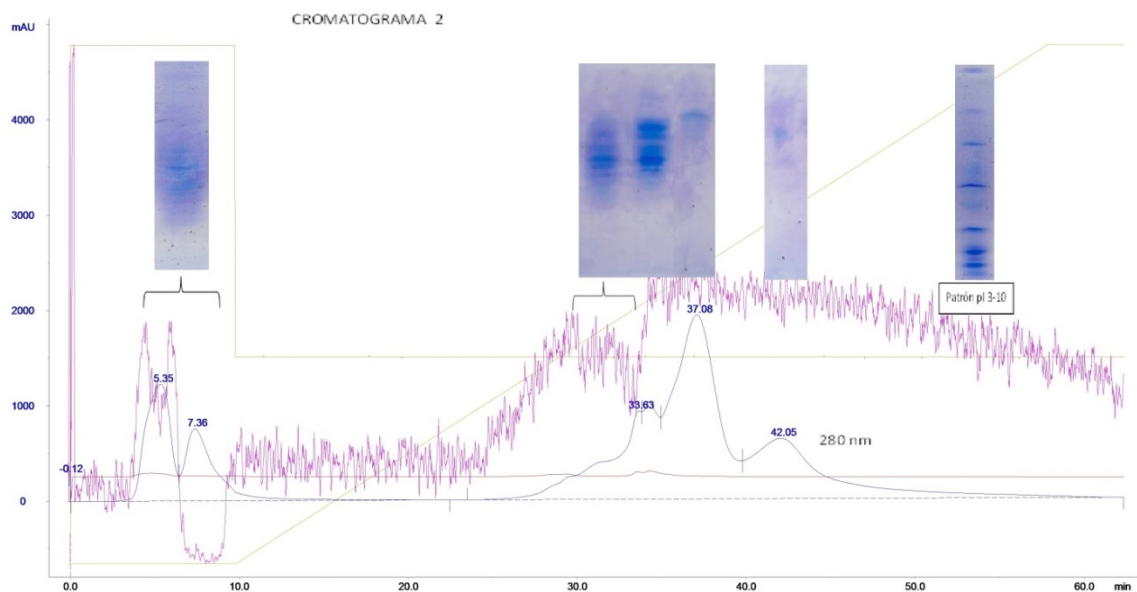


Fig. 7. Cromatografía de intercambio aniónico. Repetición del cromatograma 1.

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). 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 isoelectroenfoque característico de la muestra)

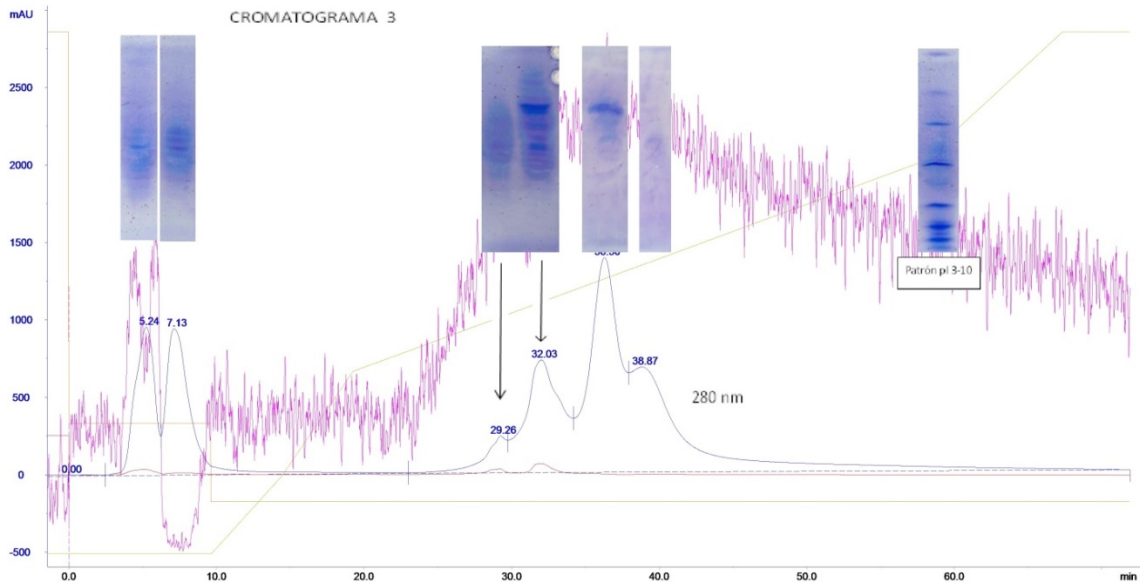


Fig. 8. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado (buffer Bis-Tris 0,02 M pH 6,5).

Cromatografía de intercambio aniónico con buffer Tris-HCl

Debido a que empleando el buffer Bis-Tris una parte considerable de la actividad proteolítica se pierde en la porción no retenida, se decidió realizar un cambio de buffer de corrida. El buffer seleccionado fue el Tris-HCl 0,02 M y la primera corrida cromatográfica se realiza a pH 7,6. Para la elución se utilizó el mismo buffer variando la conductividad por el agregado de cantidades variables del citado buffer conteniendo NaCl 1 M. El gradiente utilizado fue 0% a 100% de NaCl en 5 volúmenes de columna. El perfil obtenido se muestra en la figura 9. Se observa que solo se retiene una fracción poco significativa con absorbancia a 280 nm, quedando la mayor parte de los componentes peptídicos en un pico no retenido. Es de notar que al cambiar el sistema buffer, la detección a 215 nm se normaliza.



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

Suponiendo que el problema de la falta de retención de la muestra había sido causado porque el buffer en el cual estaba disuelta la muestra y el buffer de corrida no eran idénticos se cambió el buffer por reprecipitación de la muestra y redisolución en el buffer de corrida. El perfil cromatográfico obtenido fue similar al de la figura 9. En segundo término se consideró la posibilidad de que la columna no se hallara en óptimas condiciones para descartar lo cual se realizó una nueva corrida con una columna nueva. El resultado fue idéntico. Finalmente se decidió descartar los buffers Tris-HCl usados y preparar nuevos bajo la suposición de alguna contaminación de los mismos.

Para asegurar la retención de las proteínas de interés en el buffer de corrida recién preparado se aumentó el pH a un valor de 8. En la figura 10 se muestra el perfil obtenido utilizando Tris-HCl 0,02 M de pH 8,0 como buffer de elución, sembrando 100 μ l de muestra. En esta corrida se logró obtener una fracción no retenida sin actividad proteolítica, quedando toda la actividad en la columna.

