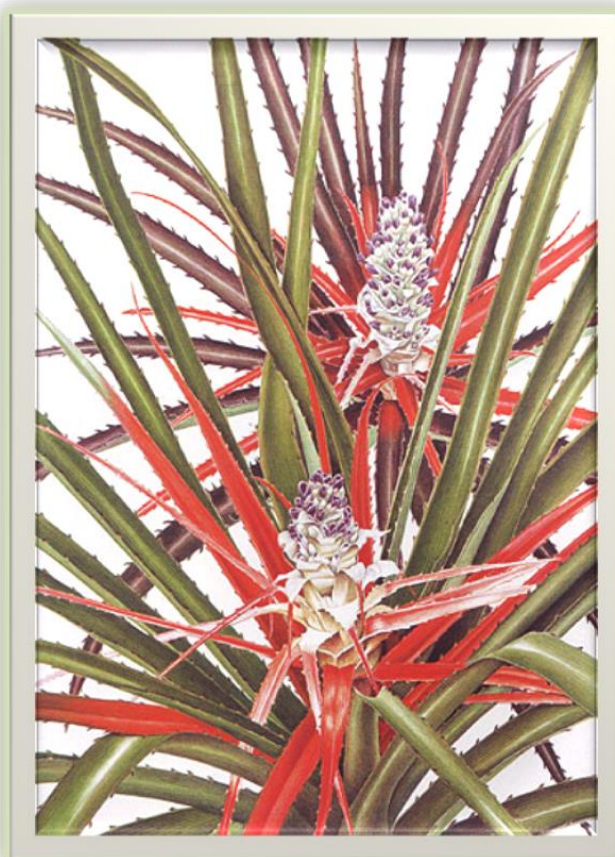




UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



“Purificación, caracterización funcional y estructural de cisteín proteinasas presentes en frutos maduros de *Bromelia antiacantha*. Evaluación de sus posibles aplicaciones.”



Lic. Bioquímica Diego Vallés

**Director de Tesis:
Dra. Ana María B. Cantera**

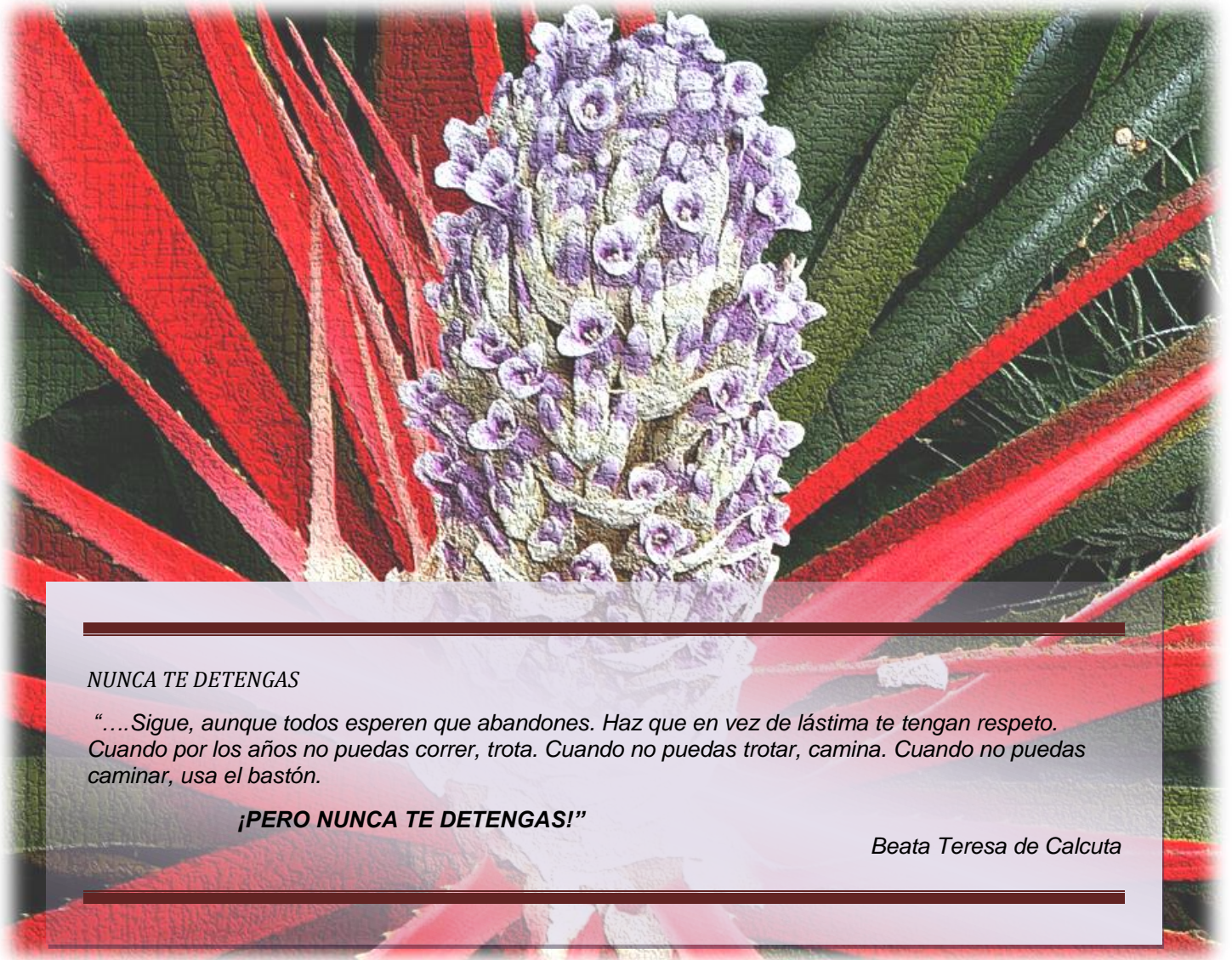
Montevideo, Uruguay, 2019

“Purificación, caracterización funcional y estructural de cisteín proteinasas presentes en frutos maduros de *Bromelia antiacantha*. Evaluación de sus posibles aplicaciones.”

El presente Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Química de Facultad de Química de la Universidad de la República. Fue realizado en el Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, bajo la dirección de la Dra. Ana María B. Cantera

TESISTA: Licenciado en Bioquímica Diego Vallés

Montevideo, 2019



NUNCA TE DETENGAS

“...Sigue, aunque todos esperen que abandones. Haz que en vez de lástima te tengan respeto. Cuando por los años no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón.

¡PERO NUNCA TE DETENGAS!”

Beata Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

-A mi tutora de tesis, Ana, por haberme abierto las puertas al mundo de las proteasas. Por todo lo aprendido y vivido. Por nuestros encuentros y desencuentros. Por su paciencia y apoyo incondicional; por creer y apostar por mí, aún en los momentos difíciles. Por las charlas interminables, sueños imposibles que se fueron haciendo realidad. Hoy no estaría aquí de no ser por su “tozudez”. GRACIAS!!!!

-A mi compañera, Carolina, por su infinita paciencia, compañerismo, apoyo. Siempre dispuesta a anteponer todo para dar una mano. Que el futuro nos permita seguir fortaleciendo esto que tanto queremos.

-A Shirley, Miriam, Laura, Verónica, compañeras que forman o formaron parte de este grupo de Enzimas Proteolíticas-Hidrolíticas, con las que hemos compartido trabajo, ideales, sueños y desvelos, siempre dispuestas a dar lo mejor para que el grupo avanzara.

-A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación de la beca en Barcelona y parte del trabajo de esta tesis.

-Al grupo de Molecular Vegetal y en especial a Sabina Vidal, Alexandra Castro. Sin su ayuda y guía, no hubiera podido realizar el trabajo de Molecular.

-A la Dra. Laura Coitiño y Dra. Margot Paulino por sus valiosos consejos y aportes que me permitieron bucear por el mundo del modelado “amateur”.

-A todos los integrantes del CIPROVE (Centro de Investigación en Proteínas Vegetales), La Plata Argentina, que me abrieron las puertas de su laboratorio y me brindaron un apoyo incondicional para superar el gran cuello de botella que fue la purificación, muy especialmente al Profesor Nestor Caffini, a la Dra Claudia Natalucci y Dra. Mariela Bruno.

-Al grupo de Ingeniería de Proteínas i Enzimología del Institut de Biotecnología y Biomedicina (IBB) “Vicent Villar Palasí” de la Universitat Autònoma de Barcelona, España, donde desarrolle una pasantía que me permitió formarme en el campo de la proteómica y biología molecular. Muy especialmente al Dr. Xavier Avilés, su director y a Sebastián Trejo quienes fueron mis mentores en esta estadía.

-Al grupo del Laboratorio de Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina, especialmente a Sonia Barberis y Grisel Bersi, con quienes nos embarcamos en la exploración de las aplicaciones de las enzimas y con su experiencia hemos ido logrando muy buenos resultados.

-A mi familia, sin ustedes, sin los valores que me han inculcado, no sería la persona que soy. Son mi motor, mi cable a tierra, mi respaldo en cada una de las decisiones y emprendimientos.

-A "Guille", por ser la persona que ha estado de forma incondicional a mi lado, apoyándome, dando fuerzas, respetando mis tiempos y decisiones.

RESUMEN

Las proteasas o peptidasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas. Se describen cinco clases de acuerdo a su mecanismo catalítico: proteasas aspárticas, de cisteína, metálicas, de serina y de treonina. Estas enzimas desempeñan papeles clave en todos los organismos vivos. A pesar de catalizar la misma reacción, la especificidad por el sustrato suele ser marcadamente diferente para cada proteasa, haciéndolas moléculas únicas. El estudio de nuevas peptidasas, aporta información valiosa permitiendo una mayor comprensión de las propiedades que definen la especificidad y la relación estructura-función, además de generar nuevas herramientas biotecnológicas. En este contexto, se trabajó con frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol., una especie autóctona, perteneciente a la familia *Bromeliaceae*. Partiendo del extracto de estos frutos y conociendo los puntos isoeléctricos de sus componentes proteicos, se empleó una metodología de purificación simple que permitió separar tres nuevas peptidasas que denominamos: Antiacanthaína A (AntA), Antiacanthaína B (AntB) y Antiacanthaína C (AntC). La caracterización bioquímica de las tres enzimas mostró que ellas tienen propiedades similares y típicas de las cisteín peptidasas de la familia C1A, como son: la inhibición irreversible con E64, tamaños moleculares de 23 000 Da y un amplio rango de pH de actividad. Estas enzimas mostraron algunas particularidades funcionales interesantes, entre las que se destacan la elevada temperatura óptima de actividad (superior a 60°C) y la resistencia a la acción de agentes desnaturizantes de proteínas (Urea y Cloruro de Guanidinio), detectándose también en algunos casos, un efecto potenciador de la actividad enzimática. Las tres peptidasas mostraron diferencias en sus afinidades y eficiencias catalíticas, según los resultados obtenidos en los ensayos de actividad realizados con sustratos sintéticos específicos de peptidasas cisteínicas. La incubación de AntA, AntB o AntC con la cadena β de la insulina, mostró diferentes patrones de corte, evidenciado distintas especificidades primarias; en ninguna de ellas se detectó preferencia por ningún residuo aminoacídico en particular en el sitio de corte.

Las secuencias N-terminal e internas, obtenidas por el método de degradación de Edman y de proteómica, mostraron un alto porcentaje de similitud de secuencia con las peptidasas de la familia *Bromeliaceae* y familia C1A. Con estos datos se diseñaron cebadores específicos utilizados para la amplificación de ADNc (a partir de la extracción de ARNm de los frutos). La clonación del fragmento de amplificación, permitió obtener las secuencias codificantes para una peptidasa (AntP) y una pro-peptidasa (Pro-Ant). El análisis teórico de la secuencia traducida de AntP, no mostró una correspondencia con la de las peptidasas purificadas. Estos resultados hacen pensar que estas enzimas provendrían de un único gen y que adquirieron sus características particulares por procesamiento postraduccional. A partir de estas secuencias y utilizando diferentes herramientas bioinformáticas, se construyeron modelos moleculares. Los modelos tridimensionales de AntP y Pro-Ant, presentaron aspectos estructurales comunes con las

peptidasas cisteínicas de la familia C1A. Las características particulares, observadas para cada una de las enzimas purificadas, hacen que éstas, tanto purificadas como formando parte del extracto crudo, sean muy atractivas para la aplicación en diferentes procesos biotecnológicos. Los distintos abordajes de aplicación biotecnológica en estudio han dado resultados interesantes, demostrando la gran capacidad y versatilidad de estas enzimas.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS | II |
| RESUMEN | IV |
| TABLA DE CONTENIDO..... | VI |
| I – INTRODUCCIÓN | 1 |
| II – MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1. Enzimas: visión histórica | 5 |
| 2. Clasificación de las enzimas..... | 5 |
| 2.1. Clasificación Internacional (sistema EC)..... | 5 |
| 2.1.1. Clasificación EC de las peptidasas (EC 3.4)..... | 7 |
| 2.2. El sistema Merops para la clasificación de peptidasas. | 9 |
| 2.2.1. Clanes | 9 |
| 2.2.2. Familias | 10 |
| 2.2.3. Peptidasas individuales | 11 |
| 3. Peptidasas cisteínicas | 12 |
| 3.1. Clanes y Familias de Peptidasas Cisteínicas..... | 12 |
| 3.1.2. El Clan CA..... | 12 |
| 3.1.3. La familia C1 | 13 |
| 3.1.4. La subfamilia C1A | 13 |
| 3.2. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas | 15 |
| 3.2.1. Mecanismo Catalítico General..... | 15 |
| 3.2.2. Características Estructurales Relacionadas a la Catálisis | 16 |
| 3.2.3. Mecanismo de Unión del Sustrato | 17 |
| 3.2.4. Precursores de las endopeptidasas de la subfamilia C1A..... | 18 |
| 4. <i>Bromeliaceae</i> : Características generales | 20 |
| 4.1. Endopeptidasas de <i>Bromeliaceae</i> | 21 |
| 4.1.1. Endopeptidasas de <i>Ananas comosus</i> L..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.2. Bromelaína de tallo..... | 21 |
| 4.1.3. Ananaína | 22 |
| 4.1.4. Comosaína | 22 |
| 4.1.5. Bromelaína de fruto | 22 |
| 4.1.6. Otras peptidasas de la familia <i>Bromeliaceae</i> | 23 |
| 5. <i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni..... | 24 |
| 5.1. Descripción de la especie | 24 |
| 5.2. Usos..... | 26 |
| 6. Potencialidades tecnológicas de las enzimas proteolíticas..... | 28 |
| 6.1. Aplicaciones industriales..... | 28 |
| 6.2. Aplicaciones industriales de las peptidasas vegetales | 28 |
| 6.2.1. Industrias Alimentarias | 29 |
| 6.2.1.1. Cervecería | 29 |
| 6.2.1.2. Panificación..... | 30 |
| 6.2.1.3. Productos Lácteos | 30 |
| 6.2.1.4. Derivados cárnicos y de la Pesca | 30 |
| 6.2.2. Industria de los Detergentes..... | 31 |
| 6.2.3. Industria Textil | 31 |
| 6.2.4. Industria del Cuero | 32 |
| 6.2.5. Industria Química | 33 |
| 6.2.5.1. Producción de Peptonas | 33 |
| 6.2.5.2. Síntesis de Péptidos y Proteínas | 33 |
| 6.2.6. Productos Farmacéuticos | 33 |
| 6.2.6.1. Las proteinasas como ayudantes en la digestión..... | 34 |
| 6.2.6.2. Proteasas aplicadas a las afecciones reumáticas e inflamatorias..... | 34 |
| 6.2.6.3. Las proteinasas en la cicatrización | 34 |
| 6.2.6.4. Producción de hidrolizados proteicos..... | 35 |
| 6.2.6.5. Proteasas en el tratamiento del cáncer | 36 |

| | |
|---|----|
| III – OBJETIVOS..... | 38 |
| 1. Objetivo general | 39 |
| 2. Objetivos específicos..... | 39 |
| IV – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 40 |
| 1. Material vegetal: colecta..... | 41 |
| 2. Obtención del Extracto Crudo (EC)..... | 41 |
| 3. Procesos de purificación | 42 |
| 3.1. Purificación preliminar del EC | 42 |
| 3.1.1. Precipitación Acetónica | 42 |
| 3.2. Purificación Cromatográfica de antiacanthaína..... | 43 |
| 3.2.1. Preparación de la muestra (filtrado)..... | 43 |
| 3.2.2. Cromatografía de Intercambio Catiónico | 43 |
| 3.2.3. Concentrado de picos cromatográficos | 43 |
| 4. Cuantificación de proteínas | 43 |
| 4.1. Determinación por el método de Bradford..... | 43 |
| 4.2. Determinación por medida directa de absorbancia | 44 |
| 5. Determinación del contenido de carbohidratos..... | 44 |
| 6. Determinación de la actividad proteolítica | 44 |
| 6.1. Actividad Azocaseinolítica..... | 44 |
| 6.2. Actividad esterolítica y amidolítica empleando sustratos sintéticos..... | 45 |
| 6.2.1. Derivado N- α -carbobenzoxi- <i>p</i> -nitro fenil ésteres de Lisina (N-CBZ-L-Lys-ONp)..... | 45 |
| 6.2.2. pGlu-Phe-Leu- <i>p</i> -nitroanilina (PFLNA)..... | 45 |
| 7. Caracterización bioquímica | 45 |
| 7.1 pH óptimo | 45 |
| 7.2. Temperatura óptima..... | 46 |
| 7.3. Titulación del sitio activo | 46 |
| 7.4. Determinación de los parámetros cinéticos..... | 46 |
| 7.5. Efecto de la Urea y del Cloruro de Guanidinio (GndHCl) | 46 |

| | |
|---|----|
| 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida | 47 |
| 8.1 Electroforesis nativa (native-page)..... | 47 |
| 8.1.1. Preparación de la muestra..... | 47 |
| 8.1.2. Preparación del gel..... | 47 |
| 8.1.3. Condición de corrida..... | 47 |
| 8.1.4. Revelado | 47 |
| 8.2 Electroforesis desnaturizante con Tris-Tricina (SDS-Tricina-PAGE) | 47 |
| 8.2.1. Preparación de la muestra..... | 47 |
| 8.2.2. Preparación del gel..... | 48 |
| 8.2.3. Condición de corrida..... | 48 |
| 8.2.4. Revelado | 48 |
| 9. Isoelectroenfoque (IEF) | 48 |
| 9.1. Preparación de la muestra | 48 |
| 9.2. Preparación del gel | 48 |
| 9.3. Condiciones de corrida | 49 |
| 9.4. Revelado..... | 49 |
| 10. Electroforesis bidimensional | 49 |
| 10.1. Primera dimensión | 49 |
| 10.1.1. Preparación de las muestras y sembrado | 50 |
| 10.1.2. Condiciones de corrida | 50 |
| 10.2. Segunda dimensión | 50 |
| 10.2.1. Preparación de las tiras de IPG | 50 |
| 10.2.2. Condiciones de corrida | 50 |
| 11. Zlmograma/revelado específico para proteasas | 51 |
| 11.1. Preparación del gel | 51 |
| 11.2. Incubación | 51 |
| 11.3. Revelado..... | 51 |
| 12. Determinación del carácter glicoproteico | 51 |

| | |
|---|----|
| 13. Electroforesis en geles de agarosa..... | 52 |
| 13.1. Preparación de las muestras | 52 |
| 13.2. Preparación de los geles..... | 52 |
| 13.3. Condiciones de corrida | 52 |
| 13.4. Revelado..... | 52 |
| 14. Determinación de pm por espectrometría de masas | 53 |
| 14.1. Preparación de la muestra | 53 |
| 14.2. Obtención de los espectros..... | 53 |
| 15. Digestión trípica en geles de poliacrilamida..... | 54 |
| 15.1. Procesamiento <i>in situ</i> de la muestra | 54 |
| 15.2. Análisis de masas por Maldi TOF- MS..... | 54 |
| 16. Hidrólisis de la cadena β de insulina..... | 54 |
| 16.1. Reducción y carbamidometilación de cisteínas..... | 54 |
| 16.2. Purificación de la cadena β de insulina por RP-HPLC | 55 |
| 16.3. Digestión de la cadena β de insulina con las fracciones enzimáticas purificadas | 55 |
| 17. Determinación de secuencias parciales de las enzimas purificadas..... | 55 |
| 17.1. Secuencia N-terminal..... | 55 |
| 17.1.1. Transferencia a membranas de PVDF | 55 |
| 17.1.2. Secuenciación N-terminal..... | 56 |
| 17.2. Secuenciación parcial | 56 |
| 18. Obtención por clonado de ADNc para una peptidasa y pro-peptidasa | 56 |
| 18.1. Diseño de cebadores (<i>primers</i>) específicos | 56 |
| 18.1.1. Cebador directo para secuencia madura | 56 |
| 18.1.2. Cebador directo para secuencia Pro-enzima..... | 57 |
| 18.1.3. Cebador reverso en región C-terminal..... | 57 |
| 18.2. Aislamiento del ADNc de antiacanthaina | 57 |
| 18.2.1. Extracción del ARN Total..... | 57 |
| 18.2.2. PCR..... | 58 |

| | |
|---|----|
| 18.2.2.1. Reacción de retrotranscripción (RT) | 58 |
| 18.2.2.2. Reacción de amplificación por PCR del ADNc | 59 |
| 18.2.3. Purificación de Fragmentos de DNA..... | 60 |
| 18.3. Clonado del ADNc | 60 |
| 18.3.1. Ligación | 61 |
| 18.3.2. Transformación..... | 61 |
| 18.3.3. Selección de los transformantes (clones) | 62 |
| 18.3.4. Glicerinado de los clones..... | 62 |
| 18.4. Secuenciación del ADNc Clonado | 63 |
| 18.4.1. Aislamiento de ADN plasmídico..... | 63 |
| 18.4.2. Secuenciación del ADN | 63 |
| 18.4.3. Análisis de las secuencias de los ADNcs | 63 |
| 19. Modelado por homología de la secuencia de la peptidasa madura y Pro-peptidasa | 64 |
| 19.1. Obtención de Moldes. | 64 |
| 19.2. Alineamiento múltiple | 64 |
| 19.3. Construcción del modelo..... | 65 |
| 19.4. Validación de los modelos obtenidos | 65 |
| 19.5. Análisis de los modelos generados | 65 |
| V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 66 |
| 1 Preparación de Extracto Crudo | 67 |
| 2. Purificación parcial del extracto crudo | 67 |
| 3. Isoelectroenfoque y zimograma de Antiacanthaína | 68 |
| 4. Purificación cromatográfica | 70 |
| 4.1 Esquema de purificación..... | 70 |
| 4.2 Evaluación de la purificación..... | 73 |
| 4.2.1. Electroforesis nativa y revelado específico (ZIMOGRAMA)..... | 73 |
| 5. Caracterización de AntA, AntB Y AntC | 75 |
| 5.1. Determinación de pI..... | 75 |

| | |
|---|------------|
| 5.2. Tamaño molecular | 76 |
| 5.2.1. Tricine SDS-PAGE | 76 |
| 5.2.2. Análisis por espectrometría de masas..... | 77 |
| 5.3. Determinación del carácter glicoproteico | 79 |
| 5.4. Caracterización bioquímica de las proteasas purificadas..... | 80 |
| 5.4.1. pH Óptimo | 80 |
| 5.4.2. Temperatura óptima | 81 |
| 5.4.3. Efecto de la Urea y el GndHCl..... | 81 |
| 5.4.4. Titulación del sitio activo con E-64..... | 83 |
| 5.5. Determinación de los parámetros cinéticos..... | 84 |
| 5.5.1. PFLNA..... | 84 |
| 5.5.2. z-L-Lys-ONp | 86 |
| 5.6. Especificidad de hidrólisis de la cadena β de la insulina | 88 |
| 5.6.1. Obtención del Sustrato | 88 |
| 5.6.2. Hidrólisis de la Cadena β de la Insulina con Antiacanthaína, AntA, AntB, AntC y Papaina..... | 89 |
| 6. Determinación de la secuencia parcial de AntA, AntB y AntC | 94 |
| 6.1. Secuencia N-terminal..... | 94 |
| 6.2. Obtención de secuencias parciales por digestión trípica (mapeo de huella peptídica).... | 96 |
| 6.3. Regiones identificadas en la secuencia PRO de Fastuosaína por mapeo peptídico de la digestión trípica de AntA, AntB y AntC..... | 98 |
| 7. Clonado y secuenciación del ADNc de una peptidasa de <i>Bromelia antiacantha</i> | 100 |
| 7.1 Diseño de cebadores a partir de secuencia N-terminal..... | 100 |
| 7.2 Diseño de cebadores a partir de secuencias por digestión trípica. | 101 |
| 7.3. Extracción de ARNm y obtención de ADNc | 101 |
| 7.4. Clonado del ADNc | 103 |
| 7.5. Obtención de la secuencia consenso de la peptidasa de <i>Bromelia antiacantha</i> | 104 |
| 7.6. Obtención de la secuencia madura y secuencia Pro..... | 106 |
| 7.7. Análisis de homología..... | 113 |

| | |
|---|-----|
| 8. Modelado de AntP Y Pro-ant | 117 |
| 8.1. Selección de los moldes y obtención de modelos | 117 |
| 8.2. Validación y refinado del modelo | 121 |
| 8.3. Análisis del modelo de la estructura..... | 124 |
| 8.3.1. Secuencia de AntP | 124 |
| 8.3.2. Secuencia Pro de antiacanthaína..... | 130 |
| VI – EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES APLICACIONES | 133 |
| 1.1. Búsqueda de péptidos antihipertensivos por hidrólisis de proteínas de lactosuero. | 134 |
| 1.2. Hidrólisis controlada de tejidos para uso en entomología | 135 |
| 1.3. Valorización de los subproductos de la fruta de Bromelia antiacantha Bertol.: Obtención de proteasa y su potencial como aditivo para detergentes para ropa. | 135 |
| 1.4. Adsorción en soportes sólidos | 136 |
| 1.5. Síntesis enzimática en medios no convencionales | 136 |
| VII - CONCLUSIONES..... | 137 |
| 1. Obtención de Antiacanthaína | 138 |
| 2. Purificación y caracterización bioquímica..... | 138 |
| 3. Obtención por clonado de adnc para una peptidasa y pro-peptidasa | 140 |
| 4. Modelado para las estructuras 3D de AntP Y Pro-ant. | 141 |
| VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 143 |
| IX – APÉNDICES..... | 160 |
| APENDICE 1 | 161 |
| Curvas de calibración para proteínas por método de Bradford | 161 |
| APÉNDICE 2 | 162 |
| Determinación del contenido de carbohidratos curva de calibración..... | 162 |
| APENDICE 3 | 163 |
| Determinación de puntos isoeléctricos por medida de la distancia migrada en Isoelectroenfoco | 163 |
| APENDICE 4 | 164 |
| Estructura y reacción del E64 (Inhibidor irreversible de cisteín peptidasas)..... | 164 |

| | |
|---|-----|
| APENDICE 5 | 165 |
| Alineamiento de secuencias N-terminal de peptidasas cisteínicas | 165 |
| X – ANEXOS..... | 167 |
| ANEXO 1 | 168 |
| Parámetros de las estructuras cristalinas de peptidasas utilizadas como moldes para el modelado de secuencia AntP (secuencia madura) | 168 |
| ANEXO 2 | 171 |
| Parámetros de las estructuras cristalinas de peptidasas utilizadas como moldes para el modelado de secuencia de pro-ant..... | 171 |
| ANEXO 3 | 173 |
| Portada de publicaciones científicas | 173 |

I – INTRODUCCIÓN

Las proteasas o peptidasas, son enzimas que catalizan la escisión de los enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos de las proteínas o péptidos. Contribuyen esencialmente a todos los fenotipos celulares y, por lo tanto, son fundamentales para el control de una amplia gama de procesos biológicos desde la división celular hasta la muerte celular y los procesos intermedios (Vizovišek et al., 2018).

En las plantas, las proteasas además de estar involucradas en la degradación de proteínas no funcionales (limpieza), son clave en muchos procesos reguladores asociados a los eventos de crecimiento, desarrollo y cambios ambientales (Van Der Hoorn, 2008). Juegan un papel clave en el reconocimiento de patógenos y plagas y en la inducción de respuestas de defensa (Domsalla and Melzig, 2008; Ekchaweng et al., 2017; Misas-Villamil et al., 2016).

Además de las funciones biológicas, las enzimas han sido utilizadas por el humano desde comienzos de la civilización. Las actividades humanas importantes en comunidades primitivas, tales como la producción de ciertos tipos de alimentos y bebidas, el teñido de cueros y pieles para producir prendas de vestir, involucraron la aplicación de actividades enzimáticas, aunque sin saberlo.

Estos procesos fueron los primeros pasos en el desarrollo de la Biotecnología: aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de los mismos para hacer o modificar productos o procesos para un uso específico.

En este contexto las proteasas se encuentran entre las primeras enzimas utilizadas para este tipo de aplicación y su utilidad aún se mantiene fuerte.

Hoy en día, las proteasas se utilizan con frecuencia en la industria química, farmacéutica, del cuero y de alimentos; y en el creciente mercado de detergentes para ropa entre otras (Bersi et al., 2019).

Las formas de utilización de estas enzimas han cambiado con el tiempo. Inicialmente, se utilizaron como extractos de tejidos animales o vegetales, o células de microorganismos completos. Los avances en el aislamiento de enzimas y las técnicas de producción han facilitado la aplicación directa de enzimas purificadas (Kirk et al., 2002; Woodley, 2013) Estos avances técnicos han permitido ampliar el rango de enzimas conocidas y mejorar la caracterización de sus conformaciones y mecanismos catalíticos, haciendo su aplicación más sencilla (Filice et al., 2016; Kaushik et al., 2016).

En este punto, se reúnen intereses académicos e industriales, o se podría decir que las ciencias básicas y aplicadas se conjugan en esta área de interés, ofreciendo una amplia gama de aplicaciones probables y también permitiendo comprender muchos ciclos biológicos.

En los últimos años, dado los nuevos requerimientos de la industria farmacéutica y biotecnológica, se ha incrementado el interés por las proteasas de plantas no solo por su acción sobre una

amplia variedad de proteínas sino también por su gran estabilidad frente a la temperatura y pH (Tavano et al., 2018).