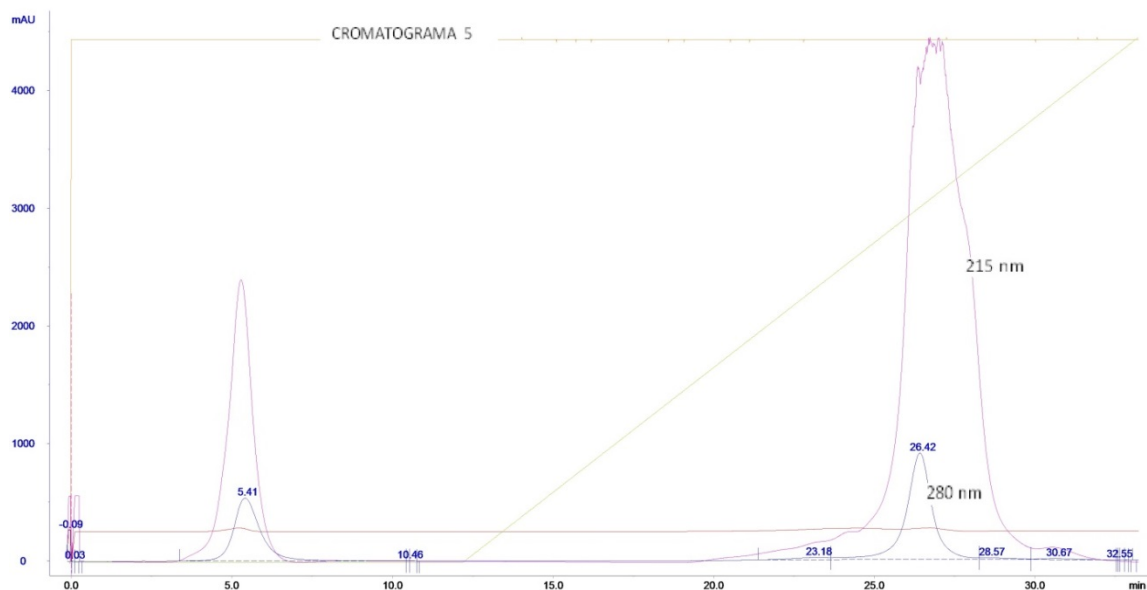


Fig. 10. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando buffer Tris-HCl 0,02 M pH 8,0.

Para lograr la resolución del pico retenido se realizó una nueva corrida utilizando gradiente escalonado (0 a 35% de B en 0,5 volúmenes de columna (VC); 35 a 80% de B en 4,5 VC; 80 a 100% B en 0,5 VC). No se logró incrementar el número de picos (figura 11). El pico retenido presentó actividad caseinolítica y el perfil isoelectroforético característico.

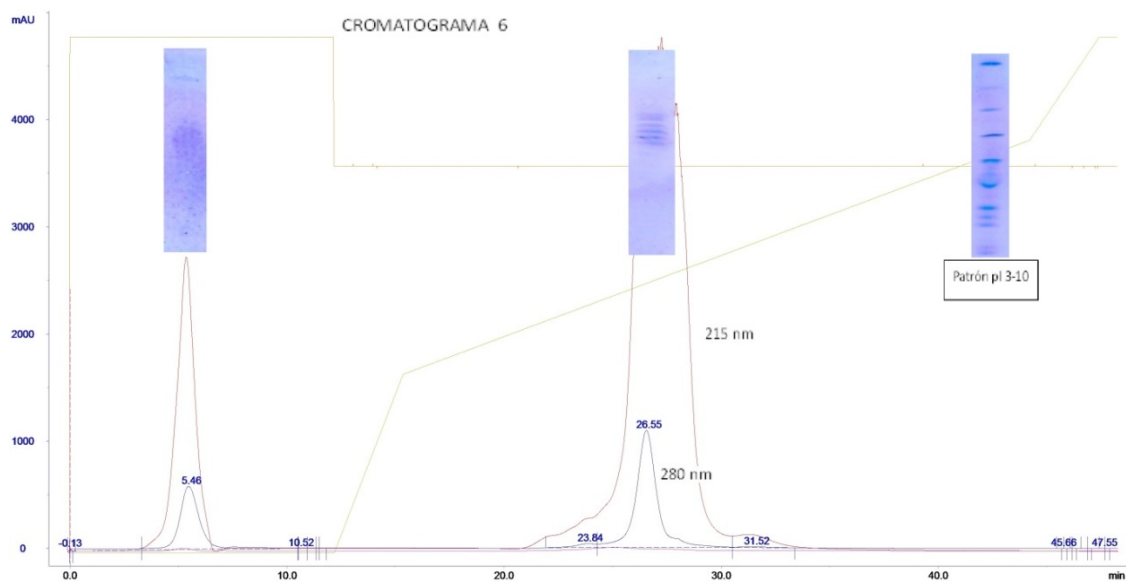


Fig. 11. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado.

Como próximo paso se procedió a realizar una corrida con el mismo buffer, disminuyendo el pH a un valor de 7,5 (similar al de la cromatografía 9). Se logró separar una fracción no retenida y dos retenidas (figura 12). Al utilizar un gradiente escalonado (0-40% de B en 0,5 VC; 40-65% de B en 5 VC; 65-100% de B en 0,5 VC) no se mejora la resolución de las proteínas retenidas (figura 13).

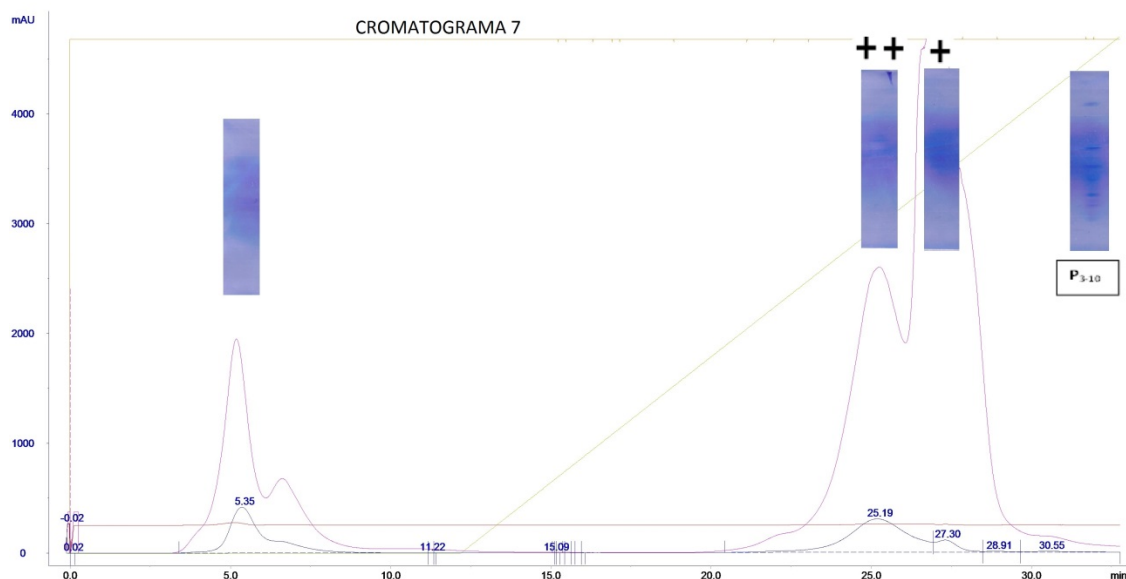


Fig. 12. Cromatografía de intercambio aniónico utilizando buffer Tris-HCl 0,02 M pH 7,5.

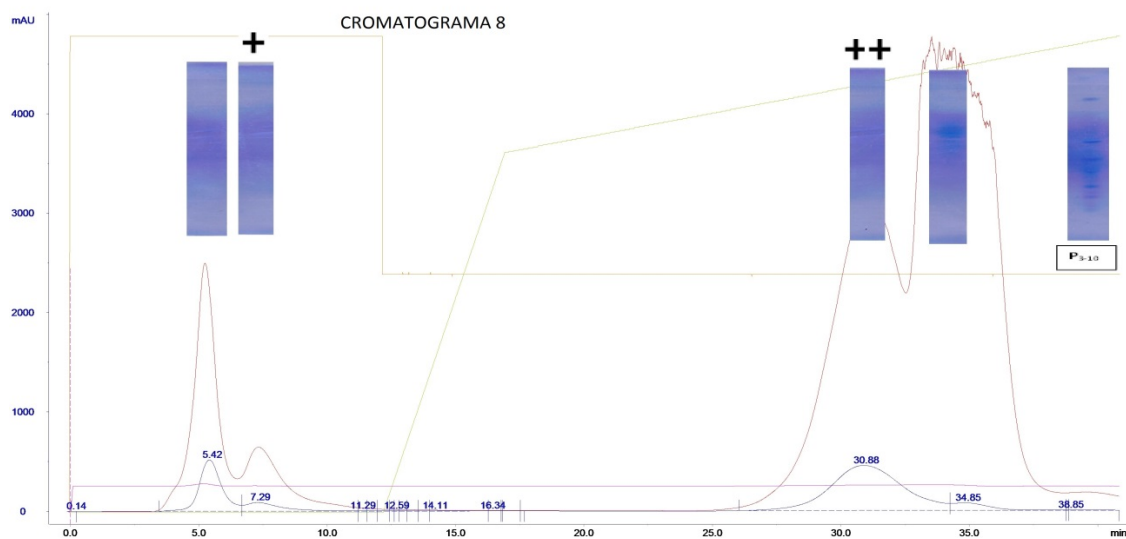


Fig. 13. Cromatografía de intercambio aniónico con gradiente escalonado.

En cuanto a la actividad proteolítica, las fracciones retenidas mostradas en la figura 12 presentaron actividad (indicada con el símbolo +) en tanto que en la cromatografía mostrada en la figura 13 se detectó algo de actividad en la fracción no retenida y esta actividad fue mucho mayor en la primera de las dos fracciones retenidas.

El análisis de los resultados obtenidos hasta el momento (figuras 9 a 13) nos hace pensar que la muestra puede tener alguna impureza que impide la resolución de la fracción proteica de interés y provoca resultados inesperados (tales como la distribución de la actividad entre la fracción no retenida y la retenida mostrada en la figura 13), por lo que se decide ultrafiltrar la muestra como paso previo a su siembra. Se utilizaron tubos de ultrafiltración Millipore MWCO 10000 Da. La muestra fue centrifugada a 8000 rpm hasta que el volumen se redujo a la mitad. Luego se lleva a volumen con el buffer de partida con el que se realiza la cromatografía (buffer Tris-HCl 0.02 M, de pH 7,5). Se repite el procedimiento una vez más desde la centrifugación y se recolecta el retenato en tubos eppendorf, llevando al volumen original con el mismo buffer.

La muestra obtenida fue cromatografiada en las mismas condiciones que la corrida anterior, obteniéndose en este caso tres picos retenidos, de los cuales sólo uno presentó actividad (figura 14). A este pico lo llamaremos **pico A**.

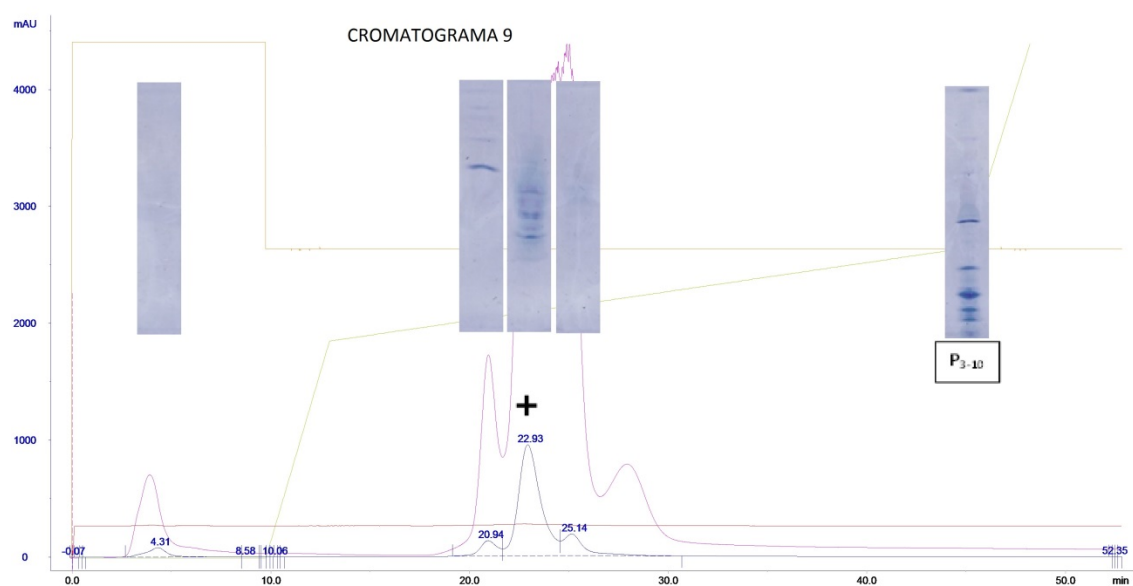


Fig. 14. Cromatografía de intercambio aniónico del PAR con gradiente escalonado.

Analizando por isoelectroenfoque dicha corrida se pudo determinar que la primera fracción obtenida presenta una banda de pI más ácido, que el pico A, el único con actividad proteolítica, no es puro sino que contiene un conjunto de polipéptidos, y que en el tercer pico no es visible ningún polipéptido.

El pico A (obtenido en un porcentaje de NaCl entre 46,9 y 48,1) fue recromatografiado sobre la misma columna, la que fue estabilizada con 40 % de NaCl previo a la corrida. No logró retenerse la muestra (figura 15).

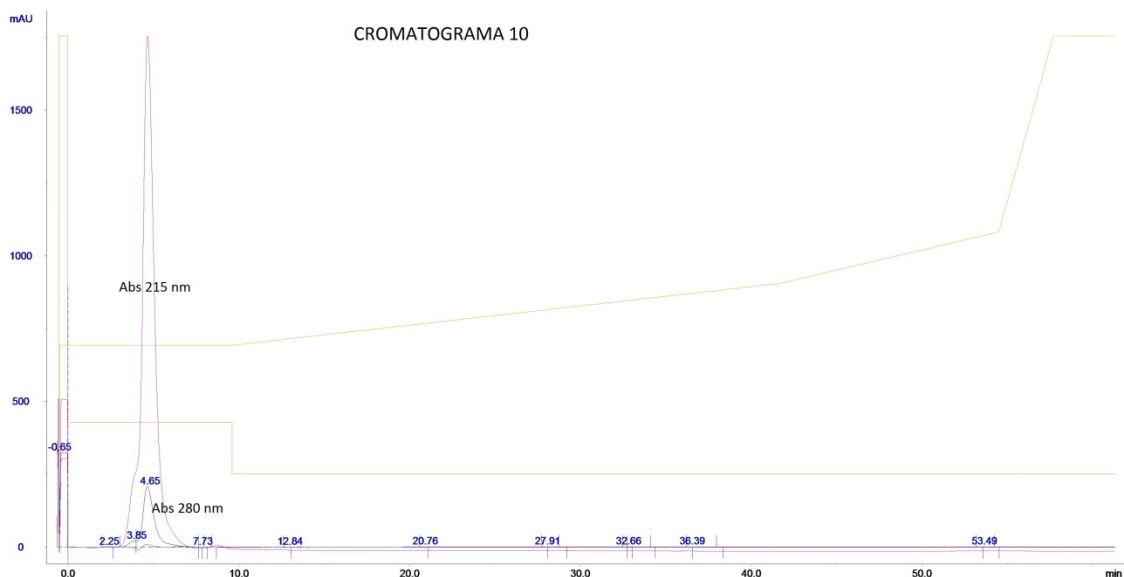


Fig. 15. Cromatografía de intercambio aniónico del pico A con gradiente escalonado.