En esta búsqueda de nuevas fuentes de proteasas, se ha puesto mayor énfasis en plantas nativas y organismos exóticos (Origone et al., 2018). Sin embargo, hay pocos informes sobre el aislamiento de proteasas de plantas que crecen en América del Sur (Bruno et al., 2010; María Eugenia Errasti et al., 2018).

Bromeliaceae es una familia de plantas cuyos miembros generalmente producen grandes cantidades de proteinasas con función aún desconocida. Está constituida por alrededor de 2700 especies, incluidas en aproximadamente 56 géneros.

A pesar del elevado número de integrantes de la familia Bromeliaceae es muy reducido el número de trabajos en busca de enzimas proteolíticas, siendo *Ananas comosus* L. (el ananá o piña) la especie más estudiada en este sentido. La bromelaína, la proteasa obtenida de sus tallos y frutos, es uno de los preparados enzimáticos más comercializadas, habiéndose descrito numerosas aplicaciones industriales y medicinales de la misma (de Lencastre Novaes et al., 2016; Tavano et al., 2018). Además de las proteasas del ananá, también se han aislado y caracterizado otras proteasas de Bromeliaceae (María E. Errasti et al., 2018; Payrol et al., 2008; Torres et al., 2012)

Basándonos en estos antecedentes, se comenzó a trabajar con frutos maduros de la especie autóctona *Bromelia antiacantha* Bertol, en la búsqueda, purificación y caracterización de nuevas fitopeptidasas (Vallés et al., 2007). Este trabajo presenta los resultados de la purificación de tres proteasas de este fruto, la obtención del ADNc que codifica para una peptidasa activa y la evaluación de las potencialidades de aplicación.

II – MARCO TEÓRICO

1. ENZIMAS: VISIÓN HISTÓRICA

Las enzimas son catalizadores biológicos capaces de acelerar una reacción química sin ser parte de los productos finales o consumirse en el proceso. Como cualquier catalizador, las enzimas funcionan al disminuir la energía de activación de la reacción (E_a) (Antonio Blanco, 2017).

No fue sino hasta el siglo XIX que, con el desarrollo de la bioquímica y el trabajo pionero de varios científicos, la naturaleza de las enzimas y la forma en cómo funcionan comenzó a aclararse. En el transcurso del siglo XX, el desarrollo de métodos para el aislamiento y la purificación de enzimas, la comprensión de que las enzimas son proteínas con actividad bioquímica y su caracterización mediante técnicas de difracción de rayos X permitió entender y obtener todo su potencial en el contexto de la medicina y la tecnología (Martínez Cuesta et al., 2015)

Se comenzó a tener una creciente acumulación de grandes cantidades de datos sobre las enzimas que aparecían dispersos en la bibliografía lo que dificultaba cualquier forma de análisis general. Esto llevó a una comunicación confusa y ambigua entre los investigadores (Cornish-Bowden, 2014).

El notable aumento en el número de enzimas recién descubiertas requería el desarrollo de un sistema para nombrarlas y clasificarlas de manera consistente.

En 1956 los bioquímicos y enzimólogos lanzaron una iniciativa para recopilar toda la información disponible sobre las reacciones catalizadas generales para nombrar y clasificar las enzimas. Esto fue dirigido por expertos de la Comisión de Enzimas (CE) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) que presentaron un marco para nombrar las enzimas ya conocidas según las cuales podrían clasificarse nuevas enzimas.

2. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS

2.1. Clasificación Internacional (sistema EC)

Malcolm Dixon y Edwin Webb, en 1958, dieron el primer paso al clasificar las enzimas en términos de las reacciones que catalizaban, más que por sus estructuras. Este sistema fue adoptado y desarrollado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) quien junto a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) crearon el Comité de Enzimas encargada de elaborar la Nomenclatura Enzimática. Esta ha tenido varias ediciones, la más reciente se publicó en 1992. Este material también está disponible a través de la base de datos en línea de SWISSPROT ENZYME. Las adiciones y modificaciones más recientes a la lista se han

publicado como suplementos en el European Journal of Biochemistry y recientes están disponibles en línea (<http://www.enzyme-database.org>) (Ako and Nip, 2007)

Desde entonces, las enzimas se nombran y se identifican sistemáticamente con un número EC; este código es una descripción de cuatro niveles que se utiliza para clasificar las enzimas en función de la transformación química general de los sustratos en productos (Tipton and Boyce, 2000).

Cada código de enzimas consiste en las dos letras EC seguidas por 4 números separados por puntos. Estos números representan una clasificación progresivamente más específica.

El primer nivel corresponde a siete clases diferentes según el tipo de reacción química que se lleva a cabo (Tabla 1).

Estas clases de EC se dividen en subclases y sub-subclases (segundo y tercer nivel, respectivamente) en línea con una variedad de criterios como el enlace químico escindido o formado, el centro de reacción, el grupo químico transferido y el cofactor utilizado para la catálisis. El nivel final de clasificación define la especificidad del sustrato.

Tabla 1. Clasificación de enzimas de acuerdo a la EC (Enzyme comisión).

| CLASES | Tipo de reacción catalizada | Ejemplo |
|---------------------|--|--------------------------------|
| 1. Oxidorreductasas | Transferencia de electrones (reacciones de óxido-reducción) | Citocromo oxidasa |
| 2. Transferasas | Transferencia de grupos | Hexoquinasa |
| 3. Hidrolasas | Reacciones de hidrólisis (rotura de enlaces por adición de agua) | Tripsina |
| 4. Liasas | Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos | Piruvato descarboxilasa |
| 5. Isomerasas | Transferencia de grupos dentro de una misma molécula, generando isómeros | Triosa-fosfato isomerasa |
| 6. Ligasas | Formación de enlaces del tipo C-C, C-S, C-O y C-N con gasto de ATP | Glutamato sintetasa |
| 7. Translocasas | Translocación de iones o moléculas de un lado a otro de la membrana lipídica. | NADH:ubiquinona oxidoreductasa |

Dentro de la clase 3 (hidrolasas) se agrupan las enzimas que catalizan la reacción de escisión de un enlace mediante la adición de una molécula de agua. Los productos de esta reacción son dos moléculas, a una de las cuales se ha unido el hidrógeno y a la otra el hidroxilo, provenientes ambos de la hidrólisis del agua.



Las enzimas de la clase 3 se sub-agrupan en función del enlace químico sobre el que actúan. Así, si el enlace entre R1 y R2 es el grupo amida de la unión peptídica, las hidrolasas que catalizan tal reacción son peptidasas y pertenecen a la subclase 3.4 (EC 3.4),

2.1.1. Clasificación EC de las peptidasas (EC 3.4)

La hidrólisis de los enlaces peptídicos es una de las modificaciones enzimáticas más importantes y frecuentes en las proteínas. Las proteasas, proteinasas y peptidasas son en su conjunto denominadas enzimas proteolíticas. Sin embargo, estos términos tuvieron diferentes significados históricos (Barrett and McDonlad, 1986). En este contexto se denominó “proteinasas” a las enzimas que actuaban sobre proteínas intactas y “peptidasas” a las enzimas que actuaban sobre pequeños péptidos. La razón de esta diferenciación radicaba en la aceptabilidad de grupos amino y carboxilo terminal del sustrato en sitios específicos de la enzima.

El uso del término peptidasa fue adoptado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM) (1984) (Cornish-Bowden, 2014) para clasificar a las enzimas como hidrolasas de enlaces peptídicos (E.C. 3.4) (Rawlings, 2013) y el término proteasa es sinónimo de esto. Las peptidasas se subdividen en dos grupos: **exopeptidasas**, son las hidrolasas que clivan uno o más enlaces peptídicos del sustrato desde los extremos N- o C-terminales y **endopeptidasas**, que hidrolizan enlaces peptídicos en regiones internas de las cadenas polipeptídicas. Cada uno de estos grupos se subdivide a su vez dando un total de catorce subclases (Figura 1)

Las exopeptidasas que actúan en un extremo N libre liberan un único residuo de aminoácido (aminopeptidasas, 3.4.11), o un dipéptido o un tripéptido (dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas, 3.4.14). Aquellos que actúan en un extremo C libre liberan un solo residuo (carboxipeptidasas, 3.4.16-18) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, 3.4.15).

Las endopeptidasas escinden enlaces internos en cadenas polipeptídicas. En la lista de EC, las endopeptidasas se dividen en subclases según el mecanismo catalítico, y la especificidad se usa sólo para identificar enzimas individuales dentro de los grupos. Las enzimas de la subclase 3.4.21

(serina endopeptidasas) tienen una serina central activa en el proceso catalítico, las del subgrupo 3.4.22 (cisteína endopeptidasas) tienen una cisteína en el centro activo, las de 3.4.23 dependen de un residuo de ác. Aspártico (o comúnmente dos) para su actividad catalítica (endopeptidasas aspárticas), y los de la subclase 3.4.24 utilizan un ión metálico (a menudo, pero no siempre, Zn^{2+}) en el mecanismo catalítico (endopeptidasas metálicas). Por último la subclase 3.4.25, (endopeptidasa treonínica), presenta una treonina catalítica en su sitio activo.

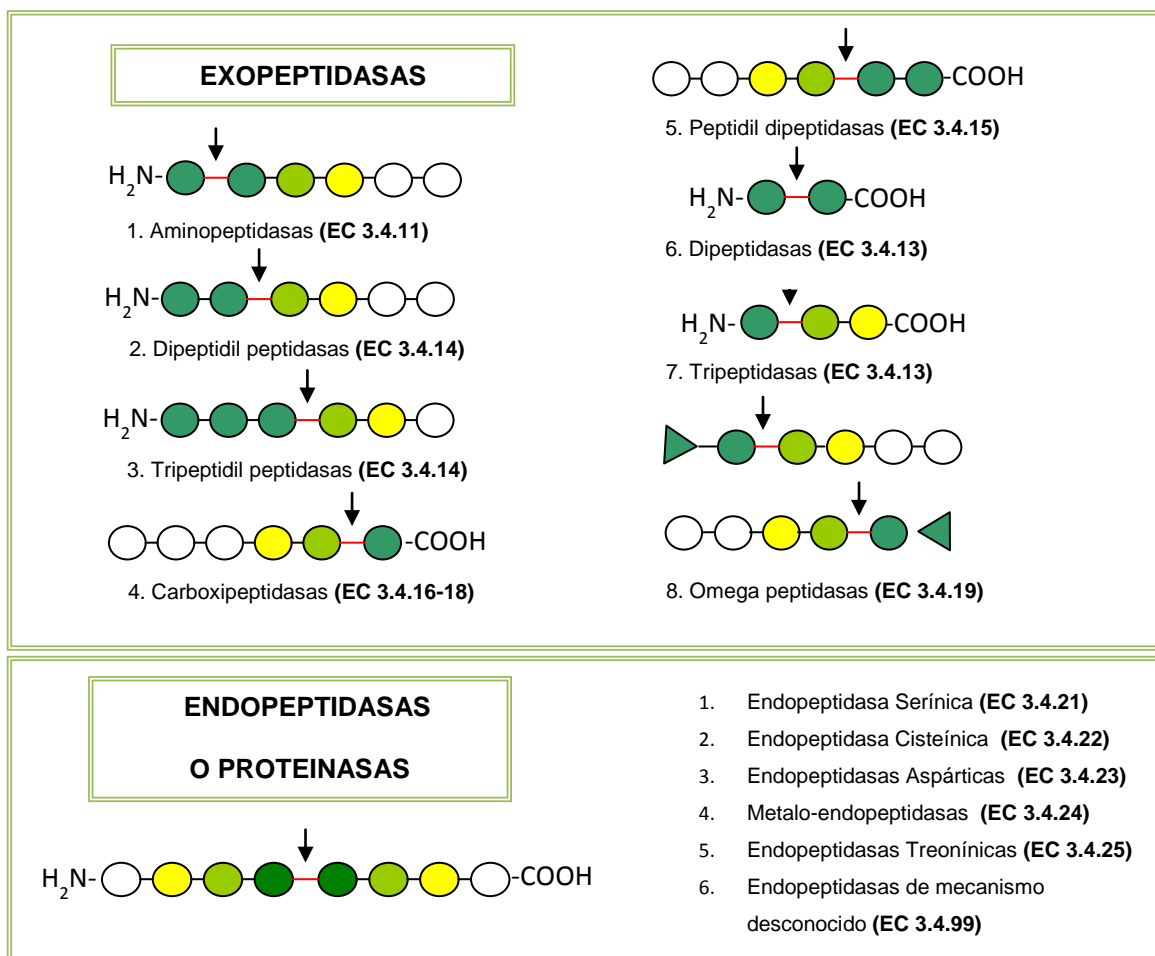


Figura 1: Clasificación de peptidasas según el NC-IUBMB (2005) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>

Cada una de las sub-subclases de endopeptidasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aun así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman enlaces covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas, cisteínicas y treonínicas) y las que no forman enlaces enzima-sustrato covalentes (aspárticas y metalopeptidasas).

En general, la cadena polipeptídica hidrolizada por una endopeptidasa puede ser de cualquier longitud, pero se ha detectado un grupo de ellas, genéricamente denominadas oligopeptidasas, que sólo actúan sobre pequeños péptidos.

Esta metodología de clasificación fue satisfactoria mientras el caudal de información fue relativamente poco y el conocimiento de las reacciones químicas catalizadas por estas enzimas era suficiente para distinguirlas. Cuando se fue ampliando el conocimiento de las peptidasas, el tratamiento de las mismas comenzó a diferenciarse del resto de las clases de enzima. En la mayor parte de la lista de EC, una "enzima" se define por el hecho de que cataliza una sola reacción. Para todas las peptidasas, la reacción básica es la misma, hidrólisis de un enlace peptídico. Sin embargo para las endopeptidasas, y para muchas de las exopeptidasas, la especificidad es extremadamente difícil de determinar de manera rigurosa y, si se determina, es casi imposible de describir simplemente o de utilizar como base para designar el nombre.

La decisión de no clasificar las peptidasas simplemente sobre la base de las reacciones que catalizan creó la necesidad de sistemas especiales para clasificarlas y nombrarlas.

2.2. El sistema Merops para la clasificación de peptidasas.

Alrededor de 1992, Rawlings y Barret comenzaron a desarrollar una nueva forma de clasificación de peptidasas que fue diseñada para agruparlas de una manera que reflejara características estructurales esenciales y relaciones evolutivas, aprovechando la riqueza de datos de secuencias de aminoácidos que se encontraban disponibles. Los inicios del sistema se describieron en 1993 (Rawlings and Barrett, 1993). En el año 1996 el sistema se publicó en la web como la base de datos MEROPS (URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops>) (Rawlings et al., 2018). El nombre MEROPS no tiene un significado especial, es simplemente el nombre de un ave cuyo comportamiento social impulsó la adopción del término 'clan', pero ahora forma una etiqueta conveniente para hacer referencia al sistema de familias de peptidasas.

La base de datos MEROPS ordena los datos en tres niveles de clasificación: Clanes, Familias y Peptidasas (Tabla 2). Como identificador, cada tipo catalítico comienza con la letra que es asociada a las peptidasas de cada grupo. . Estas letras son: A, aspártico; C, cisteína; G glutámico; M, metalo; N, asparragina; S, serina; T, treonina o U, sin clasificar; la letra P también se usa para identificar clanes que contienen peptidasas de más de uno de los tipos C, S y T y se denominan mixto. El identificador de un clan se completa con una segunda letra mayúscula, se asigna secuencialmente (por ejemplo, CD), y el identificador de una familia se completa con un número (por ejemplo, C14). El identificador MEROPS para cada peptidasa individual comienza con el identificador de familia y se completa con un número decimal (por ejemplo, C14.001).

2.2.1. Clanes

Aunque las familias son las agrupaciones más grandes de peptidasas que pueden demostrarse rigurosamente que son homólogas, existen líneas de evidencia convincentes de que muchas de las familias comparten una ascendencia común con otras. Es decir, hay grupos de familias en las

que todas las proteínas se han separado de una única proteína ancestral, pero han divergido tanto que ya no podemos probar su relación en comparación con las estructuras primarias. El término clan se usa para describir un grupo de familias de este tipo. El mejor tipo de evidencia para respaldar la formación de un clan es la similitud en las estructuras tridimensionales cuando los datos están disponibles, pero también se toma en cuenta la disposición de los residuos catalíticos en las cadenas polipeptídicas y las similitudes limitadas en la secuencia de aminoácidos alrededor de los aminoácidos catalíticos.

El nombre de cada clan se forma a partir de la letra para el tipo catalítico de las peptidasas que contiene (como para las familias), seguido de una segunda letra mayúscula arbitraria. Al igual que con las familias, si un clan desaparece, el nombre no se reutiliza. Un clan que contiene familias de más de uno de los tipos C, S y T se trata como de tipo 'P'. Un ejemplo es el clan PA que contiene tripsina y muchas otras serina peptidasas, pero también contiene cisteína peptidasas de virus de ARN. A la fecha hay más de 70 clanes y hay varias familias a las que no se les ha asignado un clan por lo que podrían llegar a generar nuevas divisiones.

Tabla 2. Los tres niveles del Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas. Los identificadores usados comienzan con una letra que indica el tipo catalítico de las peptidasas.

| Nivel | Descripción | Identificadores |
|-----------|---|---------------------------|
| Clan | Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares | A, C, G, M, N, P, S |
| Familia | Una familia incluye peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica | A, C, G, M, N, P, S, T, U |
| Peptidasa | Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético | A, C, G, M, N, P, S, T, U |

2.2.2. Familias

Las familias de peptidasas se construyen mediante comparaciones de secuencias de aminoácidos, con el uso de criterios estadísticos estrictos, de modo que no existe una posibilidad realista de que dos peptidasas se coloquen en la misma familia cuando no son realmente homólogas. Cada familia se construye alrededor de una peptidasa “tipo” de ejemplo, y cada

miembro de la familia muestra una relación estadísticamente significativa en la secuencia de aminoácidos con al menos otro miembro de la familia en la parte de la molécula responsable de la actividad de la peptidasa.

2.2.3. Peptidasas individuales

El sistema MEROPS, en su versión de internet incluye datos de todas las peptidasas que se reconocen en el sistema de la EC. Se incluyen muchas otras peptidasas que aún no están en el sistema EC. Se incluyen todas las secuencias de aminoácidos disponibles de las peptidasas, después de la eliminación de elementos "redundantes" que son esencialmente idénticos, datos de actividad y especificidad e interconexión con otras fuentes de información. Cada peptidasa individual recibe un identificador que actúa como un número de acceso. Esto se forma mediante la concatenación del identificador de tres caracteres de la familia a la que pertenece la peptidasa, un punto y un número de tres cifras.

El nivel de información ha ido creciendo de manera exponencial. A la fecha (Mayo 2019), la base de datos MEROPS cuenta con la información de 1.137.158 secuencias, en el año 2012, esta misma base contaba con 320.834 secuencias (un 28% de la información actual). Del total de esta información, 421.996 secuencias corresponden a peptidasas serínicas, 406.444 a metalopeptidasas, 195.537 a peptidasas cisteínicas, 55.726 a peptidasas aspárticas, 39.407 a peptidasas treonínicas, 3.816 a peptidasas asparagínicas, 1.067 a peptidasas glutámicas, 6588 a peptidasas mixtas, 6574 de tipo catalítico desconocidos y 3 sin clasificar. Del total de esta información, 1047 peptidasas tienen estructuras definidas por cristalografía de RX y/o RMN (Rawlings et al., 2018).

3. PEPTIDASAS CISTEÍNICAS

3.1. Clanes y Familias de Peptidasas Cisteínicas

Las peptidasas en las que el nucleófilo que ataca la unión peptídica escindible es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína (Cys) son conocidas como peptidasas de tipo cisteínico. El mecanismo catalítico es similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas, en las que se requieren un nucleófilo y un dador de protón. En todas las peptidasas cisteínicas, este dador de protones en las que se lo ha identificado, es un residuo de histidina (His), tal como ocurre en la mayoría de las peptidasas de tipo serínico y treonínico. En algunas familias sólo la díada Cys-His parece ser esencial para la catálisis, mientras que en otras hay evidencias de que se requiere un tercer residuo para orientar adecuadamente el anillo imidazol de la His. Las peptidasas cisteínicas actualmente se clasifican en once clanes organizados en 78 familias y cuatro subclanes (mixtos), divididos en 18 familias. De estos, el clan CA es el que contienen la mayor cantidad de familias (Rawlings and Barrett, 2013), que se sabe que tienen estructuras similares o motivos relacionados con los de la papaína.

3.1.2. El Clan CA

La primera peptidasa cisteínica claramente reconocida como tal fue la papaína y a partir de ella se constituyó el clan CA.

A partir de la cristalografía de rayos X, se obtuvieron los detalles estructurales que permitieron sentar las bases sobre la cual se agrupa dicho clan. La estructura cristalina de las endopeptidasas de este clan muestra dos dominios (denominados R- y L- de acuerdo a su posición a la derecha e izquierda en la vista estándar mostrada en la Figura 2), separados por la hendidura del sitio activo. El dominio L- o N-terminal consiste principalmente de un conjunto de α hélices, mientras que el dominio R- o C-terminal presenta mayoritariamente cadenas β antiparalelas.

Las interacciones entre ambos dominios tienen carácter tanto hidrofílico como hidrofóbico y son las que le aportan las características a cada enzima en particular (Novinec and Lenarcic, 2013). En la enzima catalíticamente activa, la Cys 25 y la His 159 (numeración de papaína), están ubicadas una en cada dominio, en el fondo de la hendidura del sitio activo en forma de "V", ubicado sobre la parte superior de la molécula (Vizovišek et al., 2018). Una larga α hélice desde el extremo N-terminal corre a través del medio de la molécula y la cisteína catalítica se encuentra al final de la misma. El clan CA agrupa 44 familias, algunas de éstas han sido incorporadas en base a la similitud de las estructuras tridimensionales. Las otras familias son asignadas al clan CA, en base a los motivos presentes alrededor de los residuos catalíticos.

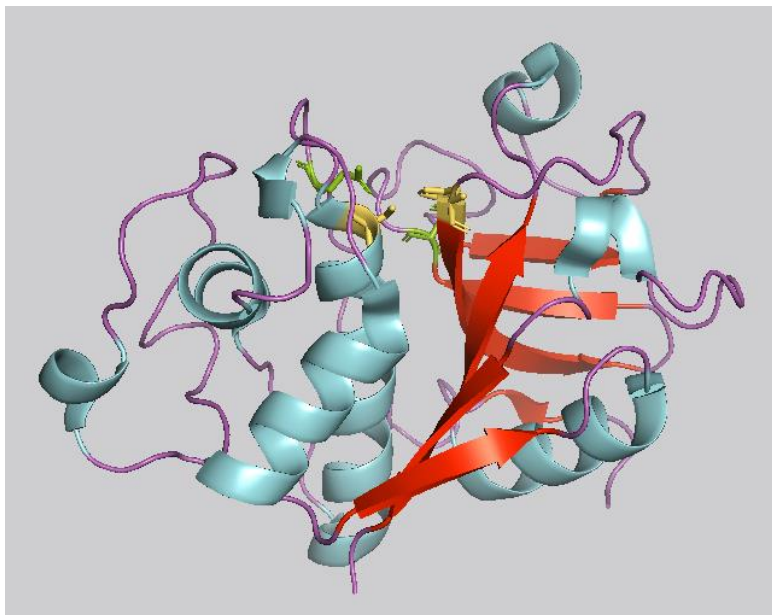


Figura 2. Estructura tridimensional de papaína (PDB 1PPN). En color verde se muestran las estructuras de hélices α , en naranja cadenas β . En color amarillo se muestran los residuos catalíticos Cys25 e His159. En verde se muestran los residuos Asn175 y Gln19.

Además de la Cys25 y de la His159 de la díada catalítica (numeración de la papaína), son importantes otros dos residuos para la catálisis de la papaína y otras enzimas de su familia. Estos residuos son la glutamina (Gln) en posición 19 que ayuda a la formación del “agujero oxianiónico”, un centro electrofílico que estabiliza al intermediario tetrahédrico y la Asparagina (Asn) en posición 175, la cual orientaría el anillo imidazólico de la His catalítica. En algunas familias (C12, C19, C28 y C39) la Asn es reemplazada por ácido aspártico (Asp). La cisteína catalítica normalmente es seguida por un aminoácido hidrofóbico aromático, aunque en algunas peptidasas de la familia C2 y en todas las de la familia C12 es la glicina la que ocupa esta posición (Rawlings and Barrett, 2013).

3.1.3. La familia C1

El árbol evolutivo en la base de datos de MEROPS para los miembros de la familia C1 muestra que la misma está dividida en dos subfamilias: C1A (o subfamilia de la papaína) y C1B (o subfamilia de la bleomicina-hidrolasa); este hecho puede justificarse considerando que una peptidasa de la familia C1 pudo estar presente en el antepasado universal de todos los organismos y que ésta evolucionó en una proteína del tipo de la subfamilia C1A en organismos ancestrales del dominio *archaea* y en una proteína del tipo de la subfamilia C1B en organismos ancestrales del dominio *bacteria*.

3.1.4. La subfamilia C1A

La familia de peptidasas cisteínicas mejor conocida es la de la papaína (C1), incluyendo endopeptidasas con amplia especificidad (tal como la propia papaína), endopeptidasas con especificidad más estrecha (como la glicil-endopeptidasa del látex de papaya), aminopeptidasas,

una dipeptidil-peptidasa y peptidasas con actividades tanto endo como exopeptidásicas (como las catepsinas B y H). Las enzimas de esta familia se encuentran en una gran variedad de organismos vivos: **endopeptidasas** de virus de ADN, protozoos, plantas y animales y **exopeptidasas** de bacterias gram-positivas, hongos y animales. Los homólogos de la papaína son generalmente proteínas lisosomales o de secreción. En las plantas se encuentran generalmente en las vacuolas, pero también en el látex de varias especies, en tanto que en artrópodos tales como langostas y garrapatas forman parte de las enzimas digestivas. Como excepción en este sentido puede citarse a la bleomicina-hidrolasa, una enzima citosólica presente en hongos y mamíferos.

Como ya hemos visto al referirnos a las endopeptidasas cisteínicas del clan CA, los residuos catalíticos esenciales son Cys e His, y otros residuos importantes para la catálisis como son Gln y Asn. Sin embargo no en todas las enzimas de esta familia están presentes, ejemplo de esto es la bromelaína de tallo que carece de Asparagina.

En general hay una fuerte conservación de la secuencia en la vecindad de los residuos esenciales de cisteína, histidina y asparagina mencionados (tabla 3)

| | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------|------------------|-----------|-------|-------|----------|-----|---------------|-----------|
| Papaína | VKNQGS | CWAFSAVVTIEGII | CGNKVD--- | HAVA | AVGYG | PNYILIKN | SWG | TGWG | ENGYIRIKR |
| Quimopapaína | VKNQACGS | CWAFSTIATVEGIN | CGTKLD--- | HAVT | AVGYG | KNYIIRKN | SWG | PNWGEKGYMRLKR | |
| Caricaína | VRHQGS | CWAFSAVATVEGIN | CGTKVD--- | HAVT | AVGYG | KGYILIKN | SWG | TAWGEKGYIRIKR | |
| Glicilendop. | VKHQYCES | CWAFSTVATVEGIN | CGTKVD--- | HAVT | AVGYG | KGYILIKN | SWG | PGWGENGYIRIRR | |
| Bromelaína ^a | VKNQNP | CGAWAFAAIATVESIY | CGTSLN--- | HAVT | AIGYG | IIY--- | PKK | WGAKEAGYIRMAR | |
| Actinidaína | IKSQEGCGS | CWAFSAIATVEGIN | CGTAID--- | HAVT | IVGYG | IDYWIVRN | SWD | TTWGEEGYMRILR | |
| Tomate ^b | VKDQGS | CWAFSAVAAMESIN | CGTAVD--- | HGVV | IAGYG | MDYWIVRN | SWG | ANCRENGYLRVQR | |
| Poroto mung ^b | VKDQQCGS | CWAFSTIVAVEGIN | CNTDLN--- | HGVA | IVGYG | TNYWIVRN | SWG | PEWGEQGYIRMQR | |
| Aleuraína | VKNQAHCGS | CWTFSTTGALAEAY | CGTTPDDVN | HAVL | AVGYG | VPYWLTKN | SWG | ADWGDNGYFKMEM | |
| Orizaína-α | IKDQGGCGS | CWAFSAIAAVEDIN | CGTALD--- | HGVA | AVGYG | KDYWIVRN | SWG | KSWGESGYVRMER | |
| Tabaco ^b | VKNQGS | CWSFSTTGAVEGAH | PLICFKRQD | HGVLL | VGYG | KAYWIIRN | SWG | ENWGEHGYKICR | |

Figura 3. Conservación de la secuencia alrededor del sitio activo en proteasas vegetales pertenecientes a la subfamilia de la papaína. Se ha destacado la posición de Cys-25, His-159 y Asn-175 (no conservada en bromelaína). Las letras en azul indican aminoácidos conservados en la secuencia, en relación con la papaína. ^(a)Bromelaína de tallo; ^(b)material vegetal del que se ha aislado la endopeptidasa; (adaptado de Rawlings & Barrett, 1994).

Dentro de esta subfamilia puede observarse una clara división entre las enzimas tipo papaína y las enzimas tipo catepsina B. Es de destacar que entre las enzimas tipo papaína se encuentran

las catepsinas O, H, L, K y S, habiéndose demostrado una relación muy cercana entre la catepsina H de mamíferos y la aleuraina de plantas (Novinec and Lenarčič, 2013).

La papaína, como la mayoría de los miembros de esta familia, muestra mayor afinidad por residuos hidrofóbicos voluminosos en el subsitio S2 (ver sección 3.2.3), en tanto que la catepsina B acomoda preferencialmente en ese subsitio arginina (al menos en el caso de sustratos pequeños). En la papaína la Ser-205 se ubica en el fondo del bolsillo de este subsitio, pero es reemplazada por Glu en la catepsina B, que es más apropiada para formar un puente iónico con una cadena lateral de arginina. Otros homólogos de papaína que contienen Glu en esta posición incluyen las peptidasas de *Brassica sp.*, tomate, cebada y arroz.

Muchos miembros de la familia contienen un residuo prolina en posición como segundo aminoácido del extremo N-terminal en la enzima madura. Este residuo parece estar involucrado en la prevención de la proteólisis no deseada del extremo amino por aminopeptidasas, ya que las uniones X-Pro son resistentes a este tipo de enzimas. Un análisis evolutivo de la familia C1 permite distinguir dos subfamilias. La mayor de ellas incluye enzimas secretadas y lisosomales (o vacuolares) y entre ellas pueden distinguirse dos grupos, las del “tipo catepsina B” y las del “tipo papaína”. Dentro de este último grupo se encuentran la mayoría de las peptidasas cisteínicas de plantas. La subfamilia menor contiene varias aminopeptidasas intracelulares solubles. (Novinec and Lenarčič, 2013).

3.2. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas

3.2.1. Mecanismo Catalítico General

El mecanismo catalítico de las peptidasas cisteínicas es esencialmente similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas siendo también ejemplo de catálisis covalente, con la formación de la acil-enzima y de catálisis ácido base. Sin embargo, una diferencia mecanística destacable es que en las proteasas cisteínicas el residuo nucleofílico Cys del sitio activo se encuentra ionizado previamente conteniendo el ion tiolato en tanto que el residuo His presenta una carga positiva en el ion imidazólico, independientemente de la unión con el sustrato (Polgár, 2013). En las proteasas serínicas, por el contrario, el residuo nucleofílico Ser comienza a ionizarse sólo luego de producida la interacción con el sustrato.

Un esquema del mecanismo completo de la reacción se muestra en la Figura 4. La reacción puede considerarse dividida en dos fases. La fase de acilación (pasos 1 a 4) donde la formación del intermediario acil-enzima covalente está acoplado al clivaje del enlace peptídico y la fase de desacilación (pasos 5 a 8) en la que se regenera la enzima libre. La desacilación es esencialmente un proceso inverso a la acilación, con una molécula de H₂O en reemplazo del componente aminoácido del sustrato (Elsässer et al., 2017).

3.2.2. Características Estructurales Relacionadas a la Catálisis

Como se vio anteriormente, las peptidasas cisteínicas requieren la presencia del grupo tiol de un residuo de cisteína para manifestar su actividad. Estas enzimas están constituidas normalmente por una única cadena polipeptídica plegada formando dos dominios (sección 3.1.2) que delimitan un surco en el cual el sustrato puede unirse. Los residuos Cys25 e His159 del sitio activo (numeración de papaína madura) están ubicados en la interfase de este surco, en los dominios opuestos de la enzima. Otros residuos aminoacídicos cercanos al sitio activo pueden jugar diferentes roles en el mecanismo catalítico.

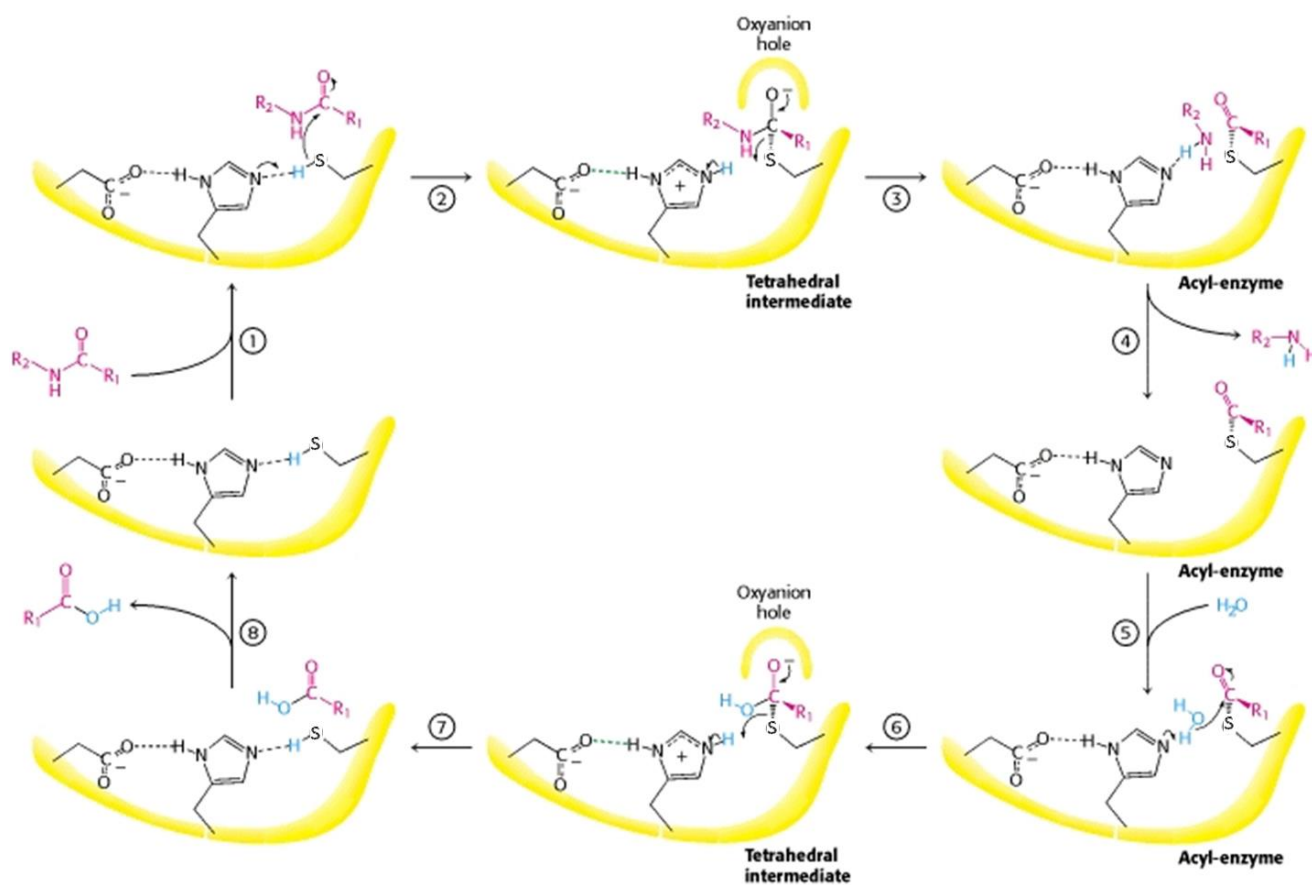


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes pasos y de los intermediarios y estados de transición putativos involucrados en el mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de un sustrato amídico por una peptidasa cisteínica.

A partir de los datos estructurales existentes se ha verificado que el grupo catalítico tiol de las peptidasas cisteínicas está ubicado en el extremo de una α -hélice la que provee estabilidad suficiente para que el par iónico exista dentro de un amplio rango de pH. También se ha argumentado que la interacción electrostática entre los residuos catalíticos de cisteína e histidina

resultaría suficiente para que el par iónico resulte estable a pH neutro y que el par sería extremadamente sensible a la geometría de la región del sitio activo.

Como se comentó anteriormente, un residuo de asparagina parecería ser de importancia en el mecanismo catalítico. El oxígeno amídico de la cadena lateral de Asn175 (numeración de la papaína) está unido, por un puente de hidrógeno, a un nitrógeno del anillo imidazólico de la His159, generando una tríada Cys-His-Asn que es considerada a menudo análoga al arreglo Ser-His-Asp de las peptidasas serínicas. El rol del residuo Asn175 puede ser el de re-direccionar al imidazol, de modo de colocarlo en posición óptima para cada una de las distintas etapas del mecanismo catalítico, además de ayudar en la estabilización del par tiolato-imidazolato, manteniendo al anillo imidazólico en una orientación relativa favorable con respecto al residuo cisteínico (Barrett *et al.*, 1998).

3.2.3. Mecanismo de Unión del Sustrato

El acoplamiento de las interacciones entre la enzima y el sustrato al proceso hidrolítico que ocurre en el sitio activo es un aspecto importante de la catálisis.

La comprensión de las interacciones entre las peptidasas cisteínicas y sus sustratos ha sido y sigue siendo el principal desafío en la investigación sobre estas enzimas. La papaína sirvió de modelo en el trabajo pionero de Schechter y Berger (Schechter and Berger, 1967), en el que propusieron la nomenclatura para las posiciones de los residuos de sustrato (P) y los subsitios (S) donde se unen los sustratos a la superficie de una proteasa (Figura 5). Las posiciones y subsitios se numeraron en ambas direcciones desde el enlace escindible entre los residuos P1 y P1' en adelante, donde el lado no prima, se refiere a al extremo N-terminal del sustrato y el lado prima a al extremo C-terminal del sustrato. En su trabajo pionero, encontraron que para la papaína existen siete residuos de sustrato que se unen en siete subsitios, cuatro desde el enlace escindible hacia el extremo N-terminal y tres hacia el extremo C-terminal (desde S4 a S3').

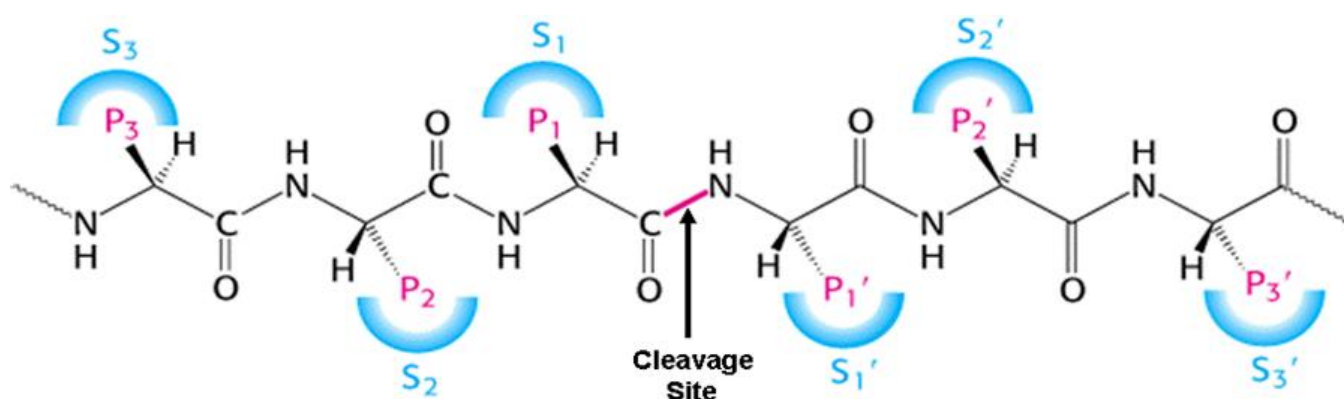


Figura 5. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa.

Tres décadas más tarde, trabajos realizados por Turk y colaboradores han hecho una revisión y redefinición de los sitios de unión al sustrato utilizando la información proporcionada por las estructuras cristalinas de los complejos con inhibidores que imitan a pequeñas moléculas sustrato (Biniossek et al., 2016). Estas estructuras muestran que un sustrato se une a lo largo de la hendidura del sitio activo en una conformación extendida (Turk and Turk, 2003; Vizovišek et al., 2018). Sus cadenas laterales hacen contactos alternos con los dominios L y R. El posicionamiento alternado de las cadenas laterales del sustrato sugiere que puede haber un efecto de cooperatividad entre los residuos orientados hacia la superficie de la enzima, en particular, P1 y P2' parecen estar lo suficientemente cerca como para poder interactuar. Sin embargo, todavía falta la evidencia experimental para este último.

3.2.4. Precursores de las endopeptidasas de la subfamilia C1A

Las enzimas que entran en la vía secretora, ya sea para ser destinadas a la secreción o al sistema lisosomal (o vacuolar en plantas), son sintetizadas como precursores inactivos conteniendo un péptido señal y un propéptido, además de una extensión C-terminal. (Cambra et al., 2012). La secuencia N-terminal consiste en una secuencia señal de 10 a 20 residuos aminoacídicos que es seguida de la pro-secuencia o propéptido que tiene una extensión entre 38 y 250 residuos. La tercera parte del precursor representa la cadena polipeptídica de la enzima madura, generalmente constituida por 220 a 260 residuos aminoacídicos de largo seguida de la extensión C-terminal (Wiederanders, 2003).

El precursor de la peptidasa se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso y el péptido señal se elimina al ingresar al lumen del mismo. La activación de la enzima se produce al llegar al lugar de destino: las vacuolas o la pared celular, en los vegetales (Vorster et al., 2019).

La activación del precursor requiere del clivaje proteolítico del propéptido, que también funciona como un inhibidor de la enzima madura (Wiederanders, 2003).

Las estructuras de precursores de proteasas cisteínicas y sus estudios revelaron cómo el propéptido se une a la enzima madura y permitieron vislumbrar el mecanismo inhibitorio del propéptido (Vizovišek et al., 2018). La mayoría de los pro-péptidos de proteasas cisteínicas comparten el mismo plegamiento que consiste de dos partes: la porción N-terminal que está formada por dos α hélices y una cadena β extendida y que interactúa con una superficie localizada en la porción correspondiente de la proteasa madura denominada "loop que une al propéptido" y el segmento C-terminal que se enlaza entre los dos dominios de la enzima y está fijado a los subsitios S' por una corta α hélice. De este modo la estructura descrita cubre el sitio de unión al sustrato impidiendo el acceso al centro catalítico de la enzima. Dado que el propéptido se une en dirección opuesta a la de un sustrato, aunque las cadenas laterales del propéptido utilicen los mismos sitios de unión que las de un sustrato, la orientación reversa de la cadena polipeptídica

posiciona a la unión peptídica de manera tal que no puede ser escindida por la enzima (Biniossek et al., 2016; Cambra et al., 2012)

Los propéptidos contienen algunos elementos característicos que se encuentran altamente conservados. Turk y colaboradores compararon las secuencias N-terminales de 15 pro-enzimas cisteínicas e identificaron el motivo discontinuo ERFNIN, ubicado en la α -hélice denominada 2 (Turk et al., 2012). Este motivo no aparece en la catepsina B, la que además presenta una hélice α 2 mucho más corta. Sobre esta base definieron dos grupos de cisteín proteasas a los que denominaron tipo catepsina L (conteniendo el motivo ERFNIN) y tipo catepsina B (sin el motivo antes mencionado.) definen un tercer grupo, llamado tipo catepsina F, que se caracteriza por la presencia del motivo ERFNAQ (Cambra et al., 2012).

Otro motivo altamente conservado es el heptapéptido GxNxFxD (GNFD, en forma abreviada). Este motivo fue encontrado en la mayoría de los pro-péptidos de las proteasas cisteínicas y se encuentra localizado en la zona de cadena β . El residuo Asp de este motivo ha demostrado ser fundamental para el procesamiento correcto del precursor, pues su reemplazo por Asn, Tyr, Met, Val o Glu produjeron mutantes de papaína inactivos (Verma et al., 2016). Delaria y colaboradores (Delaria et al., 1994) detectaron que el propéptido de la papaína es homólogo al de las proteínas CTLA-2 α y CTLA-2 β de linfocitos T activados; estas proteínas son inhibidores de endopeptidasas cisteínicas.

4. BROMELIACEAE: CARACTERÍSTICAS GENERALES

La familia *Bromeliaceae* está constituida por alrededor de 2700 especies, incluidas en aproximadamente 56 géneros. La especie mejor conocida es el ananá (*Ananas comosus* L.). La familia contiene un amplio rango de plantas, algunas muy distintas del ananá.

Se trata de una familia neotropical, lo que significa que crece virtualmente en forma exclusiva en los trópicos (y subtrópicos) del Nuevo Mundo. La mayoría proviene de Sudamérica, con el más grande número de especies halladas en Brasil, pero se extienden desde Chile y Argentina en Sudamérica a través de Centroamérica y el Caribe, alcanzando el límite norte en los alrededores de Virginia, en el sudeste de los EE.UU. Una única especie (*Pitcairnia feliciana*) ha sido encontrada en el oeste de África.



Figura 6. Distribución geográfica de la Familia *Bromeliaceae* (fuente: <https://blogs.reading.ac.uk/tropical-biodiversity/2017/12/wanderlust-tropics-a-naturalist-journey-into-bromeliaceae/>)

Todas las *Bromeliaceae* están compuestas de un arreglo foliar espiralado denominado “roseta”, donde las bases foliares se superponen parcialmente y pueden funcionar como un reservorio hídrico, aunque las especies ancestrales carecen de esta capacidad y dependen esencialmente de su sistema radicular para la absorción de agua y de nutrientes. Por su parte las raíces de las especies epífitas se endurecen luego de su crecimiento para transformarse en zarcillos que le permiten asirse a su soporte (no se trata de plantas parásitas). En algunas especies terrestres las bases de las hojas forman pequeñas cámaras que sirven de refugio a las hormigas, cuyos desechos pueden ser utilizados por la planta como un fertilizante adicional.

4.1. Endopeptidasas de *Bromeliaceae*

Las enzimas proteolíticas se hallan ampliamente distribuidas en las plantas superiores y la importancia fisiológica de las mismas radica en que la degradación de las proteínas y la reutilización de sus aminoácidos resultan indispensables para el desarrollo de la planta, desde el momento mismo de la germinación de las semillas. Sin embargo, existen algunas familias en las que esta clase de enzimas son producidas en cantidades que exceden de manera notoria, el potencial necesario para tal recambio. La mayoría de las fitoproteasas estudiadas pertenecen a familias caracterizadas por producir látex (*Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae*). Entre las familias que carecen de laticíferos pero que producen proteasas en cantidades inusuales se destaca la de las *Bromeliaceae*, siendo *Ananas comosus* L. (el "ananá") la especie más estudiada en este sentido y la bromelaína -la proteasa obtenida de tallos y frutos- una de las enzimas más comercializadas (Heinicke & Gortner, 1957), habiéndose descrito numerosas aplicaciones industriales y medicinales de la misma (de Lencastre Novaes et al., 2016; Pavan et al., 2012; Z.A. and T., 2017).

4.1.1. Endopeptidasas de *Ananas comosus* L.

El nombre "bromelaína" o "bromelaína" es actualmente utilizado para denominar a las principales proteasas obtenidas a partir de tallos y frutos de *Ananas comosus* L. Los nombres "bromelaína de tallo" y "bromelaína de fruto" han sido usados para describir a las enzimas responsables de la actividad proteolítica mayoritaria de los jugos de tallos y frutos de ananá, respectivamente (Rowan et al., 1990). Adicionalmente dos endopeptidasas menores (ananaína y comosaína) fueron separadas de tallo de ananá (Rowan, 2013a, 2013b)

4.1.2. Bromelaína de tallo

La bromelaína de tallo (EC 3.4.22.32) es la proteasa predominante (casi el 90%) en los extractos de tallos de *Ananas comosus* y se trata de una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa (Harrach et al., 1995) con un punto isoeléctrico (pI) de 9,55 conteniendo siete residuos Cys (Harrach et al., 1995; Napper et al., 1994) y tres puentes disulfuro. La secuencia aminoacídica completa ha sido deducida por Ritonja y colaboradores (Ritonja et al., 1989), siendo su masa molecular de 22.831 Da. Para expresar su máxima actividad la enzima requiere la presencia de agentes reductores tales como β -mercaptoetanol. El pH óptimo, tanto con sustratos sintéticos como proteicos es amplio a pesar de su elevada actividad sobre distintos sustratos proteicos, actúa eficientemente sobre sustratos sintéticos que contengan uniones Arg-Arg. También se ha comunicado una cierta preferencia de la enzima por aminoácidos polares en las posiciones P1 y P1'. Una característica distintiva de esta proteasa es su relativamente débil inhibición por E-64 y la

carencia de inhibición por cistatina de pollo, lo que la diferencia de la mayoría de las peptidasas de la familia C1 (Rowan, 2013c)

4.1.3. Ananaína

Del extracto de tallo del ananá, se purificó una enzima distinta a la bromelaína de tallo, que representa el 5% de las proteínas, la que fue denominada como ananaína (Rowan et al., 1990). A diferencia de la bromelaína de tallo, la ananaína muestra baja preferencia por sustratos sintéticos que contengan Arg-Arg y alta actividad con los sustratos Z-Phe-Arg-NHMec y a Bz-Phe-Val-Arg-NHMec. Ananaína muestra mayor preferencia por aminoácidos polares en la posición P1', mientras que el requerimiento para el sitio P1 es mucho menos específico (Napper et al., 1994), en tanto que en el sitio P2 manifiesta preferencia por una cadena lateral hidrofóbica. El pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es cercano a la neutralidad. Ananaína no es glicosilada, y su pl es > 10. Contiene siete residuos Cys y en su secuencia primaria contiene un inserto entre los residuos 170 y 174 que no está presente en bromelaína de tallo ni en papaína y una serie de aminoácidos hidrofóbicos adyacentes a la His-157 (Lee et al., 1997). El comportamiento de la enzima frente a los inhibidores es similar al de la papaína, ya que es eficientemente inhibida tanto por cistatina de pollo como por E-64 (Rowan, 2013a).

4.1.4. Comosaína

Comosaína es la endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de ananá y representa menos del 1% de las proteínas totales. Se trata de una glicoproteína de 24,5 kDa y pl > 10, conteniendo siete residuos Cys y tiene una composición similar en carbohidratos a la bromelaína de tallo, pero es marcadamente diferente en su composición aminoacídica (Napper et al., 1994). Tiene actividad sobre Z-Arg-Arg-NHMec, muestra preferencia por residuos polares tanto en el sitio P1 como P1' y es inhibida por E-64 (Rowan, 2013b)

4.1.5. Bromelaína de fruto

La preparación denominada "bromelaína de fruto" (EC 3.4.22.33) constituye el 30-40% de las proteínas totales del fruto y casi el 90% del material proteolíticamente activo y al igual que la bromelaína de tallo, tiene un amplio pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos. Se trata de una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 25 kDa cuyo pl es 4,6 (Rowan et al., 1990). La secuencia N-terminal es idéntica a la de bromelaína de tallo, pero es inmunológicamente distinta de ésta y de ananaína (Rowan et al., 1990). Tiene preferencia por el sustrato sintético Bz-Phe-Val-Arg-NHMec y no por Z-Arg-Arg-NHMec, lo que la diferencia de la bromelaína de tallo (Rowan, 2013d).

4.1.6. Otras peptidasas de la familia *Bromeliaceae*

A pesar del elevado número de integrantes de la familia Bromeliaceae es muy reducido el número de géneros, todos pertenecientes a la subfamilia Bromelioideae, que han sido estudiados hasta la fecha en busca de enzimas proteolíticas (*Ananas*, *Bromelia*, *Hohenbergia* y *Pseudananas*). Otras proteasas de Bromeliaceae que han sido aisladas y caracterizadas incluyen a la hemisfericina, a partir de frutos de *Bromelia hemispherica* (Agundis *et al.*, 1977; Ochoa *et al.*, 1987), pinguinina, obtenida de frutos de *Bromelia pinguin* (Toro-Goyco *et al.*, 1980; Abreu Payrol *et al.*, 2008), karatasina, aislada de frutos de *Bromelia plumieri* (Montes *et al.*, 1990), macrodontaína I y II de frutos inmaduros de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Brullo *et al.*, 1994, Natalucci *et al.*, 1996, López *et al.*, 2000 y 2001; Brullo, 2003); balansaína I de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2000); hieronymaina I, II y III aisladas de frutos inmaduros de *Bromelia hieronymi* Mez. (Bruno *et al.*, 2003, 2006, 2008), fastuosaína, extraída de frutos inmaduros de *Bromelia fastuosa* (Cabral *et al.*, 2006) y penduliflorain I, obtenida a partir de frutos de *Hohenbergia penduliflora* (Pérez *et al.* 2010).

5. BROMELIA ANTIACANTHA BERTOLONI

5.1. Descripción de la especie

Bromelia antiacantha Bertol. es una planta terrestre grande, de hasta 2m de altura, con tallo corto y grueso, emitiendo estolones también gruesos. Ápice foliado y el resto escamado, hojas muy numerosas en general con 2m de longitud, dispuestas en la roseta sin formar tanque, láminas rigurosamente erguidas, hacia el ápice un poco curvas, densamente cubiertas por espinas en los márgenes, siendo los de la base hacia abajo y los demás hacia arriba. La inflorescencia emerge del centro de las hojas y está compuesta por muchas ramas y provista de muchas flores (Figura 7) que forman centenares de bayas verdes cuando inmaduras y amarillas cuando maduras (Samantha Filippon et al., 2012).



Figura 7. *Bromelia antiacantha* Bertol A) Detalle de inflorescencia con las brácteas rojas

Se desenvuelve principalmente en suelos muy húmedos, en restingas arbóreas, herbáceas y arbustivas. Se establece como vegetación secundaria, formando siempre densos agrupamientos de forma discontinua en los diversos ambientes en el que se ubica (Gerber et al., 2017). Las bromelias establecen relaciones ecológicas en el ambiente en el que se inserta, pudiendo abastecer de agua y nutrientes, generando un microclima que favorece la presencia de invertebrados, anfibios anuros y reptiles, además de proporcionar néctar y frutos como alimentos para aves y otros animales, favoreciendo la polinización y dispersión de semillas (Duarte and Gandolfi; 2013 De Paula, 2015).

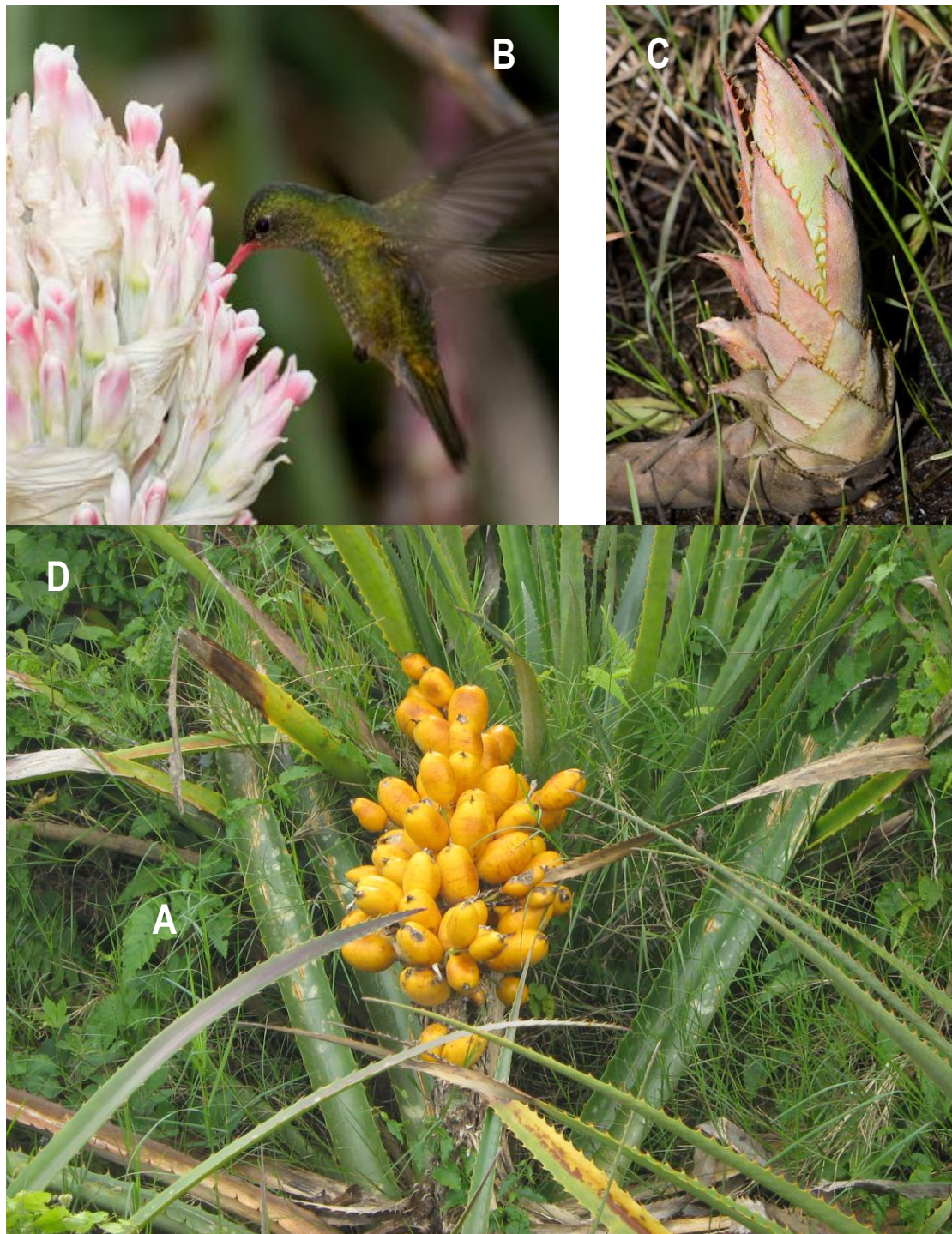


Figura 8. *Bromelia antiacantha* Bertol B) La polinización es realizada mayormente por picaflores C) Septos o brotes laterales D) Detalle de frutos maduros.

Se ubica a lo largo de la mata atlántica, desde Río de Janeiro Brasil hasta el departamento de Rocha, Uruguay, donde se la ve en suelos húmedos de bosques y entre la vegetación secundaria (Filippon, S. et al., 2012) (Figura 9).

La especie posee flores perfectas y su reproducción puede ser tanto sexuada como asexuada (vegetativa), pudiendo emitir uno o más brotes laterales luego de finalizado el período de floración (Dettke & Milaneze-Gutierrez, 2008).