Suponiendo que el resultado obtenido fue debido a que la muestra poseía NaCl se optó por desalarla usando tubos de ultrafiltración Millipore MWCO 10000 Da. Con la muestra desalada se hizo una nueva corrida en la cual la columna fue estabilizada con buffer sin NaCl y la elución se realizó utilizando un gradiente escalonado (figura 16).

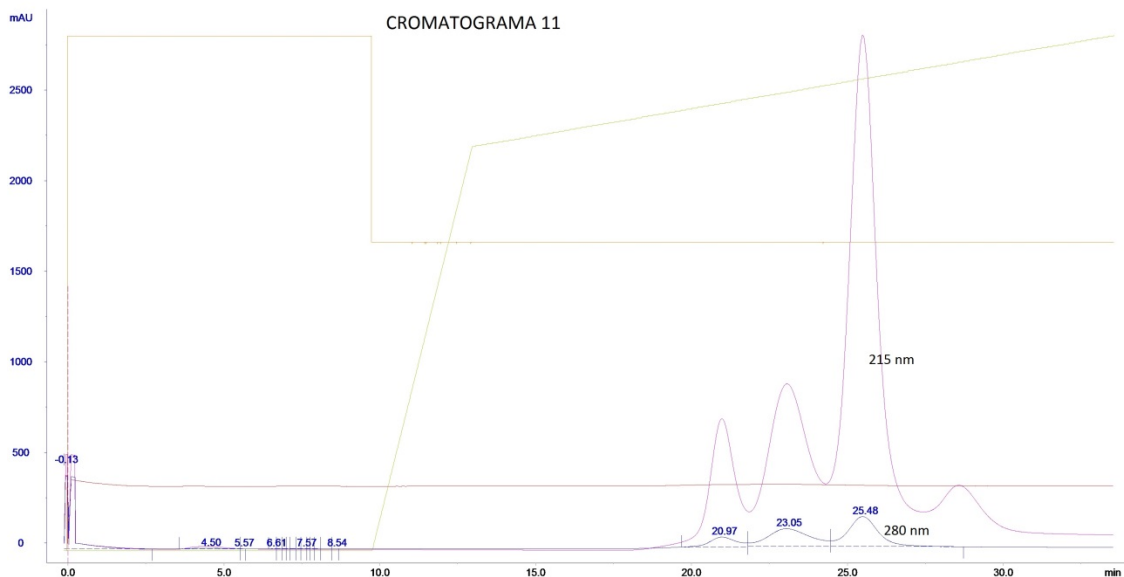


Fig. 16. Recromatografía del pico A con gradiente escalonado

El resultado de la cromatografía permitió la detección de tres picos con A280 y de cuatro cuando se analiza la A215. No se apreció actividad caseinolítica aparente en ninguno de los picos colectados. Esto pudo ser ocasionado por la dilución que sufre la muestra durante la corrida, por lo que se decidió recolectar nueva muestra y, en el momento del desalado, concentrarla 4 veces.

La cromatografía de la muestra concentrada (figura 17) mostró un pico retenido pero la resolución fue escasa aunque se logró recolectar tres fracciones siguiendo el perfil a 215 nm. Se determinó que la zona central poseía actividad.

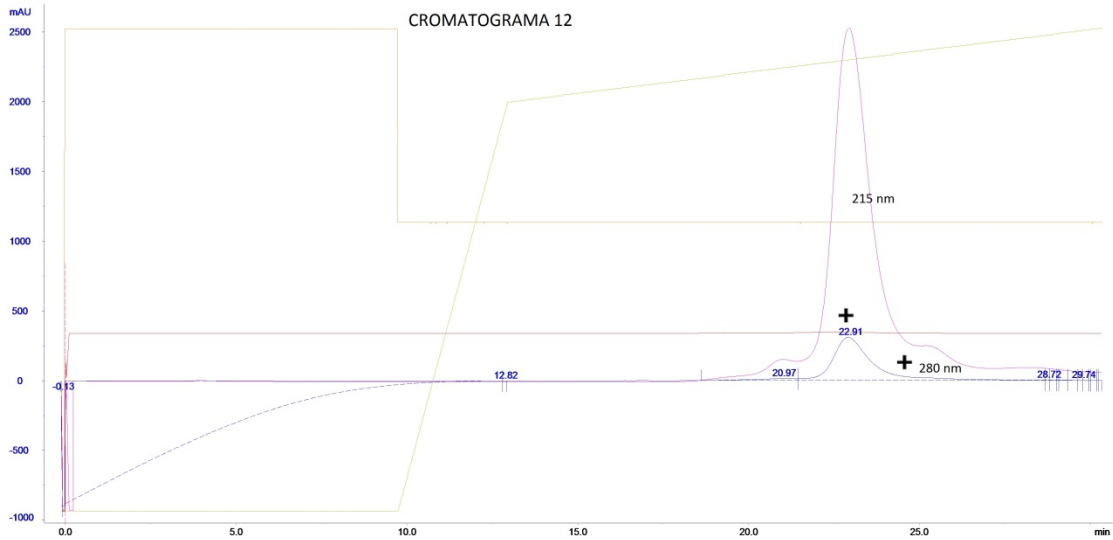


Fig. 17. Recromatografía del pico A concentrado 4 veces.

Se supuso que la concentración generada en la muestra al centrifugar para desalar pudo haber modificado el estado de las proteínas en la solución y así influido negativamente en la corrida. Con el objeto de subsanar esta situación se diluyó $\frac{1}{4}$ la muestra concentrada con buffer Tris-HCl 0,02 M pH 7,5, dejándola estabilizar durante una hora en baño frío, y se realizó nuevamente la corrida (figura 18).

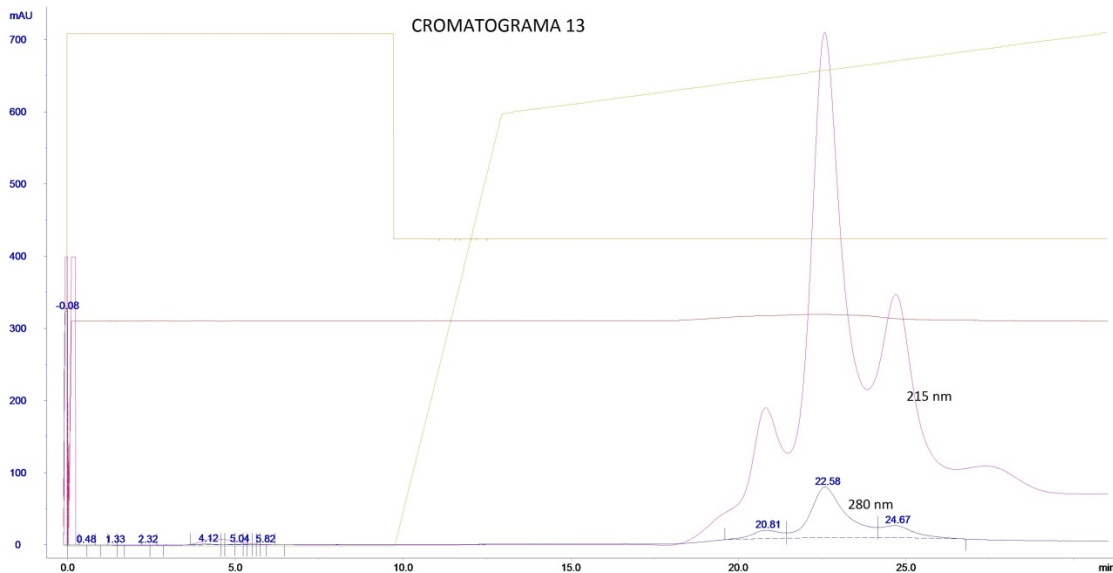


Fig. 18. Recromatografía del pico A concentrado restituido su volumen original.