Antes de aparecer las inflorescencias, lo que antecede al período reproductivo, la especie presenta en el centro de la roseta, brácteas rojas (pseudo-pétalos). La inflorescencia es subcilíndrica, de 0.2-1 m de largo y 6-30 cm de diámetro y porta de 150-350 flores; abriéndose de 10-35 de ellas durante un lapso de 4-5 días. *Bromelia antiacantha* florece de Diciembre a Febrero (Dettke & Milaneze-Gutierrez, 2008) y durante este período las hojas centrales y los bractos exhiben un llamativo rojo brillante. Las flores son de un tono magenta oscuro con bordes blancos. Tienen forma tubular y presentan una amplia apertura; estando situado sus estigmas debajo de las anteras. Los picaflores son sus más frecuentes polinizadores (De Paula, 2015), visitándolas generalmente en la tarde. El color de la corola, su apertura, el perfume dulce y la concentración más densa de néctar al comenzar el día también favorece la llegada de abejas y abejorros. La fructificación comienza en torno al mes de febrero y puede prolongarse hasta el mes de junio. El fruto es ovoide o elipsoide, de unos 50 mm de largo y 25 mm de diámetro; de color amarillo/anaranjado en su estado maduro, con un sabor pungente y astringente. Estos son conocidos popularmente como banana-do-mato (Figura 7 y 8)

5.2. Usos

La *Bromelia antiacantha* presenta características medicinales, alimenticias, ornamentales e industriales (fabricación de fibras para tejidos; además de cuerdas y fabricación de jabón a partir de los frutos reuniendo en una única especie potenciales múltiples (Filippon, S. et al., 2012; Krumreich et al., 2015)

La utilización de sus frutos en la medicina popular ha sido descrita desde antes de la colonización europea, por la población indígena, que los consumían en forma natural o lo utilizaban en la preparación de jarabes para el tratamiento de trastornos respiratorios. y como emolientes, una tradición que fue seguida por los colonizadores europeos (Fabri & Batista Marques da Costa, 2012; De Paula, 2015).

En la medicina popular, se describen también otras aplicaciones como anti-helmíntica, antitusígena y en el tratamiento de cálculos renales (Manetti et al., 2010).



Figura 9. Ubicación geográfica del sitio de recolección de *Bromelia Antiacantha*. Laguna Negra, Departamento de Rocha, Uruguay.

6. POTENCIALIDADES TECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

6.1. Aplicaciones industriales

Las aplicaciones industriales representan más del 80 % del mercado global de enzimas, siendo éstas usadas tanto en procesos en los cuales la conversión enzimática de la materia prima en el producto es la operación central, como en aquellos casos en que la enzima es empleada como aditivo para mejorar la funcionalidad del producto al que es agregada.

La mayor parte de las enzimas empleadas de manera convencional en la industria de procesos son hidrolasas. La razón de esto estriba en que, de las seis familias de enzimas (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y sintetetasas), las hidrolasas son aquellas mejor dotadas para realizar biocatálisis, por ser proteínas de estructura relativamente simple, resistentes a condiciones más extremas, frecuentemente extracelulares y sin requerimientos de coenzimas, lo que tiene profundas implicancias tanto en los costos de producción de la enzima como en su eficiencia de uso (Illanes, 2009).

Las proteasas son las enzimas de mayor relevancia tecnológica, representando cerca de la mitad del mercado de enzimas de uso industrial. Las previsiones para el año 2025 es que el mercado mundial de enzimas para uso industrial alcance los USD 12,84 mil millones ("Industrial Enzyme Market-Transparency Market Researches," 2019)

Las industrias donde estas enzimas tienen un mayor protagonismo son: la industria de alimentos (para consumo humano y animal), la industria de detergentes, la industria textil y del cuero, que emplean de manera masiva diferentes tipos de hidrolasas. Debe destacarse que, no obstante los notables avances en biocatálisis, aún representan la mayor fracción del mercado de enzimas.

En el mercado global de las proteasas, varias fitoproteasas cumplen un preponderante y casi exclusivo en ciertas aplicaciones, siendo la papaína (proveniente del látex de la papaya), la bromelaina (proveniente del tallo de la piña) y la ficina (proveniente del látex de la higuera) las más relevantes.

6.2. Aplicaciones industriales de las peptidasas vegetales

El porcentaje que ocupan en la industria las proteasas de origen vegetal es bajo en comparación con el resto de las enzimas, pero no dejan de tener un rol preponderante en ciertas aplicaciones. (Feijoo-Siota & Villa, 2011).

La papaína tiene múltiples usos que van desde el ablandamiento de carnes (Guevara & Daleo, 2018), clarificación de cerveza, producción de extracto de levadura, en limpieza dental hasta aplicaciones más específicas que requieren de un preparado purificado, como lo requiere las aplicaciones en cosmetología y medicina (Polaina & MacCabe, 2007). El caso de la bromelaina

es muy similar, siendo en el área médica (anti-inflamatorio, cicatrizante, ayuda-digestivo etc.) donde su utilización es preponderante (Ramli et al., 2017).

En Latinoamérica, diversas especies de Bromeliaceae han sido de gran importancia para el hombre desde tiempos ancestrales. En las distintas regiones se les ha dado un uso particular, que puede ser enmarcado en las siguientes categorías: ceremonial, comestible, textil, medicinal, ornamental y combustible, entre otros.

El uso de estas enzimas provenientes de fuentes vegetales se ha incrementado gracias al renovado interés en la aplicación de procesos enzimáticos pertenecientes a la *Química Verde*, o sea respetuosa de la ecología y del medio ambiente. Sin embargo, el número de proteasas vegetales aisladas y caracterizadas es aún muy bajo, ya que hasta la fecha se han estudiado menos del 1% de las especies vegetales conocidas.

Tomaremos varios casos de áreas diversas para ejemplificar y examinar la utilización de enzimas proteolíticas en el terreno industrial y terapéutico, en los cuales existen aplicaciones de las proteasas vegetales.

6.2.1. Industrias Alimentarias

La utilización de enzimas en los modernos procedimientos de fabricación de alimentos presenta, para el sector industrial y para los consumidores, una serie de ventajas, de índole económica y/o tecnológica.

Las enzimas requieren obtener el estatus de GRAS (Generally Recognized as Safe) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) americana, lo cual no es muy difícil, si la fuente de la que provienen es de un producto natural y comestible como frutas y otros vegetales. Esto abre inmensas posibilidades en la exploración y explotación de nuevos recursos naturales que permitan enriquecer el amplio espectro de enzimas proteolíticas aptas para aplicar en las industrias alimentarias o farmacéuticas.

6.2.1.1. Cervecería

En la industria cervecera, desde la preparación del extracto de malta o cebada malteada (granos de cebada que han germinado moderadamente y han sido secados), hasta la filtración final y embotellamiento el proceso tiene varios puntos en los cuales la introducción de enzimas hidrolíticas mejora los resultados finales.

Algunas de las materias primas sustitutivas, granos crudos, pueden necesitar adición de proteínas, como compuestos nitrogenados, y por consiguiente se debe agregar proteasas para ayudar en la degradación. La cerveza debe poder enfriarse sin enturbiarse. Para que tenga buena estabilidad al frío y no se enturbie no deben formarse compuestos tanino-proteína, que son

solubles a temperatura ambiente pero no en frío por lo cual la acción e proteasas mejora el aspecto, disminuyendo la turbidez (Gomaa, 2018).

6.2.1.2. Panificación

Las enzimas proteolíticas tienen un importante papel en la tecnología de la panificación. Son responsables de las principales reacciones bioquímicas que tienen lugar durante la fermentación de la masa de los productos panificados. Condicionan la calidad, tiempo de conservación y comercialización de los mismos. El uso de enzimas exógenas conduce a mejorar el volumen de las piezas, las características externas (simetría de la pieza, suavidad, uniformidad de la corteza etc.) e internas (textura y calidad de la miga) del pan, teniendo efecto sobre las propiedades organolépticas, como aroma y sabor (Moodie, 2001; Sumantha et al., 2006).

6.2.1.3. Productos Lácteos

El mayor campo de aplicación de las enzimas proteolíticas en la industria láctea es la elaboración de quesos. La primera fase de la producción de quesos es la coagulación de la leche. Tradicionalmente se agrega una proteasa (renina o quimosina) aislada del tracto digestivo de rumiantes jóvenes. Otra alternativa viable, es la utilización de enzimas de origen vegetal, en especial las derivadas de la familia *Astraceae* que, desde tiempos muy remotos, son utilizadas en Europa para la producción de quesos artesanales de cabra y oveja (Moreno-Hernández et al., 2017). El uso de estos preparados permite la obtención de productos de calidad constante. Las enzimas desempeñan un papel decisivo en la maduración de quesos especialmente las proteasas y lipasas (Sumantha et al., 2006)

6.2.1.4. Derivados cárnicos y de la Pesca

La terneza de la carne es el atributo más importante que rige la aceptabilidad del consumidor, la satisfacción del consumidor y las tendencias de compra recurrentes y el valor de mercado de la carne y los productos cárnicos (Arshad et al., 2016)..

El uso de proteasas exógenas para el ablandamiento de la carne es un método relativamente progresivo para mejorar la calidad de la misma. El uso de enzimas reduce la cantidad de tejidos conectivos y no descompone las proteínas miofibrilares. Las enzimas proteolíticas son más adecuadas para la degradación del colágeno y la elastina en el tejido conectivo a un pH relativamente bajo y una temperatura moderada. La papaína y la bromelaína son las enzimas vegetales más comúnmente utilizadas para el ablandamiento de la carne (Fernández-Lucas et al., 2017).

Otro uso que tienen las enzimas, relacionado a la industria de la carne, es la obtención de un hidrolizado de células sanguíneas que al ser secado se convierte en polvo de color blanco que puede integrarse a muchos productos cárnicos como agente nutritivo. Este hidrolizado es soluble

en salmuera y puede incorporarse a trozos enteros de carne, por ejemplo a jamones (Tantamacharik et al., 2018).

En la producción de harinas de pescado, se prensa el pescado para reducir su contenido de agua. Esta agua de prensado o de cola contiene proteínas, material disuelto y sólidos finos en suspensión. El producto es tan viscoso que se solidifica y puede obstruir las tuberías de las fábricas e impedir transferencia térmica eficaz en evaporadores. Hay preparados comerciales que hidrolizan las proteínas de pescado en el agua de cola, disminuyendo su viscosidad (Karnjanapratum & Benjakul, 2014).

La conversión enzimática de los desechos de pescado en hidrolizado de proteínas, además de ser una solución para minimizar los problemas de contaminación relacionados con las operaciones de procesamiento de productos del mar, genera valor al procesamiento de los subproductos.

Los hidrolizados de proteínas de pescado (FPH), se ha visto tienen varias propiedades lo que ha despertado un interés especial en su explotación comercial (Elavarasan & Shamasundar, 2016).

6.2.2. Industria de los Detergentes

La industria de los detergentes es a nivel comercial una industria altamente competitiva. Las indicaciones y enzimas elegidas para un detergente específico dependen naturalmente del perfil de lavado y estrategia de comercialización de la marca.

Las proteasas hidrolizan las proteínas a polipéptidos más solubles o aminoácidos libres y en conjunto con los tensoactivos logran eliminar las manchas más difíciles (Bersi et al., 2019).

La aplicación de enzimas para lavar ha crecido debido al deseo de ahorrar energía, se manipulan los parámetros como tiempo de aplicación y concentración enzimática para obtener resultados satisfactorios a temperaturas bajas (Feijoo-Siota and Villa, 2011).

En la formulación de detergentes biológicos hay que usar enzimas estables frente a agentes blanqueantes, para que no pierdan actividad durante el almacenamiento. En algunas formulaciones de detergentes suelen sobre dosificarse algunos componentes para mejorar su eficacia. El agregado de enzimas, permite, sin aumentar costos, eliminar la sobredosificación y obtener un producto más amigable con el medio ambiente (Barberis et al., 2013).

6.2.3. Industria Textil

Hasta mediados de la década del noventa el tratamiento enzimático por excelencia, en la industria textil, fue el descolado. A partir de esa época la tecnología enzimática viene posicionándose en esta industria. Actualmente se realizan procesos enzimáticos de biopulido, sustitutivos del lavado a la piedra, suavizado, eliminación de blanqueantes, tintas y abrasión, además del descolado. Todos estos procedimientos han mejorado el trabajo, el rendimiento y de manera muy importante han bajado el nivel de agresión al medio ambiente.

Las fibras artificiales que se protegen con proteínas, como la gelatina (derivada del colágeno), necesitaran un tratamiento con proteasas, generalmente del mismo origen que las amilasas, para ser “desencolados”(Ramli et al., 2017).

Son también proteasas las empleadas para desengomar la seda natural pues ésta, en bruto, está recubierta de sericina, que la vuelve rígida y opaca. La técnica con proteasas sustituye el antiguo método, poco eficiente, de hervir los hilos de seda en una solución jabonosa alcalina (Mahajan et al., 2015)

Se ha demostrado también que la bromelaína puede mejorar las propiedades de teñido de las fibras proteicas como la seda y la lana. La bromelaína puede eliminar las impurezas y las incrustaciones en la lana y la seda, mejorando la accesibilidad del tinte y conservando las propiedades de tracción de las fibras (Ramli et al., 2017).

6.2.4. Industria del Cuero

Las etapas de tratamiento de las pieles antes del curtido, son los puntos preferenciales de aplicación de enzimas en las curtiembres. En especial la tecnología enzimática se hace presente en los momentos de remojo y depilación. Con el remojo se busca rehidratar las pieles hasta aproximarse al estado de la piel fresca para obtener cueros de alta calidad. En el depilado o pelambre tradicional, para sacarle a la piel los pelos o lana, se aplicaban cal hidratada y sulfuro de sodio, compuestos muy “duros”, que disolvían el pelo abriendo la estructura de las fibras.

En sustitución se usan enzimas proteolíticas, solas o auxiliadas por sulfuros. Las enzimas mejoran las propiedades del cuero dando una textura de fibras más sueltas y mayor suavidad. El uso solo de enzimas ofrece la ventaja de dar una superficie de flor más limpia y proveer fibras de mejor calidad (Jabalía et al., 2014).

El curtido es la acción que permite obtener un cuero más flexible. El cuero suele someterse a dos curtidos. El primer curtido al cromo es fundamentalmente estabilizante y el siguiente recurtido, teñido y tratamiento de engrase, del cuero curtido al cromo, permite darle al cuero sus características finales.

Luego del primer curtido, el “cuero azul” no está listo. El lado flor está sucio, el líquido residual del curtido al cromo se ha depositado como una película en el cuero. Estas manchas impiden la buena penetración del tinte. La aplicación de lipasas y proteasas en el recurtido permite la eliminación de esas manchas y dar un lado flor y un teñido más uniformes

Otro aspecto relevante en cualquier industria, es el desarrollo sustentable, que permita realizar “producciones limpias”, con utilización de tecnologías menos contaminantes y tratamiento de efluentes líquidos y residuos sólidos generados. En la industria del cuero, así como lo visto en el procesamiento de efluentes de la industria del pescado, los tratamientos enzimáticos y

recuperación de los mismos, genera una minimización y revalorización de los residuos (María Eugenia Errasti et al., 2018).

6.2.5. Industria Química

6.2.5.1. Producción de Peptonas

Las peptonas constituyen uno de los principales ingredientes en los medios de cultivos para microorganismos. Se definen como el producto soluble en agua de una digestión enzimática de cualquier fuente proteica cuya composición es una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos junto con otros compuestos solubles que varía según la materia prima de partida, el tipo de proteasa empleado y las condiciones de hidrólisis utilizadas (He et al., 2013).

Cada peptona tiene su propia característica biológica, no hay una que cubra todas las de exigencias para el cultivo de todos los microorganismos y células. Diferentes materiales provenientes de animales y fuentes vegetales son utilizadas para la producción de peptonas, la mayoría de ellas valiosas y relativamente caras y hacen de esta industria una de las más rentables (Villamil et al., 2017).

6.2.5.2. Síntesis de Péptidos y Proteínas

Diferentes tecnologías están actualmente disponibles para la producción de péptidos y proteínas. La síntesis enzimática de pequeños péptidos (usualmente di o tripéptidos) ha comenzado a utilizarse de forma exitosa en la nutrición humana y animal así como en productos farmacéuticos y agroquímicos. Algunos ejemplos relevantes son la síntesis del edulcorante aspartamo, péptido de lisina dulce, angiotensina etc. Sin embargo el potencial de los procesos enzimáticos para la síntesis de péptidos posee actualmente muchas restricciones que han comenzado a resolverse a través de nuevas investigaciones y desarrollos (Barberis et al., 2018; Origone et al., 2018).

6.2.6. Productos Farmacéuticos

Las enzimas como drogas tienen dos rasgos importantes que las distinguen de los demás tipos de drogas. Primero, las enzimas a menudo se unen y actúan sobre sus objetivos con alta afinidad y especificidad. Segundo, las enzimas son moléculas catalíticas que convierten sus moléculas blanco en los productos deseados. Estos dos rasgos hacen de estas enzimas, drogas potentes que pueden llevar a cabo la bioquímica terapéutica en el cuerpo que las pequeñas moléculas no pueden

Los extractos de plantas con alto contenido de enzimas proteolíticas han sido utilizados en medicina tradicional desde hace mucho tiempo (González-Rábade et al., 2011; Mehtani et al., 2013)

La aplicación o utilización de enzimas proteolíticas, ya sea como un compuesto altamente purificado o en preparados crudos como agentes terapéuticos han sido ampliamente estudiadas. En este contexto, las proteasas cisteínicas vegetales, mayormente representadas por enzimas pertenecientes a la familia de la papaína o a la bromelaína (Ramli et al., 2017) son las más reportadas.

6.2.6.1. Las proteinasas como ayudantes en la digestión

La propiedad como coadyuvante digestivo es sin lugar a dudas la función terapéutica más frecuentemente atribuida a las proteinasas cisteínicas de plantas. Su consumo resulta también adecuado durante las digestiones pesadas, las gastritis o la acidez estomacal. Asimismo, la acción suavizante y antiséptica sobre las mucosas digestivas las hace muy útiles en caso de gastroenteritis y colitis de cualquier tipo así como en situaciones de estreñimiento o colon irritable, aun cuando para la mayoría de estos efectos no existen datos científicos que sustenten su acción. De esta manera su acción digestiva es principalmente respaldada por la tradición popular (Ramli et al., 2017).

La acción antihelmíntica también ha sido asociada con las proteasas vegetales. En este caso, el efecto antiparasítico fue estudiado con larvas de *Haemonchus contortus*. La acción antihelmíntica de bromelaína fue evidente casi tan eficaz como la albendazona, antiparasitario de uso médico (Rakesh et al., 2016; Meza-espinoza et al., 2017) Resultados similares fueron obtenidos *in vitro* con papaína, ficina y bromelaína, frente al nematodo *Heligmosomoides polygyrus* (Stepek et al., 2005).

6.2.6.2. Proteasas aplicadas a las afecciones reumáticas e inflamatorias

En desórdenes reumáticos, los estudios llevados a cabo utilizando enzimas proteolíticas han sido con preparaciones que incluyen una combinación de papaína, bromelaína, tripsina y quimotripsina. La eficacia de estas enzimas se investigó mediante la administración de ese cóctel a 51 pacientes. Como control, se administró diclofenac, uno de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) más comúnmente usados, a otros 52 pacientes. Ambos tratamientos llevaron a reducciones sustanciales y comparables del dolor y la inflamación dentro de las 6 semanas de consumo (Ramli et al., 2017).

A la luz de los datos preclínicos y experimentales así como la experiencia terapéutica, la aplicación de la terapia con estas enzimas parece plausible de aplicar en pacientes con desórdenes reumáticos (Wald and Rovenský, 2017).

6.2.6.3. Las proteinasas en la cicatrización

Los tejidos de mamíferos expuestos a trauma responden prontamente, interrumpiendo la pérdida de sangre, manteniendo el área afectada aséptica y promoviendo la cicatrización del tejido

comprometido. El daño a los vasos sanguíneos resulta en activación plaquetaria y coagulación de la sangre, eventos en que están envueltas un grupo de serin proteasas que culminan con la activación de trombina, también serin proteasa que convierte fibrinógeno en fibrina y que posee actividad mitogénica (Shivaprasad et al., 2011).

Un fenómeno similar ocurre en plantas laticíferas. Las semejanzas entre la coagulación del látex en Caricáceas y en la sangre de mamíferos ha llevado a varios autores a proponer la existencia de factores análogos en ambos casos. Sugiriendo que algunos de los factores en la planta pudiesen participar de la cicatrización que acompaña al trauma en mamíferos (Venkatesha et al., 2016).

Una aplicación diferente de las proteinasas vegetales resulta de su capacidad para remover tejido necrótico en el tratamiento de escaras y quemaduras (Domsalla & Melzig, 2008). De acuerdo con este principio existen formulaciones debridantes que contienen papaína o bromelaína (Elisa et al., 2017).

6.2.6.4. Producción de hidrolizados proteicos

Los hidrolizados de proteínas son ampliamente utilizados en la industria con muchas aplicaciones diferentes: suplemento nutricional, ingrediente farmacéutico, potenciador del sabor, fuente de nitrógeno para medios de crecimiento para el cultivo de células microbianas, vegetales y animales, en cosméticos y en bebidas.

Actualmente, la producción industrial de hidrolizados de proteínas incluye hidrólisis ácida, alcalina y enzimática, entre las cuales la última mencionada está adquiriendo la mayor importancia en las industrias alimentarias y farmacéuticas. El proceso enzimático es más suave y facilita el control del grado de hidrólisis, lo que hace que el proceso sea eficiente y reproducible. Los parámetros operativos para la hidrólisis enzimática se han estudiado ampliamente, siendo los más importantes la temperatura, el tiempo de hidrólisis, el pH y el grado de hidrólisis (DH) (Agyei & Danquah, 2011).

Como resultado de la hidrólisis, se generan péptidos de diferentes tamaños, dependiendo de la enzima empleada y los parámetros operativos.

Los péptidos con un efecto positivo en la salud se denominan péptidos bioactivos y pueden regular varias funciones fisiológicas. Se han estudiado las propiedades de varios péptidos de hidrolizados de proteínas con papaína, evaluando propiedades tales como: acción antitumoral, antioxidante, antidiabético, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, modulación del sistema inmunitario entre otros (Fernández-Lucas et al., 2017; Dullius et al., 2018).

6.2.6.5. *Proteasas en el tratamiento del cáncer*

Las plantas ocupan un papel destacado como fuentes terapéuticas, estimándose que alrededor de 60% de los agentes anticancerígenos provienen de fuentes naturales incluyendo plantas, organismos marinos y microorganismos (Raj Kapoor et al., 2007).

Las proteinasas pueden participar en el desarrollo de neoplasias, retardando el proceso. Este efecto fue constatado al tratar individuos que manifestaban diversas formas de esta dolencia, con un cóctel de enzimas proteolíticas, apuntando a la minimización de los efectos secundarios adversos, provocados por la radio o quimioterapia (disminución del apetito, fatiga, leucopenia, aumento del nitrógeno sanguíneo)(Beuth, 2008). Fue constatado que los individuos así tratados experimentaron una mejoría de la calidad de vida, pero más importante aún fue la constatación de la disminución de ocurrencias de metástasis. Posteriormente en modelos animales fue confirmada la hipótesis que el tratamiento con proteinasas protege contra la diseminación de tumores primarios (Pavan et al., 2012). El tratamiento utilizado consiste en la combinación de serin proteinasas pancreáticas y cisteín proteinasas de plantas (Leipner et al., 2001).

Entre las enzimas vegetales se destacan las cisteín proteinasas papaína y bromelaína, habiéndose descrito varios resultados con estas enzimas (Maurer, 2001). Con todo, el mecanismo de acción es hasta ahora desconocido. Se ha propuesto que las proteinasas estimulan el sistema inmunológico del huésped tornándose éste más resistente a los efectos de la neoplasia. Así fue demostrado que la bromelaína modula *in vivo* e *in vitro* la respuesta inmune de células B y T como también de las células “natural killer” y macrófagos (Meiser et al., 2014). Varios estudios demostraron que la bromelaína induce la diferenciación de células leucémicas y retarda el crecimiento tumoral (Tochi et al., 2008). También se han observado la inhibición en el desarrollo de carcinoma pulmonar de Lewis, linfoma YC-8, tumor ascítico MCA-1 cuando fueron tratados con bromelaína y melanomas inducidos en ratones atímicos tratados con la enzima P1G10 (proteasa de *C. carndamarcensis*) (Dittz et al., 2015).

La administración oral de la bromelaína reveló que células polimorfonucleares (PMN) generaban especies reactivas del oxígeno (ROS), responsables por la actividad tumoricida. Lo que no se ha determinado aún, es de qué forma la bromelaína estimula la producción de la superóxido dismutasa en PMN (Ramli et al., 2017).

En cuanto al efecto antimetastásico es sabido que las células invasivas tienen características propias diferentes la de las células del tumor primario. La célula invasiva debe pasar por algunas transformaciones para adquirir tal capacidad, mientras que el organismo se protegerá a través del sistema inmunológico (células “natural killer” y PMN). Experimentos para medir la capacidad antimetastizante de bromelaína demostraron la reducción del número de metástasis en linfoma YC-8 y tumor ascítico (Engwerda et al., 2001). De manera similar animales portadores de carcinoma de Lewis ó tumor murino tratados con bromelaína (140 mg/kg por día), reducían las metástasis de manera dependiente de la dosis (Chobotova et al., 2010)

Como se ha expresado, la utilización de proteasas vegetales, en terapias relacionadas es todavía un campo poco explorado y que abre un importante abanico de posibilidades. Ya sea por sus similitudes o diferencias estructurales y funcionales, cada nueva enzima aporta un nuevo elemento de estudio, que enriquece de forma notoria el conocimiento de estas extraordinarias moléculas y su complejo accionar.

III – OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de tesis fue purificar y caracterizar bioquímica y estructuralmente las principales enzimas proteolíticas presentes en frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol y evaluar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Diagramar y poner a punto protocolos específicos que permitan separar las enzimas proteolíticas de extracto de frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol.
- ❖ Caracterizar bioquímicamente (Efectos del: pH, temperatura, agentes desnaturalizantes) de las enzimas aisladas.
- ❖ Calcular de los parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , K_{cat}) utilizando sustratos sintéticos específicos.
- ❖ Determinar la especificidad de corte por estudio del producto de hidrólisis de la cadena β de la insulina.
- ❖ Obtener las secuencias aminoacídicas parciales (N-terminal y secuencias internas) utilizando herramientas proteómicas.
- ❖ Obtener la secuencia completa de las peptidasas, utilizando herramientas de genómica tradicional.
- ❖ Con las secuencias aminoacídicas obtenidas, modelar la estructura 3D
- ❖ Evaluar las posibles aplicaciones del preparado parcialmente purificado o las enzimas aisladas en diferentes procesos biotecnológicos

IV – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL: COLECTA

Muestras de la especie vegetal estudiada fue aportada por la Dra. Maria Julia Basagoda, del laboratorio de botánica de la Facultad de Química (UDELAR) e identificada como *Bromelia antiacantha* Bertoloni.

Los datos de la especie están depositados en el Museo del Jardín Botánico Uruguayo “Prof. Atilio Lombardo” perteneciente a la Intendencia de Montevideo. La planta fue identificada por el Prof. Fabián Muñoz como *Bromelia. antiacantha* Bertol, homologando los datos de la Dra. Basagoda. Muestras de esta especie se encuentran catalogadas e inventariadas por el museo como N°MVJB 23895.

Los frutos maduros de *Bromelia antiacantha* (banana do mato), (Figura 10) fueron colectados entre los meses de abril-mayo en la colonia de vacaciones Don Bosco, ruta 16 Km 21500 Laguna Negra, Castillo, departamento de Rocha. Este parque natural es la primera área privada protegida denominada Reserva de Biósfera Humedales del Este.

Los frutos fueron luego seleccionados, separados, lavados y acondicionados en bolsas plásticas con la fecha de colecta y almacenados en freezer a -20°C hasta el momento de su utilización.

2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO (EC)

Los frutos almacenados a -20°C se pelaron, retirando la porción fibrosa (inmediatamente debajo de la cáscara) y quitando las semillas ubicadas en la pulpa (Figura 10).

El extracto crudo (EC) se obtuvo por trituración en mixer (enfriado en baño de hielo) durante 2 minutos, de los tejidos de la pulpa. El homogenato obtenido se centrifugó a 6654 x g a 4°C durante 15 min y filtró por gasa. El preparado fue nuevamente centrifugado a 6654 xg durante 15 minutos para clarificar la muestra.

Inmediatamente después, el EC se filtró por papel, fraccionó y almacenó a -20°C hasta su utilización.



Figura 10. Detalle del Fruto: A) Tamaño promedio B) Capa fibrosa debajo de cáscara C) Pulpa utilizada para la preparación de extracto D) Detalle de la pulpa y la distribución de las semillas.

3. PROCESOS DE PURIFICACIÓN

3.1. Purificación preliminar del EC

3.1.1. Precipitación Acetónica

El extracto crudo fue obtenido a partir de frutos maduros, que presentan habitualmente un elevado contenido de hidratos de carbono. Se realizó una purificación preliminar por precipitación con acetona, lo que permitió enriquecer el extracto en proteína activa (Scopes, 1987).

Al extracto crudo se le agregaron uno, dos, tres ó cuatro volúmenes de acetona enfriada ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gota a gota y con agitación suave, manteniendo la temperatura de la mezcla entre $0\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en baño hielo-agua), reduciendo al mínimo la probabilidad de desnaturalización de las proteínas. Se dejó reposar durante 30 min a -20°C y se centrifugó a 6.654 xg durante 15 min a 4°C .

Los precipitados obtenidos fueron secados al aire, eliminando la acetona. Los precipitados secos se guardaron a -20°C hasta su utilización. Los precipitados fueron disueltos en un volumen (volumen del extracto de partida) con sistema buffer adecuado según el caso. Al precipitado redisolto se lo denominó antiacanthaína (Ant)

3.2. Purificación Cromatográfica de antiacanthaína

3.2.1. Preparación de la muestra (filtrado)

El precipitado acetónico (Ant) fue redissuelto en buffer Citrato 10 mM pH: 4,5., se filtró por filtro de membrana de acetato de celulosa (Sartorius) de diámetro de poro de 0,22 μm .

3.2.2. Cromatografía de Intercambio Catiónico

En la separación y purificación cromatográfica de las enzimas presentes en Ant, se trabajó en un equipo ÄKTA prime (GE Healthcare), utilizando una columna de intercambio catiónico Hi-Trap SP-HP (GE Healthcare).