La resolución se vio mejorada pero no se pudo apreciar actividad caseinolítica en ningún pico, por lo que se decidió recolectar nuevamente el pico de interés partiendo de un PAR con mayor actividad inicial.

El pico A así obtenido fue desalado y llevado al volumen original con el buffer de corrida (sin NaCl). Una vez preparada la muestra, se cromatografió en las mismas condiciones que anteriormente (figura 19). Se pudieron recolectar 4 fracciones: tres con absorbancia significativa a 280 nm y una con absorbancia a 215 nm únicamente. El pico de mayor intensidad a 280 nm probó tener actividad caseinolítica apreciable.

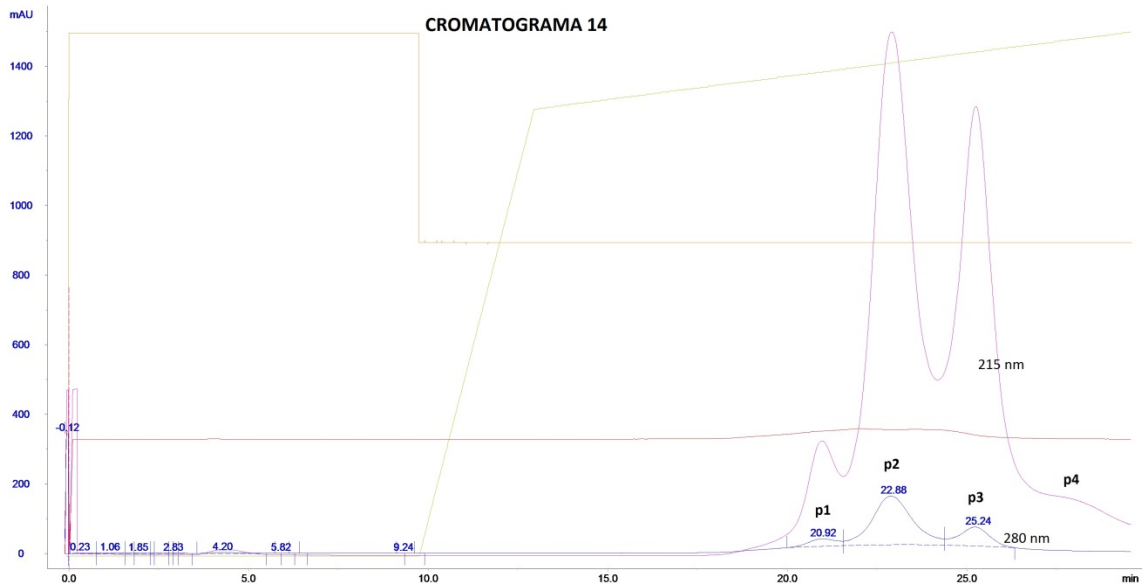


Fig. 19. Recromatografía del pico A.

Los picos colectados fueron sometidos a isoelectroenfoque y zimograma (sobre caseína). Los mismos se encuentran en repetición debido a dificultades con la tinción del isoelectroenfoque. Se presenta sólo el zimograma obtenido en base a un gel de isoelectroenfoque con anfolitos 4-6,5 (figura 20). Analizando dicha figura, se puede comprobar que la actividad presente en la fracción pA se halla también en la fracción p2.

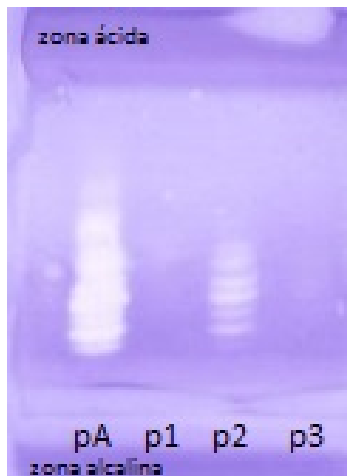


Fig. 20. Zimograma del pico A (pA) y los picos obtenidos por recromatografía del mismo (p1, p2 y p3).

Con el objeto de analizar el tamaño de las proteínas presentes en las muestras se realizó una electroforesis en gel de tricina desnaturalizante la que fue teñida con plata para tener mayor sensibilidad y poder observar las proteínas de las fracciones más diluídas por la recromatografía (p1, p2, p3 y p4).

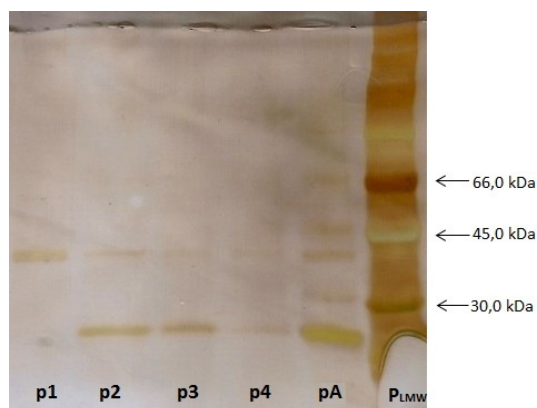


Fig. 21. Electroforesis en gel de tricina desnaturalizante con tinción de Ag. p1, p2, p3 y p4: picos obtenidos en la recromatografía del pico A; pA: pico A; P_{LMW}: patrón de bajo peso molecular.

Como puede observarse en la figura 21, el pico A contiene el polipéptido de ca. 25 KDa, característico de las proteasas cisteínicas; esta banda es muy intensa. Se observan también otras de menor intensidad a 31, 44 y 46 kDa. Se supone que las bandas de menor intensidad aparecerían también en la electroforesis de la muestra original (PAR), pero al no haber teñido anteriormente los geles con Ag, pudieron pasar desapercibidas; actualmente se está realizando el ensayo para comprobar esto. En el pico 1 sólo se puede observar la banda de 44 kDa y posiblemente la de 46 KDa; esta fracción no se presentó actividad. El pico 2 contiene la banda intensa de 25,7 kDa y fue el que demostró tener actividad apreciable. De aquí se podría inferir que las proteínas de 44 kDa no son activas frente a caseína y sí lo son las proteínas de ca. 25 kDa, lo que concuerda con la presencia de cisteinproteasas.

Analizando en conjunto los cromatogramas del PAR y del pico A obtenido a partir de éste, se observa que los perfiles son muy similares. Ambos cuentan con un pico principal a 280 y 215 nm (el cual es activo), dos picos accesorios y uno con absorbancia solamente a 215 nm. Esto llama la atención e hizo suponer en primer término que el pico A de alguna manera se contaminó con muestra original (PAR), lo fue descartado inmediatamente ya que se usó material descartable para coleccionar y ultrafiltrar cada muestra. ¿A qué se debe este efecto entonces? Dado que el pico A tiene actividad proteolítica se pensó en la proteólisis. Para comprobar esta posibilidad se decidió realizar una cromatografía de intercambio aniónico con PAR previamente inhibido con E64 y luego una electroforesis nativa con las fracciones obtenidas.

En la figura 22 está representado el cromatograma obtenido al sembrar el PAR ultrafiltrado e inhibido con E64 1mM. Se observan dos picos retenidos (el primero ancho y con un hombro) con absorbancia a 280 y 215 nm y el segundo casi sin A280. Actualmente se está por realizar el isoelectroenfoque que permitirá sacar conclusiones respecto a este ensayo.

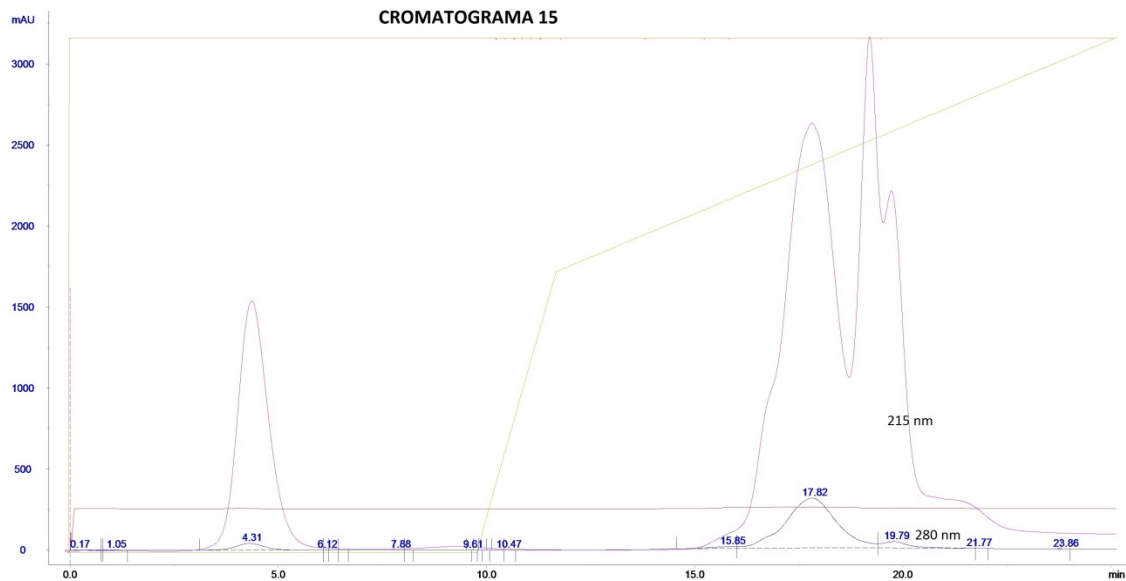


Fig. 22. Cromatografía de intercambio aniónico del PAR inhibido con E64.

Electroforesis nativa en gel de Tricina

Otra hipótesis que se planteó fue la existencia de uniones moleculares (entre subunidades) que se van rompiendo a medida que la muestra atraviesa la columna y que en una electroforesis desnaturizante no pueden ser percibidas. Para intentar comprobar este hecho se ensayaron tres muestras: PAR, PAR tratado con Tritón X100 1% y PAR tratado con NaCl 0,5 M. El uso de Tritón X100 y NaCl tiene como finalidad desestabilizar uniones no covalentes que pudieran estar presentes en la muestra y así poder separar subunidades. Las muestras conteniendo los reactivos antes mencionados reposaron en heladera durante 30 minutos para permitir la acción de dichos reactivos, luego se les agregó igual cantidad de buffer de muestra para electroforesis nativa (Tris-HCl 125 mM de pH 8,5 conteniendo azul de bromofenol 4 g/L y glicerol 200 ml/ L). Como es habitual en este tipo de electroforesis, las muestras no fueron sometidas a ebullición.

Para la electroforesis se utilizó un sistema compuesto por un gel de apilamiento (4% T, 3% C) y un gel de separación (10% T, 3% C). La misma fue desarrollada de la manera como es habitual.

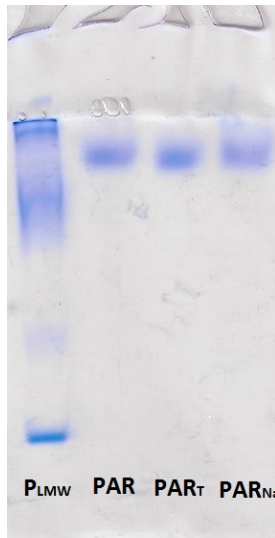


Fig. 23. Electroforesis nativa en geles de tricina. PAR: precipitado acetónico redissuelto; PAR_T: PAR tratado con Tritón X100 1%; PAR_{Na}: PAR tratado con NaCl 0,5 M. P_{LMW}: patrón de bajo peso molecular. El patrón de peso molecular fue sembrado sólo como testigo de la corrida.

Como puede verse en la figura 23, no se encontraron diferencias entre las muestras, lo que hace pensar que no hay subunidades conectadas por uniones no covalentes.

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Con el fin de lograr una mejor separación de las proteasas contenidas en el extracto, se utilizaron columnas de interacción hidrofóbica. La muestra sembrada fue el PAR, el cual fue precipitado nuevamente con 5 volúmenes de acetona y resuspendido en buffer de inicio (buffer fosfato de sodio 50 mM de pH 7,0 adicionado con sulfato de amonio 1 M). Como buffer de elución se utilizó buffer fosfato de sodio 50 mM a pH 7,0. Se usó una columna Hi Trap HIC Phenyl FF (high sub) de GE Healthcare. Al ingresar la muestra a la columna, se observaron múltiples fisuras en la misma y toda la muestra salió en el no retenido. Se probó con otras columnas, Hi Trap HIC Octyl FF y Hi Trap HIC Butyl FF, para ver si el cambio de ligando favorecía la retención de la muestra pero ocurrió lo mismo. Al lavar las columnas con varios volúmenes de buffer de elución, se apreció la reconstitución macroscópica de los rellenos, lo que hizo suponer que había algo en la muestra que provocaba el cambio. Asociando este dato con la mejora de la resolución que se obtuvo en las columnas de intercambio aniónico al ultrafiltrar la muestra, se procedió a ultrafiltrar el PAR antes de la cromatografía, lo que se realizó como ya se indicó, pero filtrando la muestra con agua bidestilada y luego completando el volumen con el buffer de inicio (de alta concentración salina) para así no perder sales necesarias para la cromatografía de interacción hidrofóbica.

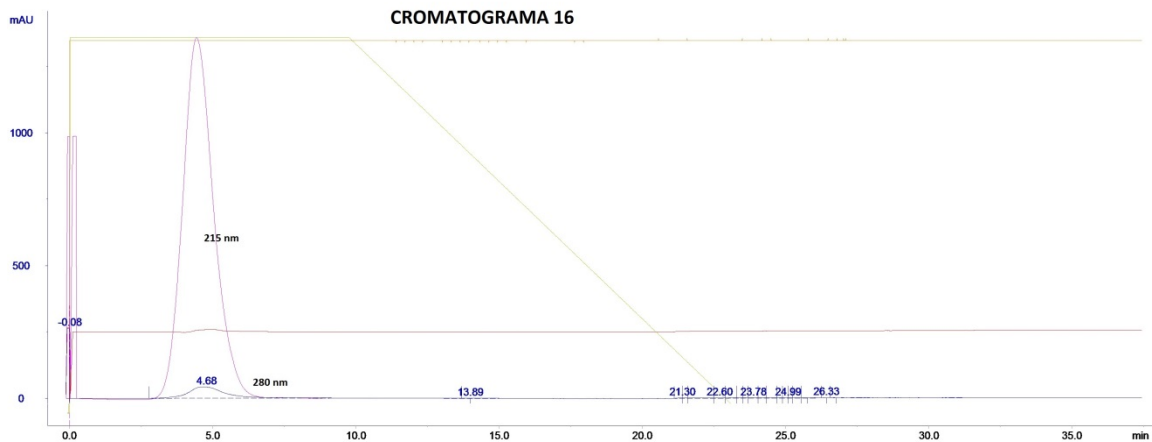


Fig. 24. Cromatografía de interacción hidrofóbica.