La columna fue equilibrada en Buffer Citrato 0,01M pH 4,5 a temperatura ambiente (20°C) Se sembraron 0,5 mL de Ant. filtrado. El lavado se realizó con el mismo buffer de equilibrio. Las proteínas retenidas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0,05-0,30 M) en el buffer de partida a una velocidad de flujo de 1mL/min. Se colectaron fracciones de 1mL que fueron inmediatamente guardadas a -20°C para su posterior análisis.

3.2.3. Concentrado de picos cromatográficos

Las fracciones colectadas que por medida de la absorbancia a 280nm conformaron un pico, se mezclaron. Esta mezcla se concentró y desaló utilizando los siguientes procedimientos:

- Utilizando filtros Amicon de corte 10000MW por centrifugación a 4000 xg durante 20min a 4°C.
- Pasando la mezcla por columna de Sephadex G-25 (según procedimiento del fabricante), para la eliminación de sales. La mezcla desalada, se concentró por Liofilización en equipo (Liofilizador de mesa Brand, modelo 01JBL)

4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1. Determinación por el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas (en todos los pasos de purificación) se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976).

Como proteína estándar se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA).

Para la cuantificación en el rango de 0,1 a 1 mg/mL (macrométodo), se mezclaron en tubo 50 μL de la muestra con 2,5 mL de reactivo de Bradford. Se deja actuar 10 min y se mide la absorbancia en espectrofotómetro Shimadzu UV1800.

La cuantificación en el rango de 0,01 a 0,1mg/mL (micrométodo), se mezclaron en placa de Elisa 10 μL de muestra con 330 μL de reactivo de Bradford, se deja actuar 10 min y se mide a 595nm en lector de placas TECAN infinite M200PRO.

Las curvas de calibración para cada rango se adjuntan en Apéndice 1.

4.2. Determinación por medida directa de absorbancia

En las experiencias cromatográficas el contenido de proteínas se estimó por medida de la absorbancia directa a 280 nm.

5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método de Ác. Sulfúrico-UV propuesto Albalasmeh Ammar (Albalasmeh et al., 2013) y modificado por López-Legarda X (López-Legarda et al., 2017).

Brevemente: a 0,3 mL de las soluciones (estándar o problema) conteniendo carbohidratos, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (85%p/v). La solución se enfrió en baño de hielo durante 2 min. El producto de la reacción se midió espectrofotométricamente a 315nm. Se utilizó como estándar para la curva de calibración, una solución de glucosa en el rango de 50-500 µg/mL

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

6.1. Actividad Azocaseinolítica

Como metodología general para la determinación de la actividad proteolítica en los diferentes pasos de la purificación, se utilizó el método de Andrew y Asenjo con modificaciones (Castro et al., 1996).

La mezcla de reacción conteniendo 340µL de solución azocaseína (1% w/v en buffer Tris- HCl, 0,1M, pH 8.0 + 20mM Cys + 10mM EDTA), 340µL de una dilución apropiada de enzima (EC, RAP o fracciones purificadas) previamente activados con β-mercaptoetanol ó cisteína (concentración final 15mM) y 340µL de buffer de actividad (Tris- HCl 0.1M, pH 8.0 + 20mM Cys), se incubó durante 10 min en baño de agua termostatzado a 37 °C. La reacción se detuvo con el agregado de 340µL de TCA (10% w/v). Se centrifugó durante 20 min a 15400 xg y se midió la absorbancia del sobrenadante a 337nm.

La unidad de actividad enzimática (Unidad azocaseinolítica, U_{azocas}), se definió como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia medida a 337 nm al cabo de 1 min, en las condiciones de ensayo.

6.2. Actividad esterolítica y amidolítica empleando sustratos sintéticos

6.2.1. Derivado N- α -carbобензохи-p-nitro fenil ésteres de Lisina (N-CBZ-L-Lys-ONp)

La actividad de los preparados enzimáticos se ensayó con el derivado N-CBZ del aminoácido Lisina, de acuerdo a método descrito por Silverstein con modificaciones (Silverstein, 1974). La muestra de reacción se preparó mezclando buffer Acetato 0,1 M de pH 4,6 conteniendo cisteína 15 mM, y solución 15mM de sustrato (disuelto en dimetilsulfóxido, DMSO) hasta un volumen de 725 μ L y concentración final de sustrato entre 0,1 y 0,6mM. A la mezcla se agregó 25 μ L de solución de enzima. La reacción se llevó a cabo a 37°C y los cambios de absorbancia se midieron a 340 nm durante 3 min. En los blancos la enzima se reemplazó por buffer.

La unidad enzimática arbitraria ($U_{Lys-ONp}$) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por min a 37 °C y pH 4,6 ($\epsilon_{340nm}=6320 M^{-1}cm^{-1}$).

6.2.2. pGlu-Phe-Leu-p-nitroanilina (PFLNA)

La actividad amidásica utilizando el sustrato sintético PFLNA se determinó de acuerdo al método descrito por Filippova (Filippova et al., 1984). La muestra de reacción se realizó mezclando volúmenes variables de Buffer fosfato 0,1M pH 6,5 (conteniendo 0,1M de KCl, 0,1M de EDTA y 3mM de DTT) y solución stock de PFLNA (2mM en DMSO) hasta un volumen de 950 μ L y concentraciones de 0,1 a 0,6 mM del sustrato. Se termostató a 37°C, se agregó 50 μ L de solución enzimática y se midió la absorbancia durante 3 min. En los blancos la enzima se reemplazó por buffer.

Se definió la unidad enzimática arbitraria (U_{PFLNA}) como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilina por min a 37 °C y pH 6,5 ($\epsilon_{410nm}=9800 M^{-1}cm^{-1}$)

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

7.1 pH óptimo

Se estudió el efecto del pH en la actividad proteolítica. Para ello, se preparó el sustrato (azocaseína) en diferentes buffers 0,1M: Acetato (pH 3.5–5.5), Fosfato (pH 5.5–7.5), Tris-HCl (pH 7.0.5–9.0) y Gly-NaOH (pH 9.0–11.0). Las muestras enzimáticas fueron diluidas en los buffers a distintos pH y se dejó actuar 15min antes de realizar el ensayo de actividad descrito en 6.1.

7.2. Temperatura óptima

Se determinó el efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de los distintos preparados enzimáticos. Para los ensayos de actividad se utilizó Buffer fosfato 0,1M pH 6,5 y temperaturas de ensayo entre 37 y 80°C. Se determinó la actividad residual de acuerdo a método 6.1.

7.3. Titulación del sitio activo

La proporción de moléculas de enzima activas, se determinó por medida de la actividad enzimática utilizando azocaseína como sustrato luego de incubar la enzima con diferentes concentraciones de E-64, inhibidor específico de proteasas (Salvesen and Nagase, 2001) Fracciones de 450 μ L de las enzimas purificadas (previamente activadas por la adición de 20mM de cisteína) se incubaron con 150 μ L de diferentes concentraciones de E-64 (0 a 0,5 μ M) durante 60 min a 37 °C. La actividad residual se midió según método 5.1.

La molaridad de enzima se calculó utilizando los datos de masa molecular (determinada por espectrometría de masas) y de concentración de proteínas (sección 4.1) en la solución de enzima pura.

7.4. Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se obtuvieron por determinación de la actividad esterasa y de la actividad amidasa (métodos descritos en 6.2.1 y 6.2.2), de las enzimas purificadas.

Se utilizó como enzima de referencia a la Bromelaína de tallo (Sigma), la que se ensayó en paralelo a las enzimas aisladas de *Bromelia antiacantha* Bertol.

Para la determinación de la velocidad inicial de la reacción de cada sustrato (con cada una de las enzimas purificadas), se midió la variación de la absorbancia cada 10s durante 3min Los parámetros cinéticos V_{max} , K_m y k_{cat} se calcularon a partir de los datos gráficos, utilizando el programa OriginLab8.

7.5. Efecto de la Urea y del Cloruro de Guanidinio (GndHCl)

Se estudió el efecto de los agentes caotrópicos, utilizados normalmente como desnaturalizantes, urea y cloruro de guanidinio (GndHCl) en la actividad y estabilidad de las proteasas purificadas.

Soluciones stock 10 M de urea y 7 M Gnd-HCl fueron preparadas en buffer 0.1M Tris-HCl pH 8.0 conteniendo 15 mM Cys. Las soluciones enzimáticas purificadas se diluyeron 1/20 v/v en el mismo buffer o en las soluciones stock conteniendo los agentes desnaturalizantes hasta obtención de las concentraciones deseadas. Se determinó la actividad azocaseinolítica (método descrito en sección 5.1) de cada preparado a los 30, 60 y 1080 minutos de incubación a temperatura ambiente.

8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

8.1 Electroforesis nativa (native-page)

Para el análisis por electroforesis se utilizó el sistema Mini-Protean tetra (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) Los sistemas buffer empleados en estos procedimientos fueron: Tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5) y Tris-glicina SDS (0,1%)

8.1.1. Preparación de la muestra

Las muestras se prepararon por precipitación con cuatro volúmenes de acetona fría (-20°C), secado al aire de la acetona y resuspensión en un volumen de buffer Tris 0,1M pH 9 que permitió obtener una concentración final de proteínas de 10-30 µg/µL.

Las muestras obtenidas se mezclaron con un volumen igual de buffer de muestra (sin SDS ni β-mercaptoetanol) 2x.

8.1.2. Preparación del gel

Se realizó una electroforesis en condiciones nativas en geles de poliacrilamida compuesto por un gel concentrador (T=4,5% y pH: 6,8) y separador (T=10% y pH: 8,8).

8.1.3. Condición de corrida

Se empleó un voltaje constante (90 V) hasta que las muestras llegaron al final del gel concentrador. Se aumentó el voltaje al ingresar las proteínas al gel separador hasta llegar a 100 V y se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

8.1.4. Revelado

Las bandas proteicas se tiñeron con una solución de Coomassie Blue G 0.025 % (p/v) en Metanol, ácido acético y H₂O (45:10:45) durante toda la noche. Los geles se destiñeron con una solución de ácido acético: H₂O 10% (v/v) en agitación.

8.2 Electroforesis desnaturizante con Tris-Tricina (SDS-Tricina-PAGE)

8.2.1. Preparación de la muestra

Las muestras fueron preparadas de igual forma que para la electroforesis nativa (sección 8.1.1). Se mezclaron con un volumen igual de buffer de muestra (con SDS y β-mercaptoetanol) 2x y se llevó a ebullición durante 5min.

8.2.2. Preparación del gel

Se utilizó la técnica descrita por Schagger y Von Jagow (Schagger and Von Jagow, 1987). Los geles utilizados se componen de un gel separador (T=16% pH:8,8), un gel espaciador (T=10% pH:8,8) y un gel concentrador (T=4.5% pH:6,8).

8.2.3. Condición de corrida

La electroforesis se realizó a voltaje constante (30 V) hasta que las muestras llegaron al final del gel concentrador. Se aumentó progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel espaciador hasta llegar a 100 V, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

8.2.4. Revelado

Las bandas proteicas se fijaron con una solución de metanol 50 % (v/v), ácido acético 10% (v/v) y acetato de amonio 100 mM durante 30 min. Se tiñeron con una solución de Serva Blue G 0.025 % (p/v) en ácido acético 10 % (v/v) por 1h y se destiñeron con una solución ácido acético 10% (v/v) en agitación. Se utilizó como marcador de peso molecular el estándar pre-teñido SeeBlue® (Invitrogen) compuesto por Miosina (250kDa), BSA (98kDa), Glutámico deshidrogenasa (64kDa), Alcohol deshidrogenasa (50kDa), Anhidrasa carbónica (36kDa), Mioglobina (30kDa), Lisozima (16kDa), Aprotinina (6kDa) y cadena β de insulina (4kDa).

9. ISOELECTROENFOQUE (IEF)

Los valores de los puntos isoeléctricos de las fracciones proteolíticamente activas se determinaron por isoelectroenfoque, utilizando para un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad)

9.1. Preparación de la muestra

Las muestras se precipitaron con cuatro volúmenes de acetona enfriada a -20°C y colocaron a -20°C durante 30min. Se centrifugó a 10000 g, se descartó el sobrenadante, seco para eliminar resto de solvente y resuspendió en agua miliQ. para obtener una dilución de 10-30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína.

9.2. Preparación del gel

Se prepararon geles de de poliacrilamida al 5%, conteniendo anfolitos de amplio rango de pH (Biolyte 3-10, Bio-Rad) sobre la cara hidrofílica de lámina de gel-bond (Polyacrilamide Gel Support Film, Bio-Rad).

9.3. Condiciones de corrida

Se sembraron 10 μ L de la muestra en el centro del gel, permitiendo que la misma difunda hacia el interior del mismo. Los electrodos de la celda de isoelectroenfoque se humedecieron con agua destilada, los geles se apoyaron inmediatamente sobre los mismos y se colocó la tapa que permite que la celda quede herméticamente cerrada. El isoelectroenfoque se realizó en tres etapas sucesivas: 15 min a 100 V, otros 15 min a 200 V y 60 min a 450 V.

9.4. Revelado

Finalizada la corrida, los geles unidos a su soporte se sumergieron durante 30 min en solución fijadora.

Los geles fijados, se trataron durante 2 h con la solución colorante (ác. Acético 10%, etanol 27%, CuSO_4 30mM y Coomassie Brilliant Blue R250 0,04%(p/v) y se decoloraron por tres lavados sucesivos con solución decolorante I (ác.acético 7%, etanol 12%, CuSO_4 30mM), seguidos de un último lavado con solución decolorante II (ác.acético 7%, etanol 12%) hasta la obtención de un fondo incoloro.

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

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración graficando los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por ellas, tomando como referencia la posición del cátodo.

10. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Se realizó un isoelectroenfoque de cada una de las proteínas purificadas y desnaturalizadas como primera dimensión y un SDS-PAGE como segunda dimensión. Fue realizada como servicio por la Unidad Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo.

10.1. Primera dimensión

La primera dimensión (IEF) se desarrolló en tiras comerciales disponibles IPG-strips (7cm, linear pH 3-10, GE Healthcare).

10.1.1. Preparación de las muestras y sembrado

Las enzimas purificadas (50 µg) se trataron previamente con el kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare) y disolvieron en 125 µL de solución de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer 3–10 [GE Healthcare], 0.002% azul de bromofenol). Las muestras se sembraron en las tiras IPG por rehidratación pasiva durante 12 h a temperatura ambiente.

10.1.2. Condiciones de corrida

El isoelectroenfoco se realizó en la unidad IPGphor (Pharmacia Biotech) empleando el perfil de voltaje: una fase constante de 300V durante 30 min; incremento lineal hasta 1000V en 30 min; incremento lineal hasta 5000V en 80 min y una fase final constante a 5000V hasta alcanzar un total de 9,5 kWh.

10.2. Segunda dimensión

10.2.1. Preparación de las tiras de IPG

Previo a la segunda dimensión, se realizó la reducción de las tiras IPG durante 15 min en buffer de equilibrio (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol) suplementado con DTT (10 mg/ml) y se realizó la alquilación durante 15 min en buffer de equilibrio suplementado con Iodoacetamida (25 mg/ml).

10.2.2. Condiciones de corrida

Como segunda dimensión se realizó un SDS-PAGE (12,5%) en la unidad SE 260 mini-vertical gel electroforesis (GE Healthcare). Se corrió a voltaje constante de 100V durante 60min.

Se utilizó como marcador de peso molecular el kit de calibración de bajo peso molecular para electroforesis desnaturizante Amersham de GE Healthcare (Fosforilasa b: 97 kDa, Albúmina: 66 kDa, Ovoalbúmina: 45 kDa, Anhidrasa carbónica: 30 kDa, Inhibidor de tripsina: 20,1 kDa, α-lactolbúmina: 14,4 kDa). El gel fue teñido con solución de Azul de Coomassie coloidal (Bio-Rad). Tiempo de fijación: 30 min en etanol 40%, ácido acético 7%. Tinción: solución de trabajo de azul de Coomassie G-250 durante toda la noche. Desteñido: varios lavados con agua MQ.

Las imágenes fueron digitalizadas utilizando el escáner UMAX Power-Look 1120 y software LabScan 5.0 (GE Healthcare).

11. ZIMOGRAMA/REVELADO ESPECÍFICO PARA PROTEASAS

La detección de bandas con actividad proteolítica, se realizó por incubación de los geles de la electroforesis nativa o IEF, sobre una placa de agarosa embebida en caseína. Las zonas de la película de caseína degradada fueron indicativas de la presencia de proteasas.

11.1. Preparación del gel

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, Pharmacia) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa se sumergió en una solución de caseína al 1% en el mismo buffer durante 20 min, se enjuagó con agua destilada y escurrió durante 10 min (Westergaard et al., 1980).

11.2. Incubación

El gel de poliacrilamida del IEF ó electroforesis Nativa) inmediatamente de finalizada la corrida, fue colocado sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto se colocó en una cámara húmeda y llevó a estufa a 50-55°C durante 10 min.

11.3. Revelado

Finalizado el período de incubación, los geles se separaron y la placa de agarosa-caseína se sumergió durante 60 min en solución fijadora (ác. Acético 10%, metanol 45%).

Fijadas las proteínas, la placa de agarosa-caseína se deshidrató entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 min. Se secan con pistola de aire y sumergen durante 10-30 min en solución colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25%(p/v) en solución fijadora.

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-caseína en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó con pistola de aire.

12. DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER GLICOPROTEICO

Para la detección de glicoproteínas se utilizó el Kit de revelado de Sigma-Aldrich y se realizó según protocolo del fabricante. El procedimiento es una modificación del método de ácido periódico de Schiff (PAS) (Jay et al., 1990; R. M. Zacharius et al., 1969) y produce bandas de color magenta con un fondo de color rosa claro o incoloro. El límite de detección está en el rango de 25-

100 ng para los carbohidratos, dependiendo de la naturaleza y el grado de glicosilación de la proteína.

13. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa se utilizaron en el análisis de las muestras conteniendo ácidos nucleicos (DNA-ARN).

Se utilizó equipo de electroforesis horizontal Life Technologies GIBCO BRL Horizon 58 para geles de 7x10 cm.

13.1. Preparación de las muestras

Las muestras conteniendo ácidos nucleicos se mezclaron con una sexta parte en volumen de buffer de muestra 6x (DNA Loading Dye, Thermo Scientific) previo al sembrado en el gel.

13.2. Preparación de los geles

Se prepararon solución de Agarosa (1 ó 2% p/v) en Buffer Tris-acético-EDTA (TAE).. Se le agregó 2 μ L del agente intercalante Good View a la mezcla de agarosa.. Se utilizaron peines de 1 mm de espesor con 8 carriles.

13.3. Condiciones de corrida

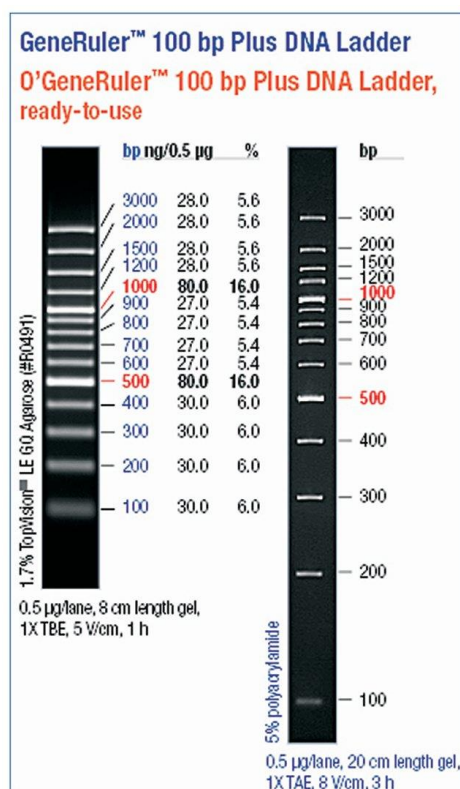
Se sembraron 10 μ L de muestra por carril (4 μ L en caso del marcador de PM) y se corrió a voltaje constante (100V) durante aproximadamente 60 min

13.4. Revelado

La visualización de las bandas de DNA se realizó en equipo G: BOX F3 (Syngene) que contiene un transiluminador de luz UV. El sistema está controlado por el software de captura de imágenes GeneSys y software de análisis GeneTools.

13.5. Estimación de pesos moleculares

La estimación de los pesos moleculares se realizó por comparación con patrones de peso molecular conocido (GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).



14. DETERMINACIÓN DE PM POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

14.1. Preparación de la muestra

En un tubo plástico de 200 µL de capacidad se mezcló 1-2 µL de solución de cristalización con 1 µL de la muestra a ser ensayada. Se depositó 0,5 a 1 µL de la mezcla sobre la placa para MALDI-TOF MS y se dejó cristalizar. Para la determinación de la masa molecular de las muestras, se utilizó tripsinógeno como calibrador (M+1 23981, M+2 11990,5).

14.2. Obtención de los espectros

Dependiendo del tipo de muestra se utilizaron diferentes placas: MP 384 Polished Steel y MP 384 Ground Steel (Broker) para proteínas y péptidos respectivamente. Se utilizaron, dependiendo del ensayo:

- Espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker modelo Ultraflex TOF-TOF equipado con un láser de N₂ (337 nm con pulsos de 1-5 ns) y una fuente de aceleración de iones de 25 kV.
- Espectrómetro de masas 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo de reflector positivo.

Los parámetros utilizados para la adquisición de los espectros fueron ajustados para cada caso en particular.

15. DIGESTIÓN TRÍPTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

15.1. Procesamiento *in situ* de la muestra

En la obtención del mapeo por huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS) se realizó una digestión trípptica *in situ* de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional (*Proc. Exp.* 10).

El spot obtenido de cada proteína purificada en el gel de poliacrilamida se cortó de forma manual. Se realizó la digestión con tripsina (grado secuenciación, Promega) en 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8,3, durante 2 h a 37 °C (relación enzima-sustrato 1:10). El protocolo utilizado fue descrito por Shevchenko y colaboradores (Shevchenko et al., 2007). Los péptidos obtenidos se extrajeron del gel con solución de Acetonitrilo (ACN) 60% conteniendo 0,1% TFA y se concentraron a vacío en SpeedVac.

Previo al análisis de masas, las muestras se sembraron en micro-columnas de fase reversas C18 (Omix®Tips, Varian) para la eliminación de sales. La muestra se eluyó directamente en placa para Maldi-MS con una matriz de ácido α -Cyano-4-hidroxycinnámico (HCCA) en solución acuosa de ACN 60% conteniendo 0,1% de TFA.

15.2. Análisis de masas por Maldi TOF- MS

El espectro de masas de la mezcla de péptidos se obtuvo en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo de reflector positivo. Se utilizó como calibrador de masas externo una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems).

16. HIDRÓLISIS DE LA CADENA B DE INSULINA

16.1. Reducción y carbamidometilación de cisteínas

Se disolvió 10 mg de insulina bovina (Sigma), en 2 ml de buffer bicarbonato 0,1 M de pH 8 conteniendo cloruro de guanidinio (GndHCl) 6 M como agente desnaturizante y DTT 10 mM como agente reductor. La mezcla se incubó a 40 °C.

Se añadió sobre la mezcla de reacción 1 ml de una solución de iodoacetamida 1 M en buffer bicarbonato 0,1 M de pH 8. Se incubó a 40 °C hasta bloquear todos los residuos de cisteína presentes en la muestra.

Como control de las etapas, se tomaron muestras a diferentes tiempos (30, 60, 120 y 180 min), se diluyeron 1:10, 1:100 y 1:1000 con TFA 0,1% (v/v) y se analizaron por MALDI-TOF MS en una placa MP 384 Polished Steel, Bruker previamente cristalizadas sobre ésta con una matriz de SA.

16.2. Purificación de la cadena β de insulina por RP-HPLC

La mezcla de reacción (de acuerdo al punto anterior) se acidificó hasta pH 3 con TFA y purificó por HPLC en columna de fase reversa C_4 , Vydac (diámetro de partícula 5 μm , diámetro y longitud de la columna 4,6 mm x 250 mm) utilizando como solventes de elución H_2O_d -TFA 0,1% (v/v) y ACN-TFA 0,1% (v/v). La purificación se optimizó con un gradiente lineal de ACN (10-60%) y una velocidad de flujo de 1,4 ml/min. Los productos purificados se fraccionaron en alícuotas de 1 ml y se liofilizaron para su conservación.

16.3. Digestión de la cadena β de insulina con las fracciones enzimáticas purificadas

La reacción se llevó a cabo a pH 8 en buffer TRIS-HCl 0,05 M conteniendo cisteína 20 mM como activador, manteniendo una relación molar de enzima-sustrato 1:500.

La mezcla se incubó durante 16 h a 37 °C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 15, 60, 120 min y 16 h) que se analizaron por MALDI-TOF MS. Las muestras se sembraron en placa MP 384 Ground Steel, Brucker y cristalizaron con una matriz de HCCA. La reacción se detuvo mezclando 2 μL de la mezcla y 8 μL TFA 0,1% (v/v).

17. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS PARCIALES DE LAS ENZIMAS PURIFICADAS

17.1. Secuencia N-terminal

17.1.1. Transferencia a membranas de PVDF

La bandas proteicas correspondientes a las enzimas purificadas, separadas mediante electroforesis nativa, se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) (Millipore). Luego de finalizada la corrida electroforética se sumergió el gel en buffer de transferencia (Buffer Tris-Glicina pH: 8,5: Metanol: H_2O miliQ) durante 10 minutos. La membrana de PVDF se activó por inmersión en metanol durante 1 minuto y sumergió en buffer de transferencia durante 20 minutos. Se armó el dispositivo (sándwich) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Hoefer TE22). Se tuvo especial cuidado con la temperatura, enfriando a -20°C el buffer de transferencia. La transferencia se realizó en cámara fría durante 60 min a una corriente constante de 100V. Finalizada la transferencia, la membrana se colocó durante 10 min en la solución colorante (Coomasie Blue G 0.025 % (p/v) en Metanol, ácido acético y H_2O (45:10:45) y se decoloró con metanol: H_2O_d (30:70) hasta obtención de un fondo claro. Se dejó secar la membrana y se recortaron las bandas.

17.1.2. Secuenciación N-terminal

La secuenciación del N-terminal de la proteína se realizó en equipo automático basado en la técnica de Edman (LF3000 Protein Sequencer, Beckman equipado con un analizador de PTH-aminoácidos, Beckman). Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Proteínas y Enzimología del Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) "Vicente Villar Palasí" de la Universidad Autónoma de Barcelona, España

La búsqueda de homología de secuencia fue realizada utilizando el servidor de búsqueda Blast Network Service (Altschul et al., 1997).

17.2. Secuenciación parcial

Cada una de las muestras purificadas y separadas por SDS-PAGE fueron digeridas con tripsina según protocolo descrito en punto 15.1. De los resultados de los espectros de masas de cada una de las muestras, se realizó el análisis masa-masa (MS/MS) a péptidos seleccionados. Las secuencias proteicas fueron identificadas por búsqueda en base de datos, de los valores de masa de los péptidos (m/z), utilizando el programa MASCOT (Matrix Science <http://www.matrixscience.com>), basado en los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia en masa monoisotópica: 0,05 Da; tolerancia en masa del fragmento: 0,3 Da; oxidación parcial de la metionina, carbamidometilación de las cisteínas y pérdida de un clivaje tríptico permitido. Se utilizó también la búsqueda en base de datos locales conteniendo la secuencia de la enzima Fastuosáina (Cabral et al., 2006), utilizada como referencia.

18. OBTENCIÓN POR CLONADO DE ADNc PARA UNA PEPTIDASA Y PRO-PEPTIDASA

18.1. Diseño de cebadores (*primers*) específicos

18.1.1. Cebador directo para secuencia madura

El diseño de cebadores específicos se realizó comparando la secuencia N-terminal de las enzimas purificadas, obtenidas por reacción de Edman, con las secuencias de peptidasas de la familia Bromeliaceae con las que presentaron mayor porcentaje de identidad. Se utilizó el sistema de búsqueda BLAST Network y la frecuencia de uso de codones para los aminoácidos conservados.

Se tuvo especial atención en aquellos aminoácidos donde la secuencia proteica de las peptidasas de *Bromelia antiacantha* Bertol. eran diferentes a las de las peptidasas con la que se comparó.

Los cebadores correspondientes a la secuencia que codifica para estos aminoácidos, se diseñaron conservando los nucleótidos de mayor frecuencia presentes en las secuencias de las

peptidasas comparadas. En los casos donde la sustitución de un codón correspondió a un cambio conservativo, se diseñó el *primer* con un codón degenerado considerando ambos aminoácidos.

18.1.2. Cebador directo para secuencia Pro-enzima

Por el análisis de las secuencias de los péptidos obtenidos en la digestión trípica (*proc. exp.* 15.1, 15.2 y 17.2) de las peptidasas purificadas, se obtuvieron secuencias que fueron identificadas en Blast como secuencias de cisteín peptidasas, localizadas en la región de enzima inactiva (Pro). Se compararon las secuencias con la de endopeptidasas de la familia Bromeliaceae, se evaluó la frecuencia de uso de codones y se diseñó el *primer* de la misma forma que en el punto anterior

18.1.3. Cebador reverso en región C-terminal.

Los resultados del análisis de las secuencias, obtenidas de la digestión trípica (MM 15.1, 15.2 y 17.2, se utilizaron para identificar péptidos que, por homología de secuencia con peptidasas de la familia Bromeliaceae correspondieron a la región más cercana del C-terminal de las enzimas purificadas. Al igual que para los cebadores directos, el diseño del oligonucleótido se hizo considerando el grado de conservación de cada codón. Este cebador fue utilizado en las reacciones de PCR

También se emplearon como *primers* reversos en la reacción de retrotranscripción para obtener el ADNc, el oligonucleótido R₀R₁polid(T) y el oligonucleótido polid(T) del kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen/Thermo-Fischer).