Como puede apreciarse en la figura 24, la variante aplicada no permitió la retención de las proteínas en la columna pero sí evitó el daño de las mismas. Debido a que no se obtuvieron resultados positivos con esta técnica, se decidió descartar la misma como método de purificación de la muestra en cuestión.

Cromatografía de Intercambio Catiónico

Buscando otra técnica con la cual lograr mayor purificación de las proteasas, se decidió probar con la cromatografía de intercambio catiónico. Estas experiencias aún se están realizando, pero aquí se presentan los resultados preliminares.

La columna seleccionada fue Hi Trap SP HP de 1 ml provista por GE Healthcare. El buffer de partida seleccionado fue el citrato de sodio 20 mM de pH 3,6. El mismo buffer con el agregado de NaCl 1 M se utilizó como buffer de elución.

La muestra sembrada fue el PAR ultrafiltrado. Se colectaron dos picos: uno no retenido y otro retenido (figura 25). Tanto la actividad caseinolítica como el isoelectroenfoque de dichos picos están en ensayo. Cabe destacar que sólo el pico no retenido tiene importante absorbancia a 215 nm, a diferencia de la cromatografía de intercambio aniónico en la cual todos los picos a 280 nm están acompañados por elevada absorbancia a 215 nm.

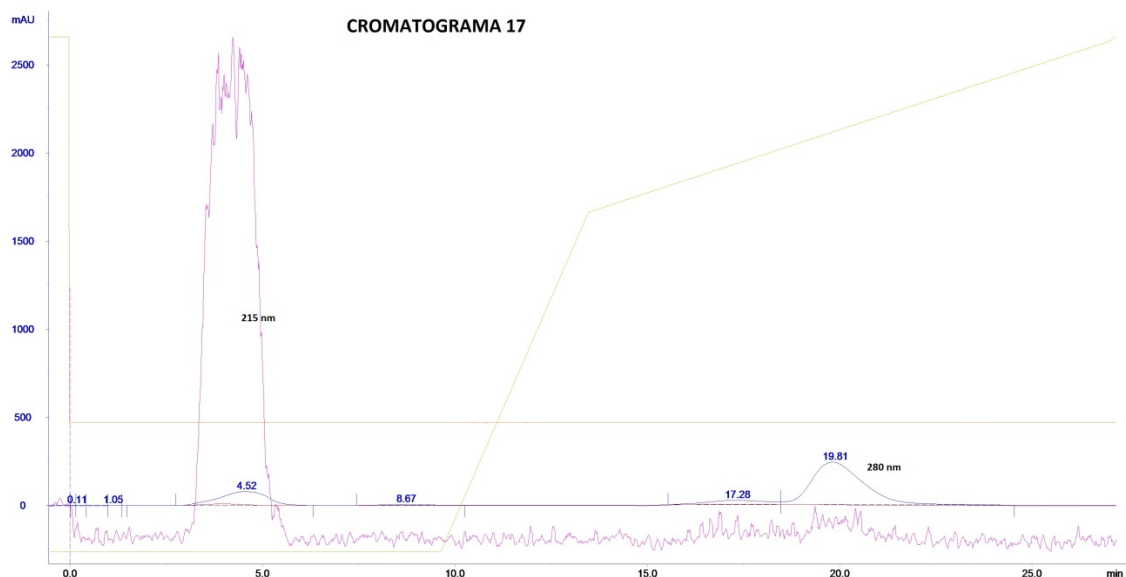


Fig. 25. Cromatografía de intercambio catiónico del PAR

En paralelo a los experimentos anteriormente expuestos, se encuentran en ensayo algunas pruebas de actividad biológica del extracto y de MALDI Imaging del fruto.

Actividad Antimicrobiana

Las cepas bacterianas fueron sembradas en ágar Mueller-Hinton y suspendidas en caldo de enriquecimiento Mueller-Hinton, en tanto que para el crecimiento del género *Candida* se utilizó medio CHROMagar. Los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) del extracto frente a las diferentes cepas bacterianas fueron medidos usando el método de dilución en caldo. Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos de 6 horas y las suspensiones fueron ajustadas a una turbidez de 0,5 en escala McFarland. Se realizaron diluciones seriadas del PAR, esterilizado por filtro de 45 μm de poro, en caldo y se pusieron en contacto con igual cantidad de inóculo. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 24 horas. La CMI fue definida como la menor concentración capaz de inhibir cualquier crecimiento visible. A su vez fueron ensayados cultivos control conteniendo solamente buffer cítrico-citrato esterilizado.

La CMB/CMF (concentración mínima bactericida/ fungicida) fue determinada sembrando 0,01 ml en placas de ágar y observando el crecimiento. La CMB/CMF se definió como la concentración a la cual se aprecia el 99,9% de reducción del inóculo original.

Los resultados pueden verse en la Tabla 1.

El PAR demostró tener actividad inhibitoria del crecimiento para todas las cepas ensayadas, siendo muy efectivo en el caso de las bacterias pero no así con el género *Candida*. En cuanto a la actividad bactericida/fungicida, el PAR no mostró tener gran efecto a bajas concentraciones e incluso no pudo determinarse dicha actividad frente a *P. aeruginosa*.

Especies	CMI	CMB/CMF
<i>Candida albicans</i>	125	125
<i>Candida krusei</i>	250	250
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	125
<i>Escherichia coli</i>	16	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16	ND

Tabla 1. Actividad antimicrobiana del PAR. CMI (concentración mínima inhibitoria) y CMB/CMF (concentración mínima bactericida/fungicida) expresados en µg/ml de proteína. ND: no detectada.

Nota: este ensayo fue realizado dentro del marco del convenio CAPES.

Actividad Colagenolítica y Queratinolítica

Para la determinación de las actividades enzimáticas se emplearon sustratos sintéticos cromogénicos.

Ensayo sobre azul de polvo de piel (HPA): El sustrato es un preparado rico en colágeno parcialmente desnaturalizado al cual se une covalentemente un colorante azul y resulta adecuado para conocer la capacidad de un preparado enzimático de degradar el colágeno. Para el desarrollo del protocolo de actividad enzimática se utilizaron 10 mg del sustrato Hide-Remazol Brilliant Blue R (H6268 Sigma) a los que se adicionan 3,8 ml de buffer Tris-HCl 100mM (pH 8,0) y 200 µl de la solución del PAR. La reacción se llevó a cabo en un baño termostático con agitación continua a 37 °C durante diferentes tiempos, luego se centrifugó a 3500g durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Se definió la *unidad de actividad HPA (UHPA)* como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio en 0,001 unidades de Abs a 595nm por hora.

Ensayo con azul de queratina (lana tintada): Este ensayo resulta adecuado para determinar la actividad queratinolítica del preparado enzimático. El ensayo de la degradación de queratina se realizó empleando el sustrato keratin azure (K8500 Sigma) empleando un procedimiento similar a lo indicado para el sustrato HPA. Se definió la *unidad de actividad queratinolítica (UKA)* como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio en 0,001 unidades de Abs a 595nm por hora.

El PAR fue capaz de hidrolizar, en diferente grado, el colágeno (6000 UHPA) y la queratina (200 UKA).

Nota: estos ensayos fueron realizados en conjunto con personal del CITEC.