18.2. Aislamiento del ADNc de antiacanthina.

18.2.1. Extracción del ARN Total

Se colocaron trozos de pulpa de fruto (aproximadamente 2 g) de *Bromelia antiacantha* Bertol. sin semillas en un mortero colocado sobre baño de hielo. La muestra se trituró en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtención de un polvo fino y homogéneo. Se pesaron rápidamente fracciones de 0,2 g, que se utilizaron en la extracción de ARN total utilizando el kit RNAeasy Plant Mini Kit (Invitrogen). Por recomendación del fabricante, se utilizó el buffer de lisis RLT. La extracción se realizó en micro-columnas, siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN, 2012). El ARN total se eluyó con 50 µL de buffer de elución provisto en el kit.

18.2.2. PCR

18.2.2.1. Reacción de retrotranscripción (RT)

Para la obtención de la primer cadena de ADNc se utilizó un kit comercial (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen/Thermo-Fischer). Se realizaron dos reacciones de retrotranscripción utilizando en cada reacción el ARN total extraído y dos diferentes oligonucleótidos como cebador reverso. En una de las reacciones se utilizó el cebador reverso R₀R₁polidT (cebador diseñado para peptidasas vegetales) y en la otra reacción se utilizó el cebador reverso incluido en el kit comercial (*primer* oligo(dT)₁₂₋₁₈).

Como paso previo a la reacción de RT, el ARN mezclado con los dNTP y cada uno de los cebadores, fue sometido a un tratamiento térmico (15 min a 65 °C y 5 min en baño de hielo) para provocar la ruptura de su estructura secundaria.

| Mezcla de reacción de RT | |
|--|------|
| RT Buffer de reacción 10× (Invitrogen) | 2 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 4 µL |
| dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 mM c/u) | 1 µL |
| <i>Primer</i> R ₀ R ₁ polidT 100 µM u oligo (dT) ₁₂₋₁₈ 100 µM | 1 µL |
| Inhibidor de ARNsas 40 U/µL | 1 µL |
| DTT 0,1 M | 2 µL |
| ARN desnaturalizado | 8 µL |
| Transcriptasa reversa (SuperScript II RT-Invitrogen) | 1 µL |

En un segundo paso de la reacción a cada una de las mezclas del ARN se le agregó el mix conteniendo el buffer, MgCl₂ y DTT y se incubó 2 min a 42°C. En el último paso, a cada tubo de reacción se le agregó la transcriptasa inversa (SuperScript II RT-Invitrogen) e incubó 50 min a 42 °C. La reacción de RT finalizó con la incubación durante 15 min a 70 °C. Se enfrió en baño de hielo, centrifugó y se le agregó 1 µL de ARNsas H y se incubó 20 min a 37C.

Como control positivo de la retro-transcripción se utilizaron *random primers* (hexámeros degenerados de composición n₆, donde n puede ser A, T, C, o G).

18.2.2.2. Reacción de amplificación por PCR del ADNc

| Mezcla de reacción de PCR | |
|--|----------|
| Buffer 5X, Kapa HiFi Fidelity | 5 µL |
| Kapa dNTPs 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 10 mM c/u) | 0,75 µL |
| Primer reverso (sec. Interna ó Ro) 10 µM | 0,75 µL |
| Primer directo Nt 10 µM | 0,75 µL |
| Agua MilliQ | 16,25 µL |
| ADNc molde | 1 µL |
| Kapa HiFi HotStart ADN polimerasa (1U/ µL) | 0,5 µL |

Para aislar los productos específicos de la reacción se realizaron PCR utilizando los primers específicos diseñados para este fin (*proc. exp.* 18.1.1; 18.1.2 y 18.1.3).

Los productos de la RT (*proc. exp.* 18.2.2.1) se utilizaron sin diluir, diluidos 1/10 y 1/50 con agua milliQ estéril. Una alícuota de cada una de estas soluciones se utilizó como molde (ADNc molde) de la reacción de PCR. En la siguiente tabla se describe la composición de la mezcla de reacción.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystem) y se realizó la amplificación con el siguiente programa:

| ACCION | CONDICION | NUMERO DE CICLOS |
|---------------------------|---------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 5 min a 95°C | 1 |
| Desnaturalización | 20 seg a 98°C | |
| Annealing | 15 seg a 60°C | 30 |
| Extensión | 1 min a 72°C | |
| Extensión final | 5 min a 72°C | 1 |
| Enfriado | O.N. a 25° | - |

Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (*proc. exp.* 13).

18.2.3. Purificación de Fragmentos de ADN

Los fragmentos amplificados del tamaño esperado, confirmados mediante electroforesis en geles de Agarosa (*proc. exp.* 13), se seleccionaron para su purificación. Las bandas de DNA se recortaron del gel bajo luz UV y trataron con un kit de extracción de ADN (PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Invitrogen). El ADNc se eluyó en 50 μ L de agua libre de ARNsas y ADNsas. Se concentró en concentrador a vacío (SpeedVac) durante 10 min, hasta llegar a un volumen de 20 μ L. Se determinó la concentración de ADN en equipo NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo-Fisher) y se almacenó a -20°C

18.3. Clonado del ADNc

Los fragmentos fueron clonados utilizando el kit de clonación Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) (Ausubel et al., 2003). Este kit proporciona una estrategia de clonación de un solo paso altamente eficiente ("TOPO® Cloning") para la inserción directa de productos de PCR de extremos romos amplificados con polimerasas termoestables con autocorrección en un vector plasmídico.

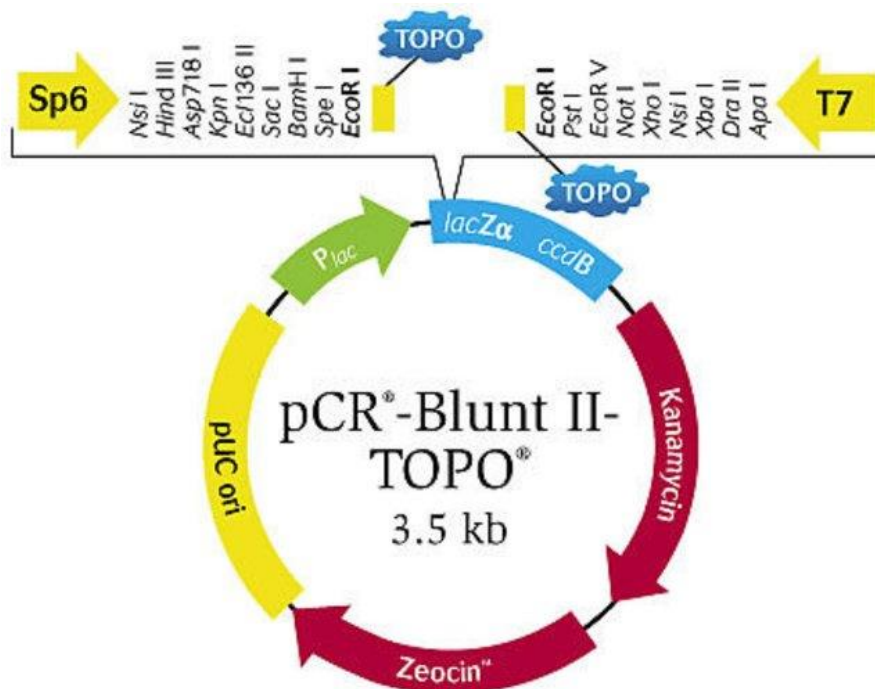


Figura 11. Mapa con las características de pCR™ -Blunt II-TOPO® y la secuencias que rodean el sitio de clonación TOPO®. Las flechas indican el inicio de la transcripción para las polimerasas T7 y SP6.

El vector Zero Blunt® TOPO® (Figura 11) contiene el gen ccdB para la selección positiva, permitiendo solo el crecimiento de vectores plásmidos que contiene los recombinantes.

El clonado constó de tres etapas sucesivas: Ligación, Transformación y Selección de transformantes.

18.3.1. Ligación

Los fragmentos de DNA seleccionados y purificados fueron ligados al vector pCR[™] II-Blunt-TOPO[®]. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante.

| Mezcla de Ligación | |
|-------------------------------------|-----------|
| ADNc producto de PCR | 4 μ L |
| Solución Salina | 1 μ L |
| ADN ligasa T4 3 U/ μ L, Promega | 1 μ L |

Se mezclaron bien los componentes de la reacción y se dejó a temperatura ambiente (22 a 23°C) durante 5 minutos.

La mezcla se dejó en baño de hielo hasta su utilización.

18.3.2. Transformación

Realizada la reacción de ligación, se procedió a introducir el vector conteniendo la secuencia deseada, en células competentes de *E. Coli*.

La transformación se realizó agregando 2 μ L de la mezcla de ligación a un vial de células químicamente competentes de *E. coli* (One Shot[®]), mezclando por agitación. Se siguió un protocolo de *shock* térmico (30 min en hielo, 30 segundos a 42 °C y 5 min en hielo). Se agregó 250 μ L de medio S.O.C. a temperatura ambiente y se colocó en agitación horizontal a 200 rpm durante 1 h a 37°C. A partir de este paso, se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar o entre dos mecheros.

Se tomó un volumen de 50 μ L de la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación y se volcó en una placa de Petri con medio LB (Luria y Bertani) conteniendo kanamicina (50 μ g/ml), previamente calentada a 37°C. Utilizando una espátula de Digralsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad bajo campana se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C. La selección de los clones se basó en las observaciones que se describen en la siguiente tabla:

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| Células sin vector | No crecen |
| Células con vector sin inserto | Crece colonias |
| Células con vector con inserto | Crece colonias |

18.3.3. Selección de los transformantes (clones)

Las colonias blancas se seleccionaron para verificar por PCR, la presencia del inserto buscado. Cada colonia se aisló con un palillo de madera estéril y sembró en placa de Petri con medio LB + kanamicina que es dividido en 8 partes, sembrando una colonia por división. Se dejó crecer O.N a 37°C. Se tomó una muestra con palillo estéril de cada colonia crecida y resuspendió en 50 µL de agua MQ. Se homogenizó y se llevó a baño de agua a 95°C durante 5 min para romper las células y desnaturalizar sus componentes. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf y se utilizó como molde de DNA en la reacción de PCR utilizando *primers* específicos. Para identificar los amplicones con la secuencia madura de la enzima, se utilizó el cebador directo N_f y el cebador reverso sec_{int} . Para los clones que contuvieron la secuencia Propeptidasa, se utilizó el cebador directo seq_{Pro} y el cebador reverso rev_{fast} . Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (*proc. exp. 13*)

Se prepararon inóculos para obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. Para ello, cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, se introdujeron en un tubo conteniendo 3 mL de medio de cultivo LB con 50 µg/ml de kanamicina. Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

18.3.4. Glicerinado de los clones

Se tomó una alícuota de 500 µL de cada cultivo a la que se le añadió 100 µL de glicerol 80% (%/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

18.4. Secuenciación del ADNc Clonado

18.4.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Se utilizó un kit de extracción, PureLink® Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). La técnica consistió en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el DNA plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y se eluyó con agua milliQ estéril.

Se siguió el procedimiento del fabricante (Technology, 2005). Brevemente: para obtener el DNA plasmídico se tomó una alícuota de 1,5 ml proveniente del cultivo de interés. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento utilizando el mismo tubo, para obtener las células de 3 mL de cultivo. Las células obtenidas fueron lisadas con el buffer de lisis y en el mismo tubo se agregaron los buffer de precipitación, eliminando el sólido por centrifugación. El sobrenadante fue pasado a través de la columna cromatográfica quedando retenido el DNA plasmídico. Luego de los pasos de lavado se eluyó con agua milliQ estéril.

18.4.2. Secuenciación del ADN

Las muestras fueron secuenciadas en el servicio de secuenciación de la La Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay). Para la obtención de las secuencias de interés, se utilizaron los primers M13 Forward y M13 Reverse.

Los cromatogramas fueron analizados con el programa Bioedit.

18.4.3. Análisis de las secuencias de los ADNcs

Las secuencias obtenidas de los ADNcs de los clones fueron analizadas con un software de alineamiento Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) para la obtención de una secuencia consenso. La secuencia consenso se tradujo en los seis marcos de lectura con el software *Translate Tool* disponible en el servidor de ExPASy. Se realizó también una búsqueda por PSI-BLAST ajustando el perfil a proteínas con estructura cristalográfica ya resuelta de resolución menor a 3Å.

El cálculo teórico de propiedades fisicoquímicas fue obtenido con el programa ProtParam del servidor ExPASy y se comparó con los datos obtenidos experimentalmente.

19. MODELADO POR HOMOLOGÍA DE LA SECUENCIA DE LA PEPTIDASA MADURA Y PRO-PEPTIDASA

El modelado por homología utiliza estructuras de proteínas resueltas por técnicas experimentales como referencia para predecir la conformación de la proteína en estudio. Para poder aplicar este método de predicción es necesario que la proteína a modelar posea un grado mínimo (35%) de identidad con las proteínas de referencia (Singh and Dominy, 2010).

Para el modelado por homología o modelado comparativo, se siguió la metodología descrita por Fiser y Sali (Fiser and Šali, 2003), utilizando como estrategia el ensamblaje de fragmentos rígidos obtenidos de estructuras similares alineados por medio de secuencias primaria y secundaria.

Se utilizaron para la obtención de los moldes los siguientes servidores de uso libre: Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>), (Waterhouse et al., 2018), HHpred (MPI Bioinformatics Toolkit <https://toolkit.tuebingen.mpg.de>) (Zimmermann et al., 2018) y I-TASSER (Yang and Zhang, 2015)

19.1. Obtención de Moldes.

Para la obtención de las secuencias que servirían como moldes para el modelado de AntP y Pro-ant, se utilizaron los resultados de los 3 servidores seleccionados, 2 de predicción de estructura (HHpred) y I-TASSER y un servidor de modelado comparativo: SWISS-MODEL.

La estrategia fue la siguiente: Se ingresaron las secuencias de AntP y Pro-ant al campo de búsqueda de cada uno de los servidores. Con los resultados devueltos por cada uno de estos servidores, se hizo una categorización en función de sus diferentes campos de evaluación. Las secuencias de proteínas evaluadas que tuvieron el mayor score en cada uno de los servidores y que fueron coincidentes entre ellos, se seleccionaron como posibles candidatos para el modelado y sus secuencias fueron comparadas mediante alineamientos múltiples.

Los campos de evaluación para el servidor Swiss-Model fueron: Identidad de secuencia, QMEAN (Benkert et al., 2011a), GMQE. Para el servidor HHpred, los campos evaluados fueron: la probabilidad, e-value y el % de secuencia comparada. Para I-TASSER, los campos utilizados para la ponderación de las estructuras a utilizar como moldes fueron: TM-score, RMSD, identidad de secuencia y largo de secuencia comparada.

19.2. Alineamiento múltiple

Con las secuencias seleccionadas se realizó un alineamiento múltiple, utilizando CLUSTAL-W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). El alineamiento se realizó de forma independiente para Ant y Pro-ant. Se utilizó como criterio de evaluación para el refinamiento de la selección, el grado

de conservación de los residuos del sitio catalítico y de zonas altamente conservadas para esta familia botánica. Se utilizó el programa ENDscript/ESpirit (Robert and Gouet, 2014).

19.3. Construcción del modelo.

Los modelos utilizados en el trabajo, fueron generados en el servidor Swiss-Model, sobre las estructuras seleccionadas por alineamiento múltiple (Bienert et al., 2017). Se construyó un molde por cada secuencia seleccionada, generando para cada una un archivo PDB. A cada estructura se le realizó una minimización de la energía utilizando el campo de fuerza CHARM27.

19.4. Validación de los modelos obtenidos

Los modelos generados y minimizados energéticamente, fueron evaluados utilizando los programas Verify 3D y PROCHECK (Eisenberg et al., 1997; Laskowski et al., 1993). Verify 3D evalúa el modelo analizando la compatibilidad secuencia-estructura, mientras que PROCHECK examina la estereoquímica del esqueleto carbonado de la proteína y de sus cadenas laterales a través de gráficos de Ramachandran.

19.5. Análisis de los modelos generados

Los modelos generados, su alineamiento estructural con las secuencias utilizadas como molde, reconocimiento de diferentes regiones conservadas, sitio activo y otros parámetros, fueron visualizados utilizando el programa Pymol (DeLano, 2009).

V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 PREPARACIÓN DE EXTRACTO CRUDO

Los frutos de *Bromelia antiacantha* destinados a la extracción de proteasas se seleccionaron en función del grado de madurez alcanzado (frutos bien desarrollados y maduros), con un peso promedio de 30 a 36 g/fruto.

Los extractos crudos tuvieron un contenido promedio de proteína del 0,022% ($0,22 \pm 0,02$ mg/g de peso fresco de frutos).

La actividad proteolítica promedio de los extractos fue de $9,0 \pm 0,2$ U_{Azocas} por gramo de frutos.

2. PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CRUDO

Los extractos vegetales, en general, son una rica fuente de vitaminas, minerales, fibras y varios compuestos bioactivos (como carotenoides, antocianinas y otros compuestos de naturaleza fenólica) además de aportar un alto contenido glucídico. Muchas de estas especies moleculares pueden interferir en los procesos de purificación proteica y en particular en los ensayos de actividad enzimática. Los azúcares incrementan la viscosidad de la solución y esto dificulta la separación cromatográfica de las enzimas. Por su parte, la presencia de compuestos fenólicos perjudica el aislamiento de enzimas activas a partir de tejidos vegetales por técnicas convencionales. Los fenoles se combinan con las proteínas reversiblemente formando puentes de hidrógeno e irreversiblemente por oxidación, en el caso de las enzimas, esto puede causar la pérdida de la actividad enzimática (Marita et al., 2010).

El extracto crudo (EC) de *Bromelia antiacantha* Bertol, mostró una elevada razón entre el contenido de azúcares y de proteínas (125:1) determinada por el método de López y colaboradores (López-Legarda et al., 2017). Estudios realizados por Krumreich y colaboradores mostraron que la pulpa de *Bromelia antiacantha* presenta en su composición físico-química un alto contenido en compuestos fenólicos (0,07% equivalente a ácido gálico), carotenoides (0,162% equivalente a β -caroteno) y vitamina C (0,06% equivalente a ácido ascórbico) así como la presencia de pigmentos y otros compuestos hidrosolubles (Krumreich et al., 2015). Para la eliminación o disminución del contenido de azúcares y compuestos fenólicos que pueden afectar la integridad de las enzimas de interés, se realizó una purificación inicial del EC por precipitación con diferentes volúmenes de acetona.

Como se observa en la Tabla 3, la precipitación con diferentes volúmenes de acetona afectó el contenido de proteínas y en relación proporcional la actividad proteolítica. Al incrementar la cantidad de acetona, aumentó la cantidad de proteína recuperada y la actividad, obteniéndose una recuperación de casi un 100% del total de proteínas y actividad, cuando la muestra fue tratada con 4 volúmenes de acetona.

Con este procedimiento el contenido de azúcares disminuyó, llegando a reducirse en un 60% cuando la muestra fue precipitada con cuatro volúmenes de acetona (Apéndice 2).

La muestra parcialmente purificada, seleccionada para las etapas de purificación posterior, fue el precipitado proteico obtenido con cuatro volúmenes de acetona al se denominó Antiacanthaína (Ant).

El tratamiento del extracto crudo con acetona permitió tanto la eliminación de los azúcares solubles como de los compuestos fenólicos, proveyendo un extracto parcialmente purificado que podría ser directamente aplicado en procesos industriales y que además constituyó el punto de partida del proceso de purificación cromatográfico.

Tabla 3. Precipitación del extracto crudo con diferentes volúmenes de acetona

| Muestra | Proteínas | | Actividad | | Actividad específica |
|----------------------|-------------|-------|----------------------|-------|----------------------|
| | mg/mL | % | U _{azo} /mL | % | U _{azo} /mg |
| Extracto crudo | 1,98 ± 0,01 | 100,0 | 14,5 ± 0,3 | 100,0 | 7,33 |
| Ppdo. 1 vol. acetona | 1,35 ± 0,01 | 68 | 9,7 ± 0,3 | 67 | 7,16 |
| Ppdo. 2 vol. acetona | 1,67 ± 0,05 | 84 | 11,9 ± 0,3 | 82 | 7,14 |
| Ppdo. 3 vol. acetona | 1,66 ± 0,02 | 84 | 12,1 ± 0,1 | 83 | 7,29 |
| Ppdo. 4 vol. acetona | 1,84 ± 0,06 | 96 | 13,6 ± 0,1 | 94 | 7,34 |

3. ISOELECTROENFOQUE Y ZIMOGRAMA DE Antiacanthaína

La composición proteica y pI de Antiacanthaína se analizó por isoelectroenfoco en gel de poliacrilamida (pH entre 3,0 y 10,0). En la figura 12, carril 2, se observaron varias bandas proteicas (4 o más) presentes en el preparado de Antiacanthaína, que presentaron valores de pI superiores a 7,6. El zimograma correspondiente (Figura 12, carril 3) reveló que al menos cuatro de esas bandas proteicas (pI 7,6; 8,2; 8,8 y mayor a 9,0), presentaban actividad proteolítica.

De acuerdo a estos resultados y teniendo en cuenta que la diferencia de pI entre las bandas proteicas con actividad es superior a 0.5 puntos de pH, se decidió emplear cromatografía de intercambio iónico como estrategia de purificación.

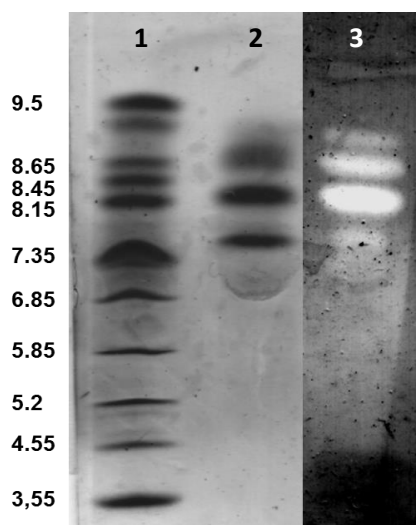


Figura 12. Isoelectroenfoco 1) Marcador de pI 2) Antiacanthaína 3) Zimograma del Antiacanthaína

La presencia de varias proteínas con actividad proteolítica y diferentes puntos isoeléctricos es muy común entre los frutos de la familia Bromeliaceae y ha sido reportada por varios autores (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de pI de enzimas proteolíticas presentes en frutos de algunas especies de la familia Bromeliaceae

| Especie | Endopeptidasa | pI | Referencia |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------------|
| <i>Anana comosus</i> | bromelaina de fruto | 4,6 | (Ota et al., 1985) |
| | bromelaina de tallo | 9,55 | (Ritonja et al., 1989) |
| | ananaina | >10 | (Harrach et al., 1995) |
| | comosaina | >10 | (Rowan et al., 1990) |
| | hieronymaina I | >10 | (Bruno et al., 2003) |
| <i>Bromelia Hieronymi</i> | hieronymaina II | 7,6 /8,3 | (Bruno et al., 2006) |
| | hieronymaina III | 5,9/ 6,4 | (Bruno et al., 2008) |
| | macrodontaina I | 6,1 | (María E. Errasti et al., 2018) |
| <i>Pseudoananas macrodontes</i> | macrodontaina II | 5,9 | (López et al., 2001) |
| | <i>Hohenbergia penduliflora</i> | penduliflorain I | 4,6 /5,0 |
| <i>Bromelia balansae</i> | balansaina | 5,45 | (Natalucci et al., 2002) |

4. PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Casi sin excepción, los extractos vegetales a partir de los que se han aislado endopeptidasas cisteínicas, presentan más de una de este tipo de enzimas con tamaño molecular en el rango de 20 a 30 kDa. Por estos motivos tanto las técnicas de afinidad como las de exclusión molecular no suelen ser eficientes para separarlas entre sí. En estos casos las técnicas basadas en la carga eléctrica de las proteínas, tales como la cromatografía de intercambio iónico resulta más apropiada, por lo que conocer previamente el punto isoeléctrico de las especies proteicas presentes en el extracto y saber cuáles de ellas son proteolíticamente activas es de suma importancia.

4.1 Esquema de purificación

Para mejorar la performance de la separación cromatográfica, se trabajó con el sistema automatizado ATKA Purifier (GE Healthcare) y columna con el intercambiador catiónico Hi-Trap SP HP (GE Healthcare).

Considerando que en el isoelectroenfoco y zimograma (Figura 5) se determinó que las peptidasas presentes en Antiacanthaína presentaban pI en el rango de pH 7,6 a 9,0, inicialmente se seleccionó pH 6 para lograr la adsorción de las enzimas al intercambiador. Como se resume en la Tabla 5, a ese pH (buffer Bis-Tris 0,02M pH 6) las proteínas responsables de la actividad proteolítica de Antiacanthaína no quedaron adsorbidas al intercambiador. La disminución de pH y fuerza iónica del buffer (citrato 0,01M pH 4,5) permitió la adsorción de las proteínas de Antiacanthaína con el intercambiador.

Tabla 5. Intercambio Catiónico en sistema automatizado. Se muestran los resultados de la elución Utilizando concentraciones variables de NaCl .
*N/R: no retenido

| MATRIZ | BUFFER | GRADIENTE NaCl (M) | RESULTADO (FRACC. CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA) |
|---------------|----------------------|--------------------|---|
| HI-TRAP SP HP | BIS-TRIS 0,02M PH:6 | 0,00-0,50 | TODO EN N/R* |
| HI-TRAP SP HP | CITRATO 0,01M PH:4,5 | 0,00-0,50 | 3 PICOS NO RESUELTOS |
| HI-TRAP SP HP | CITRATO 0,01M PH:4,5 | 0,15-0,30 | 3 PICOS (± RESUELTOS) |
| HI-TRAP SP HP | CITRATO 0,01M PH:4,5 | 0,12-0,30 | 3 PICOS (± RESUELTOS) |
| HI-TRAP SP HP | CITRATO 0,01M PH:4,5 | 0,05-0,30 | 3 PICOS BIEN RESUELTOS |

La elución de las proteínas adsorbidas al intercambiador con gradiente de NaCl de 0,00 a 0,30 M resultó en tres picos poco resueltos o parcialmente resueltos con actividad proteolítica. Para mejorar la resolución de los picos se modificó el gradiente de NaCl obteniéndose una buena resolución del tercer pico proteico con un gradiente de 0,15 a 0,30M de NaCl y la separación de los dos primeros picos sin afectar la resolución del tercero con un gradiente de 0,12 a 0,30 M de NaCl.

Finalmente, la elución con gradiente de NaCl 0,05 a 0,30M en buffer Citrato 0,01M pH 4,5 permitió la separación completa de los tres picos de Ant con actividad proteolítica.

Las características del buffer fue un condicionante en el éxito de la interacción de las proteínas en el intercambiador. La condición óptima se logró con buffers de baja fuerza iónica (0,01M) a pH ácidos (4,5- 5) (Figura 13). Las condiciones de flujo que permitieron una mejor separación de los componentes activos fue de 2 mL/min con un gradiente de NaCl de 0,05-0,30M.

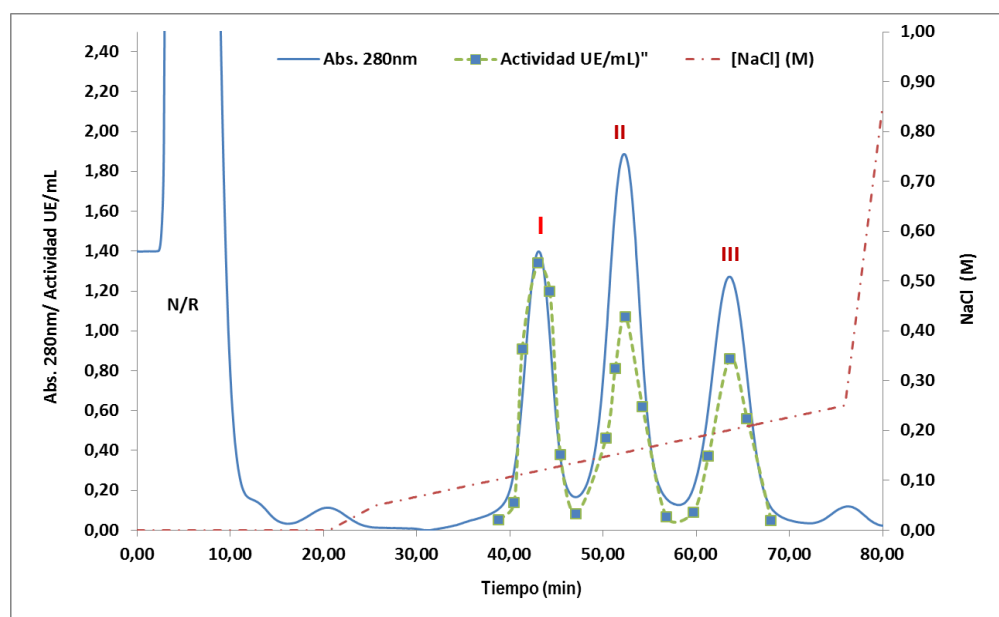


Figura 13 Cromatograma del intercambio iónico en columna Hi-trap SP-Sepharose HP, equilibrada en buffer Citrato 0,01M pH 4,5. Se observan tres picos de proteínas (línea azul) y su correspondiente actividad proteolítica (línea verde).

La mejor performance se logró con el intercambiador Hi-Trap SP HP, en el sistema ATKA Purifier utilizando buffer Citrato 0,01M pH 4,5.

Las fracciones que componen cada pico (pico 1, pico 2 y pico 3 en figura 13) fueron unificadas. Los componentes de cada pico fueron denominados como: Antiacanthaína A (pico I) o AntA, Antiacanthaína B (pico II) o AntB y Antiacanthaína C (pico III) o AntC. Las muestras de AntA, AntB y

AntC se liofilizaron para obtener estos preparados en cantidades suficientes para desarrollar el resto de los trabajos planteados.

El cuadro de purificación presentado en la Tabla 6 resume los resultados del proceso. La preparación parcialmente purificada (Antiacanthaína), retuvo el 100% de la actividad del extracto crudo y más del 90% de las proteínas iniciales.

Las muestras obtenidas de la purificación por cromatografía de intercambio iónico, AntA, AntB y AntC, dieron un porcentaje de proteínas del 20%, 11,0% y 13% respectivamente. Estas, mostraron un bajo factor de purificación (1,9 para AntA, 1,5 para AntB y 2,1 para AntC). Este bajo valor del factor de purificación es una característica usualmente observada en los preparados de órganos vegetales que presentan una elevada actividad proteolítica, donde estas enzimas parecieran ser las componentes proteicos mayoritarios. Este comportamiento fue confirmado en el isoelectroenfoque (Fig.12) del preparado Ant, donde las diferentes bandas de proteínas reveladas por tinción con azul de coomassie (fig. 12 carril 2) presentaron actividad proteolítica (fig. 12 carril 3). Los resultados también mostraron que AntC, a pesar de ser la enzima presente en menor cantidad, mostró mayor actividad específica que AntA y AntB.

El protocolo cromatográfico desarrollado de un único paso, para la purificación de las enzimas proteolíticas de Ant, es más sencillo que los utilizados en la purificación de la proteasas del ananá (Matagne et al., 2017; Rowan et al., 1990) y permitió una eficiente separación de las tres principales fracciones activas presentes en frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol., recuperándose el 44% de la actividad aplicada a la columna.

Tabla 6. Esquema de purificación de *Bromelia antiacantha*

| Muestra | Act. (total) (U _{azo}) | Prot. (total) (mg) | AE (U _{azo} /mg) | Factor de Purificación | Rendimiento (%) |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|
| EC | 110,2 ± 0,8 | 1,84 ± 0,08 | 60 | 1,0 | - |
| Antiacanthaína | 114,5 ± 4,7 | 1,75 ± 0,14 | 65 | 1,1 | 100 |
| AntA | 22,0 ± 1,2 | 0,19 ± 0,04 | 116 | 1,9 | 20 |
| AntB | 12,0 ± 3,4 | 0,13 ± 0,00 | 92 | 1,5 | 11 |
| AntC | 14,0 ± 0,8 | 0,11 ± 0,02 | 127 | 2,1 | 13 |

4.2 Evaluación de la purificación

4.2.1. Electroforesis nativa y revelado específico (ZIMOGRAMA)

La metodología utilizada para evaluar el proceso de purificación fue la electroforesis nativa. Las proteínas, mantenidas en su estado nativo al conservar su estructura migraron por la relación carga/radio (q/r).

En la figura 14 se observa la movilidad electroforética y composición proteica de las muestras: Antiacanthaína, AntA, AntB y AntC. Los carriles 1 y 2, correspondientes a Antiacanthaína, se observaron varias bandas proteicas parcialmente resueltas, con diferente movilidad electroforética. La baja movilidad observada podría estar indicando una baja relación q/r o la posible agregación proteica.

Los carriles 3 a 6 muestran la migración electroforética de algunas de las fracciones que compusieron el pico I (AntA). Se pudo observar que todas las fracciones presentaron el mismo perfil electroforético, mostrando todas, una sola banda proteica que se corresponde con la de mayor movilidad electroforética de la muestra Ant.

En los carriles 7 a 9 se sembraron distintas fracciones componentes del pico II (AntB). Se observó también en todas ellas una banda proteica única con una movilidad electroforética menor que AntA lo que estaría indicando una composición diferencial de estas proteínas.

En los carriles 10 a 12, se observó la migración electroforética de las proteínas de las fracciones componentes del pico III (AntC). En estas fracciones se observaron dos bandas proteicas con migraciones diferentes. Una de las bandas tuvo una migración electroforética intermedia entre AntA y AntB. La otra banda correspondió con la de menor movilidad en Ant.

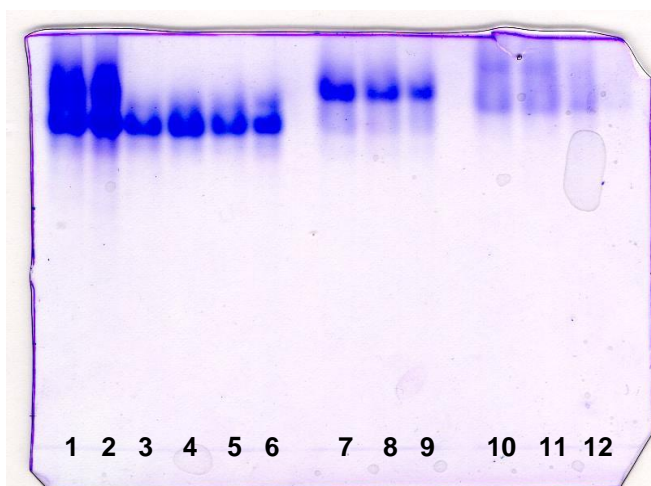


Figura 14. Electroforesis nativa.

Tinción con CBB. Carril 1 y 2, Antiacanthaína; Carriles 3 a 6, Fracciones del pico correspondiente a AntA; Carriles 7 a 9 Fracciones correspondiente a AntB; carriles 10 a 12, Fracciones correspondientes a AntC.

Con la finalidad de corroborar la homogeneidad de las muestras analizadas, se realizó una electroforesis nativa utilizando un buffer de corrida conteniendo SDS (0,1%). La concentración de SDS utilizada no afectó la estructura nativa de las proteínas de Antiacanthaína (este comportamiento ya se había observado anteriormente) pero su presencia en el buffer de corrida

evita posibles interacciones entre las proteínas provocadas por el pH del medio ó la concentración de las mismas y que no es una condición de su estado nativo (Nowakowski et al., 2014). Se realizó revelado específico para proteasas (Zimograma) para confirmar el estado funcional de las proteínas.

En la figura 15 A se muestran los resultados de la electroforesis para la muestra Ant (carril1), AntA, AntB y AntC (carriles 2, 3 y 4 respectivamente). En el carril 1, correspondiente a Ant, se pudo observar un cambio importante en la distribución y migración electroforética de las proteínas que componen la muestra. La presencia del SDS en el buffer de corrida evitó el agregado producido por interacciones no específicas entre las diferentes proteínas, permitiendo la migración de las mismas en función de la relación a su carga y tamaño hidrodinámico. El perfil proteico mostró al menos seis bandas proteicas bien diferenciadas con migraciones electroforéticas diferentes. El carril 2, correspondiente a AntA, mostró una sola banda proteica, que se correlaciona con la proteína de menor movilidad electroforética en Ant. En el carril 3, correspondiente a las proteínas presentes en AntB, se observó un perfil migratorio diferente al observado en la electroforesis nativa de la Figura 14. Se observaron tres bandas proteicas bien diferenciadas con migración electroforética mayor a la de AntA para dos de sus proteínas y una migración similar para la tercera banda proteica. En el carril 4 se sembró la muestra correspondiente a AntC. También se pudo observar un perfil electroforético diferente al de la electroforesis nativa sin SDS. Al igual que con AntB, se observaron al menos tres bandas proteicas con movilidades electroforéticas diferentes.

En la Figura 15 B se muestra el resultado del Zimograma realizado sobre el gel de la Figura 15 A. Los carriles 5 a 7 muestran en color claro, las bandas proteicas que presentaron actividad proteolítica. Se observó, que todas las bandas proteicas observadas en la figura 15A, presentaron actividad proteolítica. Esta actividad se manifestó, aún con la presencia de 0,1% de SDS en el buffer de corrida y a pH 9. Este resultado estaría sugiriendo que estas enzimas tienen la capacidad de modificar su carga y conformación tridimensional, manteniendo la funcionalidad. Este resultado, estaría sugiriendo una gran estabilidad funcional de estas enzimas (AntA, AntB y AntC) a diferentes medios y condiciones, haciéndolas sumamente atractivas como potenciales catalizadores en procesos Biotecnológicos.

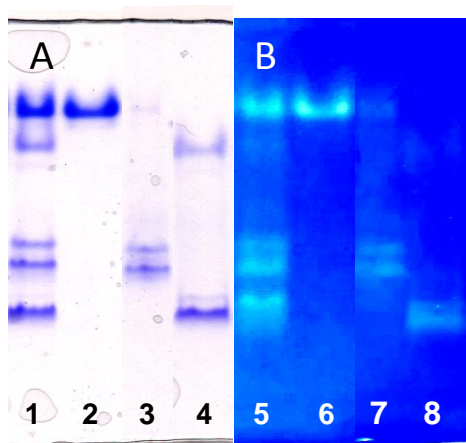


Figura 15. Electroforesis nativa y zimograma. A) Revelado con CBB Carril 1: Antiacanthaína; Carril 2: AntA; Carril 3: AntB; Carril 4: AntC, B) Zimograma. Carril 5: Antiacanthaína; Carril 6: AntA; Carril 7: AntB; Carril 8: AntC.

5. CARACTERIZACIÓN DE AntA, AntB Y AntC

5.1. Determinación de pI

Para confirmar los valores de pI de las fracciones enzimáticas purificadas AntA, AntB y AntC, se efectuó un isoelectroenfoque.

Se utilizó el programa ImageJ para calcular la distancia migrada de las proteínas del patrón de pI (Figura 16, carril 4) e interpolar las distancias migradas de las proteínas purificadas y obtener sus respectivos valores de punto isoelectrico (Apéndice 3).

Los perfiles de migración por punto isoelectrico se muestran en la figura 16. Se observó en los carriles 1,2 y 4 correspondiente a AntA, AntB y AntC, más de una banda proteica con diferentes valores de pI. Para AntA, se observaron dos bandas proteicas de pI 7,3 y 8,1. La fracción correspondiente a AntB, mostró al igual que AntA dos bandas de pI 8,2 y 8,8 y para AntC se observaron también dos bandas proteicas de pI 9,0 y >9. El perfil de pI para la muestra correspondiente a Ant, se observa en la figura 16, carril 1. Ya se había observado la distribución de las bandas proteicas de esta muestra y se había visto que todas tenían actividad (Figura 12). Lo que se pudo diferenciar, calculando los valores de pI de las fracciones purificadas, que la banda de Ant correspondiente a pI 8,2, se corresponde con dos banda proteicas, la de pI 8,1 correspondiente a AntA y la de pI 8,2 correspondiente a AntB. La banda de Ant de pI 8,8, también estaría compuesta por dos bandas muy cercanas, la de pI 8,8, correspondiente a AntB y la de pI 9,0 correspondiente a AntC.

Resultados similares han sido observados en varias peptidasas de la familia Bromeliaceae, donde todos los criterios de pureza indican que se trata de una única peptidasa pero mediante IEF, se evidencian más de una banda proteica (Bruno et al., 2008).

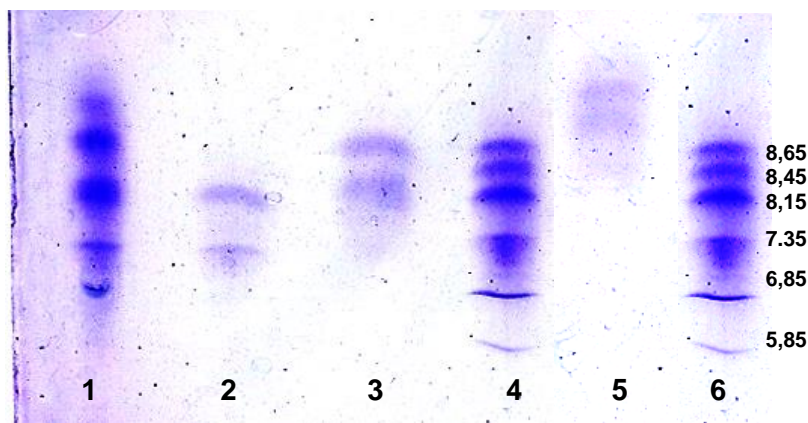


Figura 16. IEF. Carril 1, Antiacanthaína; Carril 2, AntA; Carril 3, AntB; carril 4 y 6, marcador de pI; carril 5, AntC

5.2. Tamaño molecular

5.2.1. Tricine SDS-PAGE

Para determinar el tamaño molecular (MW) de las proteínas presentes en las fracciones purificadas se realizó una electroforesis desnaturalizante y reductora en sistema de buffer diferencial (TRICINE SDS-PAGE). Se eligió este sistema porque se logra una mejor separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa (Schägger, 2006). La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970).

En la figura 17, carriles 2 y 3, se observa el patrón de bandas proteicas del EC y Antiacanthaína. La proteína mayoritaria correspondió a la banda de 24 kDa de acuerdo a la migración del marcador de peso molecular. Se observaron también bandas de menor tamaño molecular (16 kDa y menor a 7 kDa) que podrían corresponder a productos de degradación. En ambos preparados no se observaron diferencias en el perfil proteico, coincidiendo con la alta recuperación de proteínas obtenido en la precipitación acetónica (Tabla 6). En los carriles 4, 5 y 6, se observan las bandas proteicas de las fracciones purificadas AntA, AntB y AntC respectivamente.

En los tres carriles se observa una única banda proteica que se corresponde con la banda mayoritaria (24kDa) del EC y Antiacanthaína.

Esta masa molecular es similar a las determinadas para otras proteasas cisteínicas de vegetales (Turk et al., 2000).

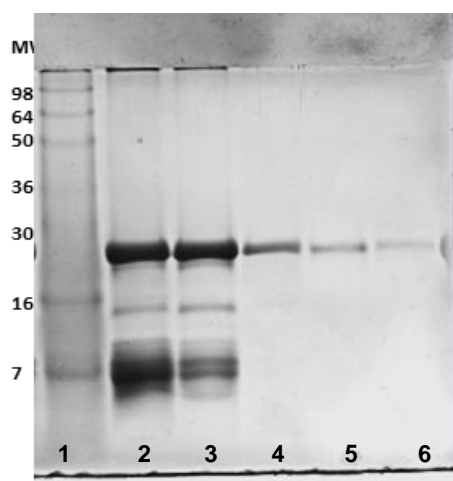


Figura 17. Tricine SDS-PAGE. CARRIL 1, Marcador de peso molecular See-blue (INVITROGEN); CARRIL 2, EC; CARRIL 3, Antiacanthaína; CARRIL 4, : AntA; CARRIL 5, AntB; CARRIL 6, AntC

El que las enzimas proteolíticas detectadas tengan una relación q/r diferente y masa molecular muy cercana, podría ser un indicio de la presencia de isoformas o modificaciones postraduccionales que provoquen cambios conservativos en estas enzimas.

5.2.2. Análisis por espectrometría de masas

Se realizó el espectro de Masas (Maldi-TOF MS/MS) al preparado de Antiacanthaína (Figura 18). Se observó una señal única, no tan clara, que al amplificarla, parecería estar conformada por varios picos cuyo valor medio fue de 23404 Da. Este dato iría en concordancia con los resultados previos, donde se observó que Ant está compuesta por varias proteínas. El otro pico observado corresponde a la doble ionización de la muestra (correspondiente a la mitad del valor de la señal principal).

En la figura 19 se muestran los espectros de masa de las diferentes fracciones purificadas. Se pudo constatar que para las tres fracciones, las señales del espectro mostró un único pico homogéneo. Los tamaños moleculares determinados por espectrometría de masas Maldi-TOF MS/MS fueron para AntA 23300 Da, AntB 23474 Da y para AntC 23933 Da.

Los tamaños moleculares de las tres enzimas resultaron ser muy cercanos, la diferencia podría pensarse en la masa de 1 a 4 aminoácidos.

Estos resultados contrastan con lo observado en la electroforesis nativa donde los perfiles mostraron más de una banda proteica y con el IEF, donde también se observaron más de una banda con diferentes pI conformando cada una de las fracciones purificadas. Estos resultados, se ha visto en otras peptidasas de origen vegetal (Azarkan et al., 2011) Según algunos autores, este comportamiento puede deberse a modificaciones químicas en algunos residuos (desaminaciones y/o hidroxilaciones) que no modifican la masa molecular, pero si la carga neta de la enzima (Harrach et al., 1998; Pérez et al., 2010)

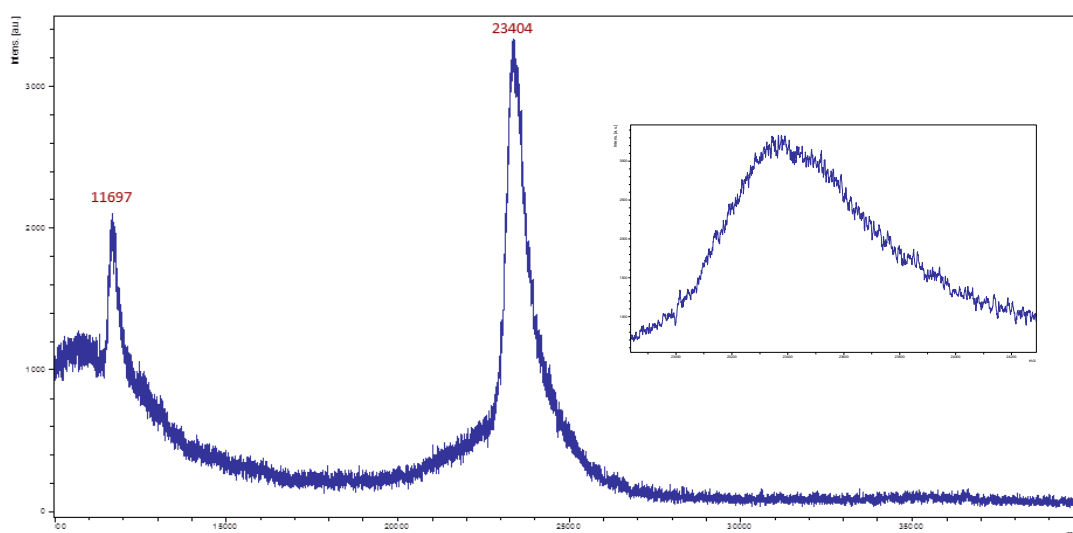


Figura 18. Maldi-TOF MS/MS de Antiacanthaína

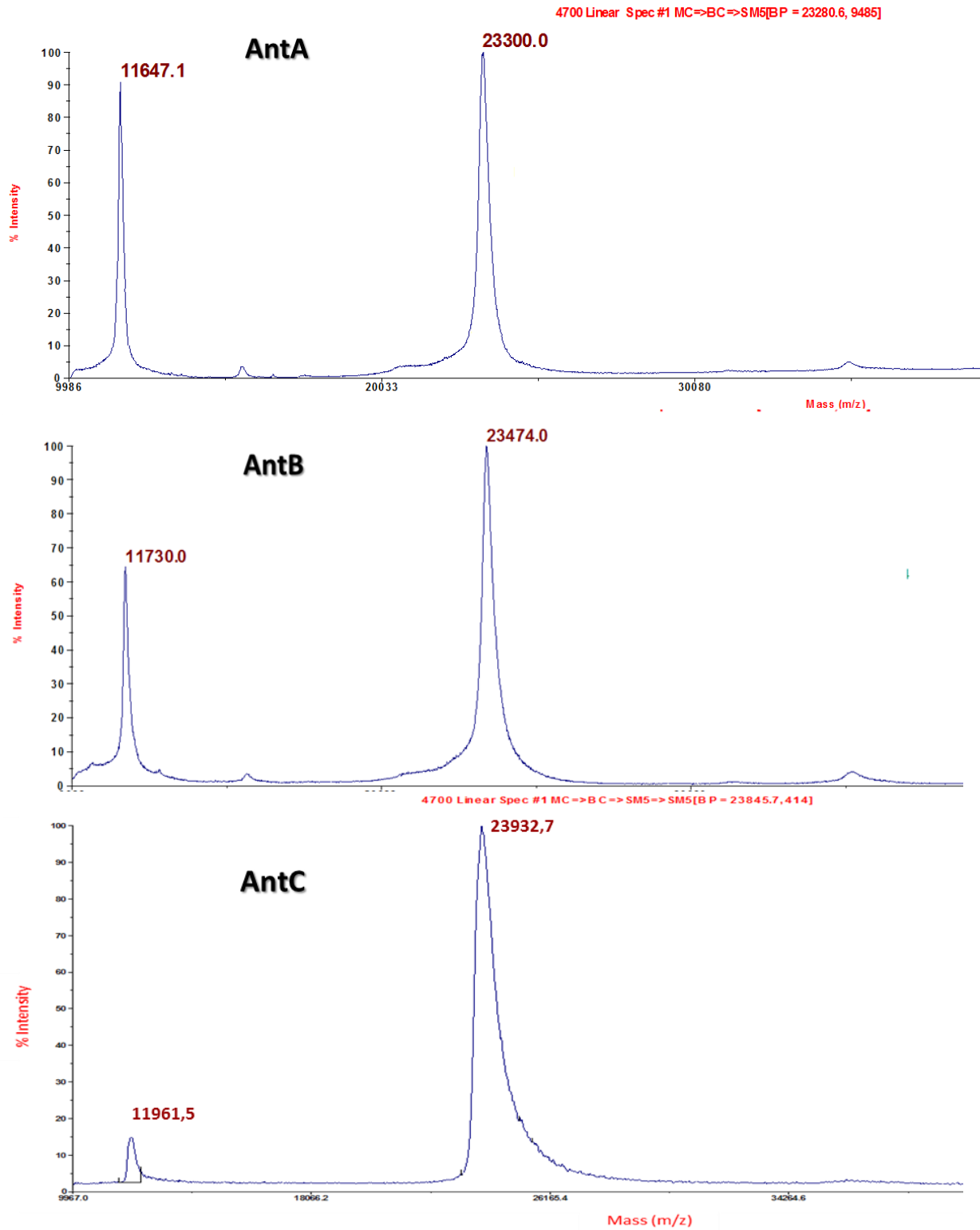


Figura 18. Maldi-TOF MS/MS de AntA, AntB y AntC

5.3. Determinación del carácter glicoproteico

El revelado para glicoproteínas, aplicado a una corrida electroforética en condiciones nativas, se muestra en la figura 20 A. Se pudo observar que solo los carriles 1 y 2, correspondientes a la muestra de Antiacanthaína, presentan una banda para glicoproteína de baja movilidad electroforética. El resto de los carriles, correspondiente a las fracciones purificadas (carril 3 y 4 corresponden a AntA, 5 a 7 corresponden a AntB y 9 a 10 corresponden a AntC) dieron resultado negativo, evidenciando el carácter no glicoproteico de estas enzimas. Para saber si la banda de glicoproteína observada en el carril de Antiacanthaína correspondía a alguna de las bandas que mostraban actividad proteolítica, se realizó sobre el mismo gel, tinción para proteínas. Los resultados se observan en la figura 20 B. La banda correspondiente a la glicoproteína observada, no se correlacionó con ninguna de las bandas proteicas de las enzimas purificadas. Su movilidad electroforética fue menor que las de las proteasas aisladas y además no se evidenció por la tinción con CBB.

Si bien la glicosilación de las fitoproteasas de la familia *Bromeliaceae* son comunes (Napper et al., 2015; Ota et al., 1985; Rowan et al., 1990) , no es una característica constante, como lo demuestra el hecho de que bromelaína de tallo y comosaína son glicosiladas pero no ananaína, proviniendo las tres proteasas del mismo material (Rowan, 2013d, 2013c).

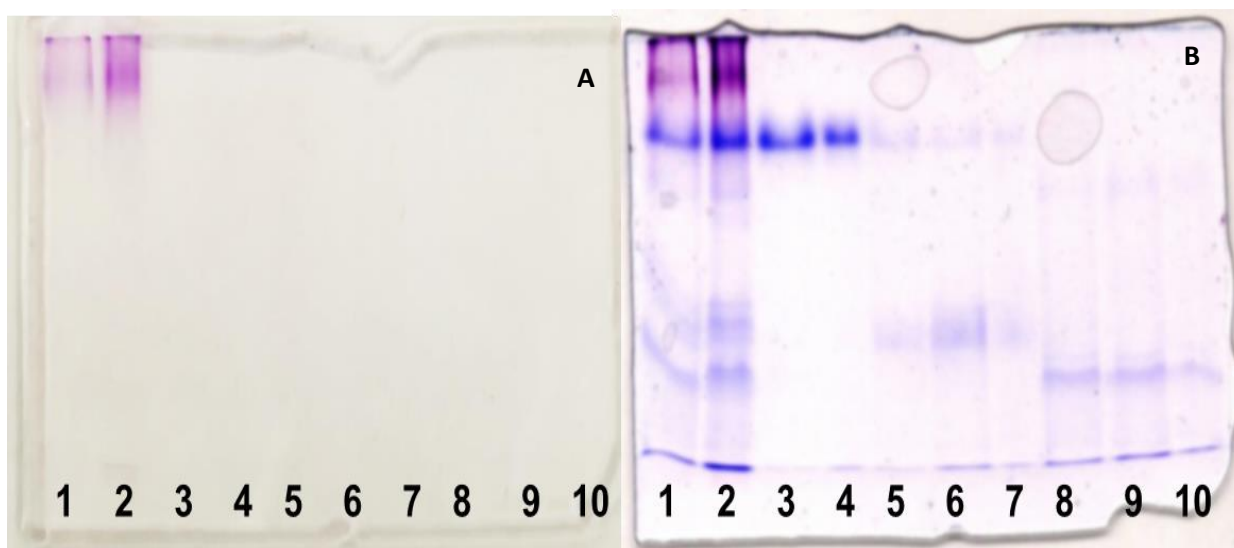


Figura 20. Electroforesis Nativa. **Gel A)** Revelado de Glicoproteinas **Gel B)** Tinción con CBB del mismo gel. Carril 1 y 2: Antiacanthaína; Carril 3 y 4: AntA; Carril 5 a 7: AntB; Carril 8 a 10: AntC,

5.4. Caracterización bioquímica de las proteasas purificadas

5.4.1. pH Óptimo

Se estudió el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las enzimas aisladas, utilizando azocaseína como sustrato. Los resultados se muestran en la figura 21. Lo que se destacó fue que tanto el EC como las enzimas purificadas retienen más del 80% de actividad en un amplio rango de pH (5 a 10). Todas las fracciones purificadas mostraron mayor valor de actividad a pH básicos, siendo AntA, la enzima que presentó a pH más básico (pH 9), el valor más alto de actividad. Las muestras AntB y AntC mostraron la actividad más alta a pH levemente inferior (pH: 8,5), que AntA.

Esto difiere de lo observado en el EC, donde el valor de actividad más alto se obtuvo a pH 6. Solamente AntC presentó un pico de actividad a este pH, pero con un valor de actividad menor al registrado a pH: 8,5.

Esto podría sugerir que los comportamientos individuales de estas enzimas son diferentes de los manifestados cuando estas están formando parte de una mezcla más compleja como es el EC.

Este comportamiento ha sido manifestado en otras enzimas de la familia Bromeliaceae (María Eugenia Errasti et al., 2018) Aún con estos resultados, la alta actividad en un amplio rango de pH hacen muy atractivas a estas enzimas, ya sean purificadas o no.

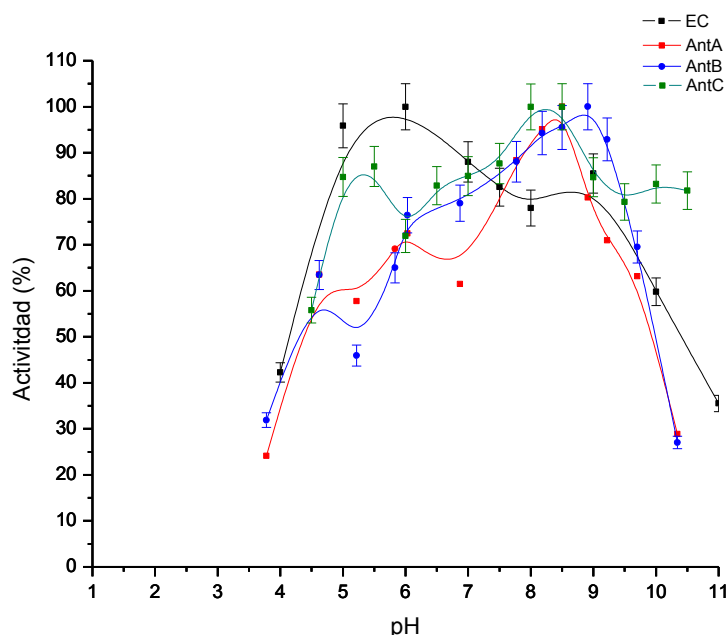


Figura 21 pH óptimos de Extracto Crudo (EC), AntA, AntB y AntC. El gráfico muestra el % actividad proteolítica (utilizando Azocaseína como sustrato) a diferentes pH para EC (línea negra), AntA (línea azul), AntB (línea roja) y AntC (línea verde).

5.4.2. Temperatura óptima

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las fracciones purificadas, utilizando azocaseína como sustrato. Como era esperable para estas macromoléculas, la actividad enzimática aumenta a medida que se aumenta la temperatura (Figura 22). Los máximos de actividad registrados para las distintas enzimas fueron: AntA 70°C, AntB y AntC, 65°C. En todos los casos, la temperatura óptima obtenida fue levemente superior a la del EC, donde el máximo de actividad se registró a 60°C. El valor de actividad es bastante superior en AntA, que dio un valor de actividad 5 veces mayor a la observada a 37°C, observándose para AntB y AntC un incremento de 4 y 3 veces respectivamente sobre la actividad a la temperatura del ensayo estándar. A 80°C, las enzimas purificadas siguen mostrando una actividad residual superior al 100%, mayor que la mostrada en el EC, donde la actividad es menor al 50%.

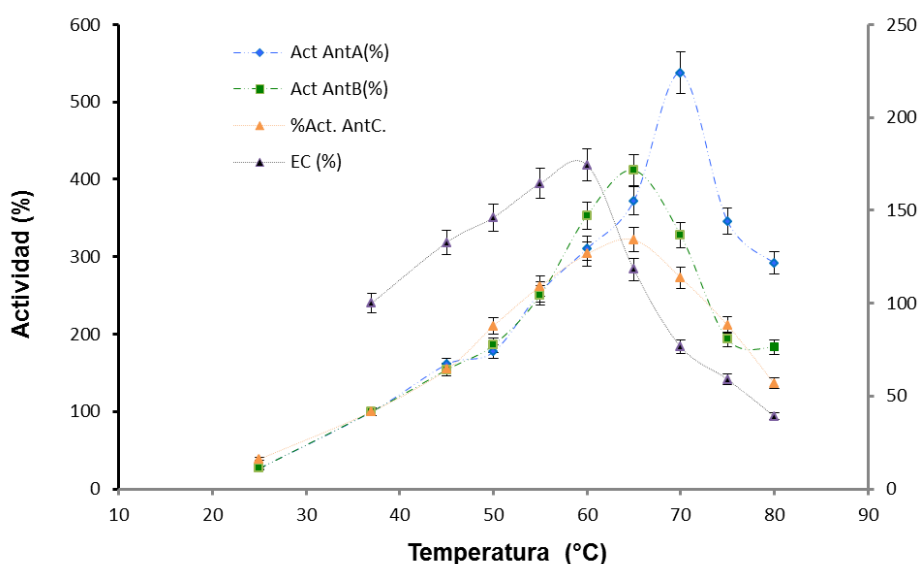


Figura 22. Temperatura óptima: AntA (línea azul), AntB (línea verde) y AntC (línea naranja) (valores de actividad corresponden al eje de la derecha). EC (línea negra, valores corresponden al eje de la izquierda). Sustrato: azocaseína. Se tomó como 100% de actividad la obtenida en el ensayo estándar (37°C)

5.4.3. Efecto de la Urea y el GndHCl

La acción de los agentes desnaturalizantes Urea y Cloruro de Guanidinio sobre la actividad enzimática se muestra en la Figura 23.