Actividad sobre Componentes de la Cascada de Coagulación

Se prepararon placas de fibrinógeno en base a la siguiente proporción: 10 ml de agarosa 1,2% en agua y 10 ml de fibrinógeno 0.4% en buffer Tris-HCl 0,1M de pH 7,5. Una vez constituida la placa, se sembraron 50 μ l de PAR (0,1 Ucas/ml) en pocillos hechos en el gel. Se incubó a 37 °C durante 24 horas. A las 6 horas se presencié un halo de 1 cm de diámetro alrededor de los pocillos. A las 24 horas no hubo aumento de diámetro. La presencia de un halo homogéneo (degradación total del fibrinógeno) representa la capacidad fibrinogenolítica y se genera por acción de las proteasas contenidas en la muestra. La presencia de un anillo opaco en el contorno del halo, indica la formación de fibrina por degradación parcial del fibrinógeno debido a la menor actividad enzimática. En este ensayo, dicho anillo no se hizo evidente.

También se realizó el ensayo en medio líquido. Para esto se preparó una solución de fibrinógeno 5 mg/ml en buffer Tris-HCl 0,01M de pH 7,5. A 2 ml de la solución de fibrinógeno se le añadieron 200 μ l de PAR (1 Ucas/ml) y se lo dejó incubar a 37 °C en la cubeta descartable que fuera usada para medir absorbancia a 540 nm a distintos tiempos. Los resultados se observan en la figura 26.

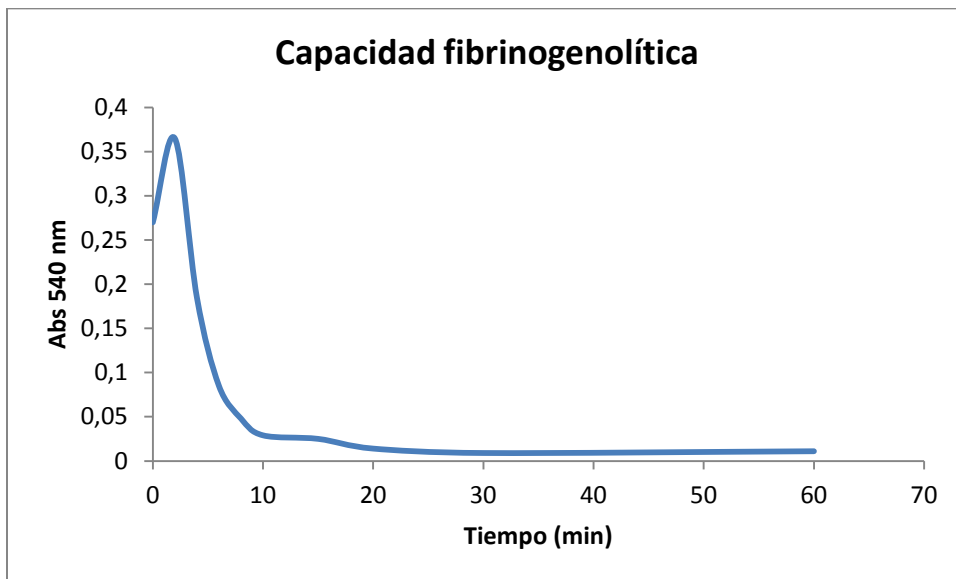


Fig. 26. Capacidad fibrinogenolítica del PAR

Al inicio del ensayo la absorbancia aumenta debido a la formación de fibrina por hidrólisis parcial del fibrinógeno y luego decae rápidamente por degradación de los coágulos de fibrina formados y demás moléculas de fibrinógeno.

MALDI Imaging

Esta técnica es óptima para la obtención de mapas de concentración de analitos sobre cortes de tejido o distintos tipos de superficies orgánicas o inorgánicas. Esto permite describir la distribución espacial de un compuesto químico en una muestra casi sin tratamiento previo (tejido, célula, material sintético, etc), con una resolución de unas pocas decenas de micras.

El tejido en estudio fue el fruto del Ombú. En la figura 27 se observa: en la parte superior, la distribución de una masa de 24 kDa (se sospecha que podrían ser las proteasas) y una foto de un corte transversal

del fruto. La señal se distribuye en todo el fruto pero no en la semilla. En la parte de abajo del esquema se presenta el espectro de masas en la zona de 10 a 27 kDa, con una señal muy importante en la zona de 24 kDa. A masas moleculares más bajas hay mucha señal y todo se acumula en torno a los 5 kDa, que se supone que se deben a productos de degradación de las proteasas.

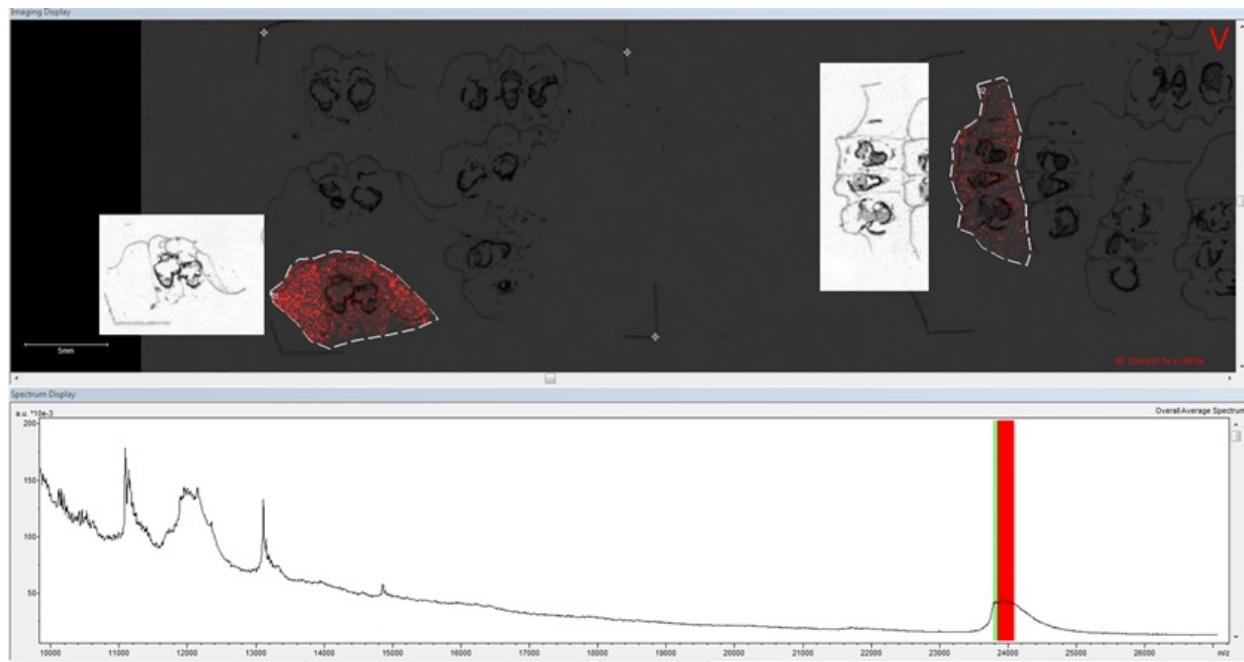


Fig. 27. Cartografía química del fruto de *P. dioica*.

Nota: este estudio fue realizado en el Servei de Proteomica i Biologia Estructural de la UAB (SePBioEs), Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Además de lo expuesto, hemos terminado, junto a mi directora, la redacción de un trabajo científico el cual fue enviado para su evaluación y posible publicación. El título del mismo es: **"Balansain R as Hydrolytic Agent for the Production of Antioxidant Peptides from Bovine Whey"**.

Nota: En mayo del 2013 hice uso de la licencia por maternidad (45 días, nacimiento por cesárea), por lo que he visto retrasado mi progreso en el doctorado.