La preincubación de AntA con Urea 8 M (conc. final) durante 30, 60 y 1080 min. (18hs) parece no afectar su acción catalítica, manteniendo los mismos valores de actividad que la enzima sin el agregado del agente desnaturalizante, durante el tiempo del ensayo. Con AntB, la acción de la

Urea muestra un marcado efecto activador de la enzima, llegando casi a duplicar la actividad proteolítica respecto a la enzima control, a los 60 min de ensayo. Sin embargo, esta acción tiende a revertirse a tiempos mayores, disminuyendo la actividad 20% respecto a enzima sola luego de 18hs de preincubación.

La acción del GndHCl 6M (conc. final) sobre AntA, preincubados durante 30, 60 y 1080 min, produjo una disminución de un 40% de la actividad enzimática respecto a la muestra control, a los 30 min. A tiempos superiores, no se observaron cambios, manteniendo casi invariable la actividad remanente a 60 y 1080 minutos de incubación. Para AntB, sin embargo, el GndHCl, mostró, al igual que la Urea, un efecto activador, más moderado. A los 30 min de preincubación se manifestó la mayor actividad, 40% superior al de la enzima control. Este efecto activador va disminuyendo a tiempos de incubación superiores, llegando a valores similares al de la enzima control a las 18 horas de preincubación.

Los resultados evidenciaron una gran estabilidad estructural de estas enzimas, fundamentalmente en el sitio activo de las mismas, lo que hace suponer poco o ningún cambio en su distribución espacial en las condiciones estudiadas. Se debería corroborar esta hipótesis con estudios de dicróismo circular (CD) ó estudios de fluorescencia (F).

En el caso de AntB, los cambios en su entorno, parecen favorecen de forma marcada la acción catalítica, viéndose reflejado en el aumento de su actividad.

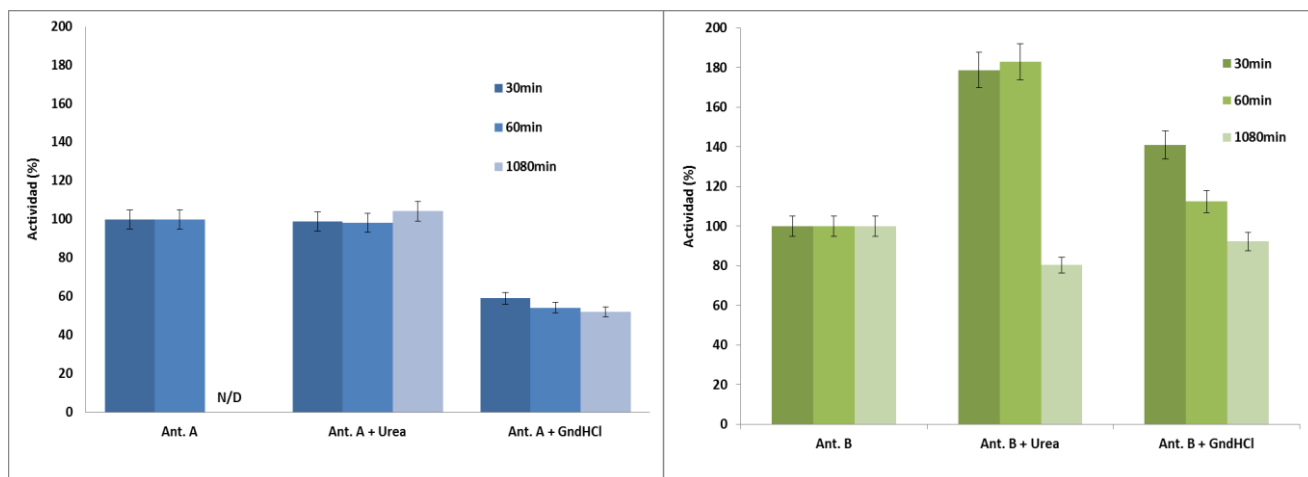


Figura 23. Efecto de los agentes desnaturizantes Urea y Cloruro de Guanidinio sobre la actividad de AntA y AntB. La actividad residual fue determinada utilizando Azocaseína como sustrato (se toma 100% de actividad el valor de actividad de la muestra sin agentes desnaturizantes)

Esta acción, supuestamente antagonista a la esperada, ha demostrado ser una característica común de las proteasas cisteínicas de la familia enzimática C1A (Aleem Sidek et al., 2013; Storer and Ménard, 2013) habiendo sido reportada para proteasas de la familia Bromeliaceae (Ahmad et al., 2009).

5.4.4. Titulación del sitio activo con E-64

Para determinar la concentración de enzima activa de las fracciones purificadas (AntA, AntB y AntC), se realizó la titulación con E-64. Esta molécula, es un inhibidor irreversible de las proteasas cisteínicas. La molécula se sitúa a lo largo del sitio activo, formando un enlace tioéter con el tiol de la cisteína en el sitio activo. De esta forma, cada molécula de inhibidor se une en forma equimolecular y específicamente con la cisteína del sitio activo de las endopeptidasas cisteínicas, permitiendo realizar la titulación de enzima activa (Salvesen and Nagase, 2001) (Apéndice 4).

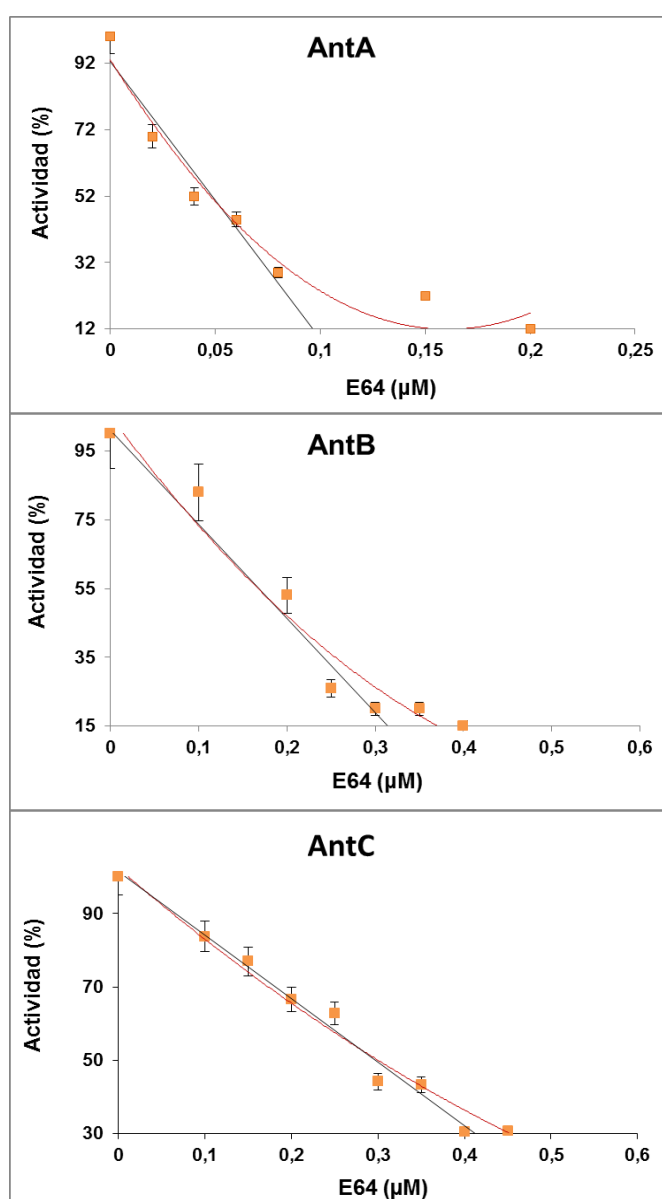


Figura 24. Titulación del sitio activo con E-64. Actividad residual (%) de AntA, AntB y AntC preincubado a distintas concentraciones del inhibidor E64, utilizando azocaseína como sustrato.

Para el ensayo de actividad se utilizó azocaseína como sustrato.

En la figura 24 se muestran los gráficos la actividad azocaseinolítica residual (%) de cada fracción purificada en función de concentraciones crecientes del inhibidor.

A partir de los valores de concentración de E-64, para los cuales la actividad enzimática es la menor o se hace nula (corte en el eje de las abscisas), se calcularon los porcentajes de enzima activa. Para AntA, la intersección con el eje de las abscisas dio una concentración del inhibidor de 0,0645 μM . Para AntB, de 0,1972 μM para AntC, de 0,58 μM .

Estos valores indicaron que del total de proteínas de AntA, un 88 % se mantiene activa. Para AntB, la titulación mostró que un 86% de las moléculas estaban activas y para AntC sólo un 40% de moléculas permanecieron activas.

Lo que se observó para las tres enzimas es que el E-64 no logró inhibirlas completamente. En todos los casos se conservó una actividad residual del 15 al 30%, hecho que podría relacionarse con una diferente geometría del sitio activo, de acuerdo a lo propuesto por Ritonja y colaboradores (Ritonja et al., 1989) para bromelaína de tallo. Estos resultados fueron posteriormente utilizados para determinar la concentración de enzima activa en los ensayos cinéticos.

5.5. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas aisladas y de la bromelaína de tallo (utilizada como enzima de referencia) con dos sustratos sintéticos: PFLNA (sustrato específico de las cisteín proteinasas) y con z-L-Lys-ONp (sustrato específico de la familia bromeliaceae).

A partir de la medida de las velocidades iniciales (V_0) de la reacción de hidrólisis para diferentes concentraciones de PFLNA y z-L-Lys-ONp y utilizando el programa OriginLab v8.0 se realizaron los cálculos de regresión no lineal, de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten, obteniéndose las constantes cinéticas de ambas enzimas para los dos sustratos ensayados. Se realizaron en paralelo los mismos ensayos para la bromelaína de tallo, enzima referencia de la familia botánica de las enzimas purificadas.

5.5.1. PFLNA

Las tres peptidasas purificadas mostraron comportamientos diferentes frente al sustrato PFLNA. El ensayo enzimático, utilizando AntB, dio una actividad de $64 \times 10^{-3} \text{ U}_{\text{PFLNA}}/\text{mL}_{\text{preparado enzimático}}$, siendo el que mostró la mayor actividad. AntA, dio una actividad de $4,98 \times 10^{-3} \text{ U}_{\text{PFLNA}}/\text{mL}$ de enzima, y AntC, mostró una actividad similar, $4,98 \times 10^{-3} \text{ U}_{\text{PFLNA}}/\text{mL}$ de enzima.

En la figura 25 se observan los valores medidos de la velocidad inicial de hidrólisis (para AntA, AntB, AntC y Bromelaína) a diferentes concentraciones de PFLNA. En el gráfico interno se

observa la linealización utilizando los valores de dobles recíprocos (o Lineweaver Burk) $1/V_0$ vs. $1/[PFLNA]$. Todos los resultados fueron promedio de tres reacciones. En los tres gráficos se pudo observar un comportamiento cinético de Michaelis-Menten, permitiendo calcular los valores de V_{max} y K_m con cada una de las enzimas ensayadas.

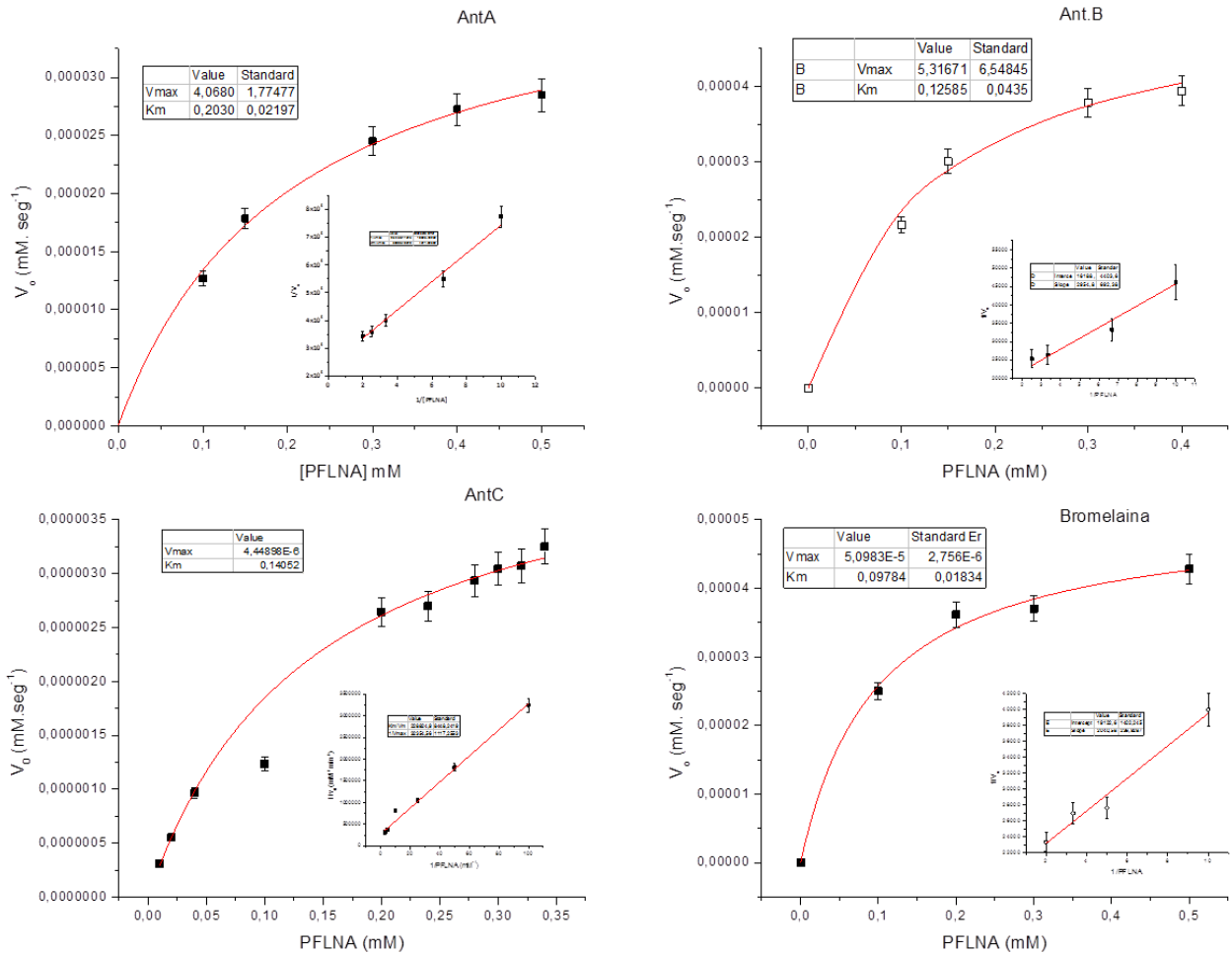


Figura 25. Representación de la velocidad inicial de la hidrólisis del PFLNA a diferentes concentraciones.. (Grafico interno: linealización por dobles recíprocos)

Ajustando los valores de concentración de las enzimas AntA, AntB y AntC, obtenidos por titulación con E-64, se estableció que en el medio de reacción la concentración efectiva de las enzimas en estado activo fueron de 0,87, 0,91 y 0,60 nM respectivamente. A partir de estas concentraciones se calcularon las constantes catalíticas (k_{cat}) y la eficiencia (k_{cat}/K_m).

De los estudios cinéticos realizados con PFLNA se observó una mayor afinidad de la AntB ($K_m=0,126\text{mM}$) que AntA ($K_m = 0,203\text{mM}$) y AntC ($K_m = 0,140\text{mM}$).

Sin embargo la eficiencia catalítica fue superior para AntC ($k_{cat}/K_m = 900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), respecto a la calculada para AntA y AntB ($k_{cat}/K_m = 470 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $87 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) El comportamiento general de las enzimas fue similar al de Bromelaína (Tabla 7).

Tabla. 7. Parámetros cinéticos de AntA, AntB y Bromelaína con los sustratos PFLNA y z-L-Lys-ONp.

| Cinética utilizando el sustrato PFLNA | | | |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------|--|
| Enzima | K_m (mM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) |
| AntA | $0.203 \pm 0,010$ | $0.095 \pm 0,004$ | 470 |
| AntB | $0.126 \pm 0,006$ | $0.011 \pm 0,000$ | 87 |
| AntC | $0.140 \pm 0,007$ | $0.126 \pm 0,006$ | 900 |
| Bromelaina | $0.098 \pm 0,005$ | $0,029 \pm 0,001$ | 305 |

5.5.2. z-L-Lys-ONp

De las tres peptidasas purificadas, solamente AntA y AntB hidrolizaron al sustrato z-L-Lys-ONp, La actividad mostrada por la acción de AntA, fue similar a la de AntB ($4,34 \text{ U}_{z\text{-L-Lys-ONp}}$ y $5,22 \text{ U}_{z\text{-L-Lys-ONp}}$ por mL de preparado respectivamente)

Este sustrato fue seleccionado por ser específico para Bromelaína de tallo (Silverstein, 1974).

En la figura 26 se observan los valores medidos de la velocidad inicial de hidrólisis (para AntA, AntB y Bromelaína) a diferentes concentraciones de z-L-Lys-ONp. En el gráfico interno se observa la linealización utilizando los valores de dobles recíprocos (o Lineweaver Burk) $1/V_0$ vs. $1/[z\text{-L-Lys-ONp}]$. Todos los resultados fueron promedio de tres reacciones.

Los estudios cinéticos utilizando como sustrato z-L-Lys-ONp, mostraron para la AntA menor afinidad que para AntB ($K_m=0,863 \text{ mM}$, $K_m=0,655 \text{ mM}$ respectivamente) pero una mayor eficiencia catalítica ($k_{cat}/K_m= 6376 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m= 3053 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ambas enzimas presentaron un mejor desempeño que Bromelaína ($K_m= 0,36 \text{ mM}$, $k_{cat}/K_m= 688 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Tabla 8). Este sustrato no fue hidrolizado por AntC, demostrando que los arreglos estructurales alrededor del sitio activo de estas enzimas son diferentes.

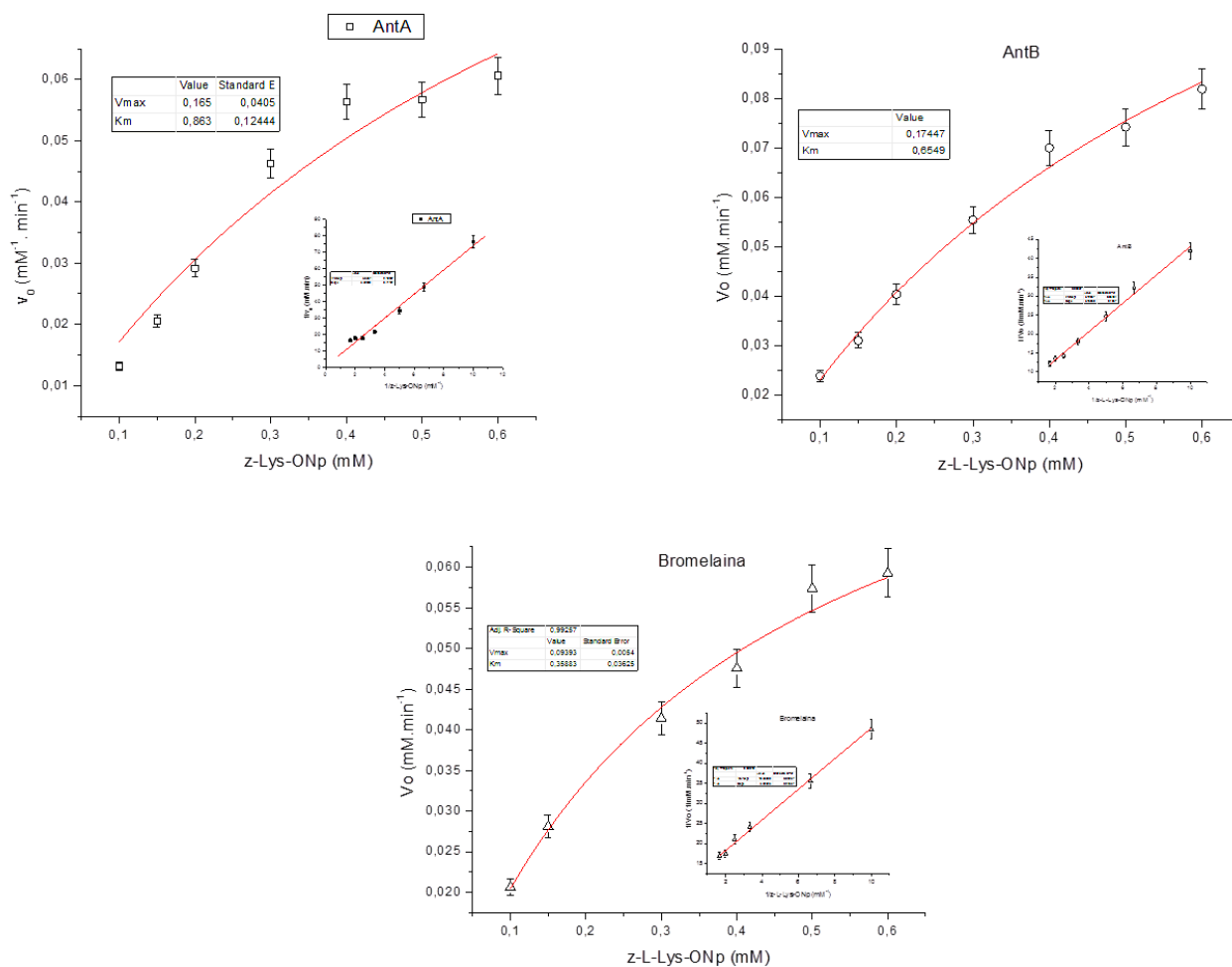


Figura 26.. Representación de la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática del z-L-Lys-ONp a diferentes concentraciones.(Gráfico interno: linealización de dobles recíprocos),

Tabla. 8. Parámetros cinéticos de AntA, AntB y Bromelaina con los sustratos PFLNA y z-L-Lys-ONp

| Cinética utilizando el sustrato z-L-Lys-ONp | | | |
|---|-----------------|------------------------|-----------------------------------|
| Enzima | K_m (mM) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$) |
| AntA | $0.86 \pm 0,04$ | $5,81 \pm 0,29$ | 6376 |
| AntB | $0.65 \pm 0,03$ | $2,00 \pm 0,10$ | 3053 |
| AntC | - | - | - |
| Bromelaina | $0.36 \pm 0,02$ | $0,25 \pm 0,01$ | 688 |

5.6. Especificidad de hidrólisis de la cadena β de la insulina

La cadena β (oxidada y carbamidometilada) de insulina es comúnmente utilizada como el sustrato de elección para la exploración de la especificidad de hidrólisis de nuevas proteasas. La secuencia de esta proteína contiene una variedad de enlaces peptídicos y una estructura desplegada que permiten un buen acceso a los mismos. La identificación de los fragmentos generados, por espectrometría de masas, permite determinar la especificidad de corte de la enzima en estudio.

5.6.1. Obtención del Sustrato

Las cadenas α y β modificadas (residuos de Cys reducidos y carbamidometilados) de la insulina, fueron separadas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

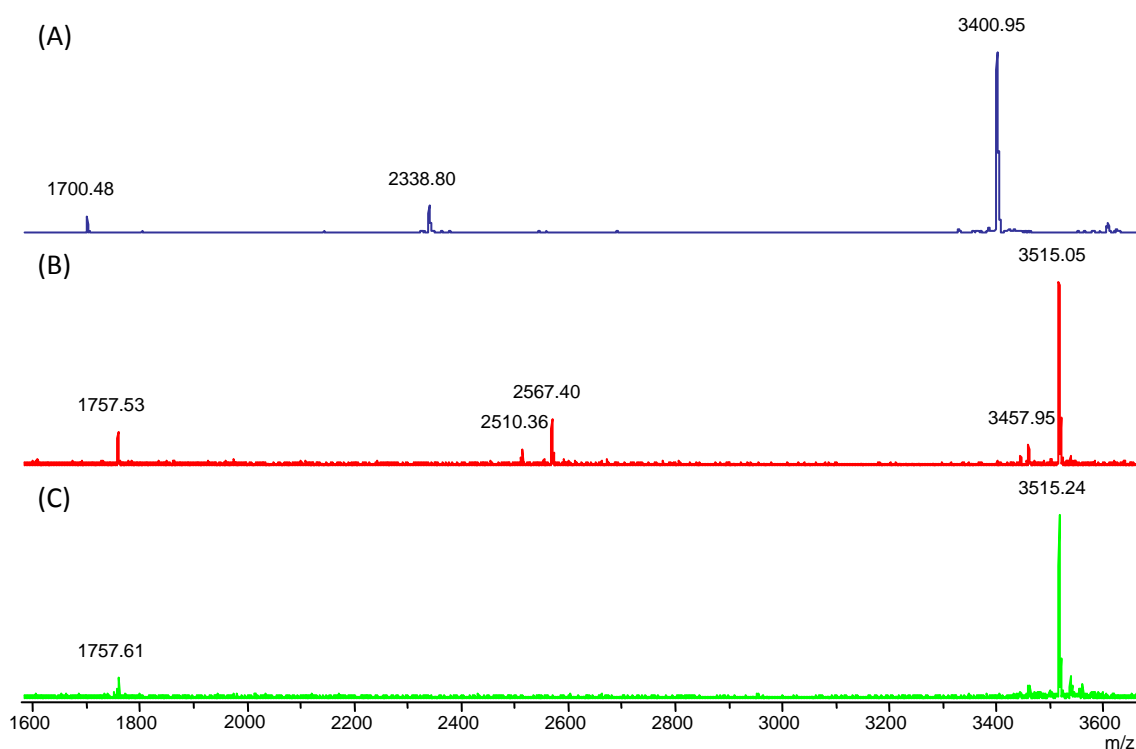


Figura 27. Espectros de MALDI-TOF MS en el proceso de obtención de la cadena β de la insulina para ser utilizado como sustrato en el ensayo de especificidad de corte. La Figura A corresponde al espectro de la muestra luego de haber sido tratada durante 2 h a 40 °C con DTT (reducción). La Figura B corresponde al espectro de la muestra luego de haber sido tratada durante 2 h a 40 °C con iodoacetamida (carbamidometilación). La Figura C corresponde al espectro de la cadena β de la insulina purificada luego de los procesos de reducción y carbamidometilación por HPLC de fase reversa. Para la determinación de las masas de los picos se utilizó una mezcla de calibradores peptídicos, (Bruker Daltonics, Germany). Las muestras fueron cristalizadas sobre una placa MP 384 Ground Steel, utilizando una matriz de HCCA.

En la figura 27 se observan los espectros de masas que muestran los productos obtenidos en cada una de las etapas del proceso. En la parte A se observa el espectro de la muestra luego del tratamiento de reducción. La reducción total de los residuos de Cys se confirmó por la detección de iones de masas 3400,95 y 2338,80 Da (correspondientes a las cadenas α y β de la insulina reducida, respectivamente). El pico de masa 1700,48 Da corresponde al ión M+2 de la cadena β reducida de la insulina. Habiéndose confirmado la reducción total de la insulina presente en la muestra se procedió a la carbamidometilación de la misma. El intercambio del H por el grupo CH₂CONH₂ (carbamidometilo) en un residuo de Cys produce un incremento de masa de 57 Da. La figura 27 B corresponde al espectro de la muestra luego del proceso de carbamidometilación. Se observó la aparición de iones de masas 3515,05 y 2567,40 Da, que se corresponden con la carbamidometilación total de los residuos de Cys presentes en las cadenas β y α , respectivamente. También se pueden observar iones con valores de masas pertenecientes a especies iónicas que evidencian una reacción de carbamidometilación incompleta. El pico de masa 1757,53 Da corresponde al ión M+2 de la cadena β de la insulina completamente carbamidometilada.

La cadena β de la insulina completamente carbamidometilada y purificada de la mezcla de reacción por HPLC en fase reversa, que es el sustrato a hidrolizar por las enzimas en estudio, presenta un espectro que se muestra en la figura 27 C.

5.6.2. Hidrólisis de la Cadena β de la Insulina con Antiacanthaína, AntA, AntB, AntC y Papaína

La determinación de la especificidad de corte (aminoácidos que acomoda la enzima es su sitio activo) de las enzimas purificadas (AntA, B y C), Antiacanthaína y papaína (enzima de referencia), se obtuvo de la identificación de los péptidos generados por la hidrólisis de la cadena beta (reducida y carbamidometilada) de la insulina.

Los procesos de hidrólisis estudiados se realizaron durante: 5, 15, 60, y 120 min y 16 hs) a 37°C de acuerdo a lo descrito en Proc. Exp. 16.3.1. En las Figuras 28, 29 y 30 se muestran los patrones de digestión obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS/MS.

Tanto para Papaína, Antiacanthaína como para las enzimas purificadas, a medida que avanzó la reacción el patrón de hidrólisis se hizo más complejo debido al aumento del número de péptidos generados. La complejidad de estos espectros se debió a que los productos obtenidos al inicio de la reacción pasaron a ser nuevos sustratos de la enzima conforme la reacción avanzó. En los primeros estadios del proceso proteolítico, la mayoría de los picos del espectro se ubicó en el intervalo de 1000 a 2500 Da y cadena β sin hidrolizar.

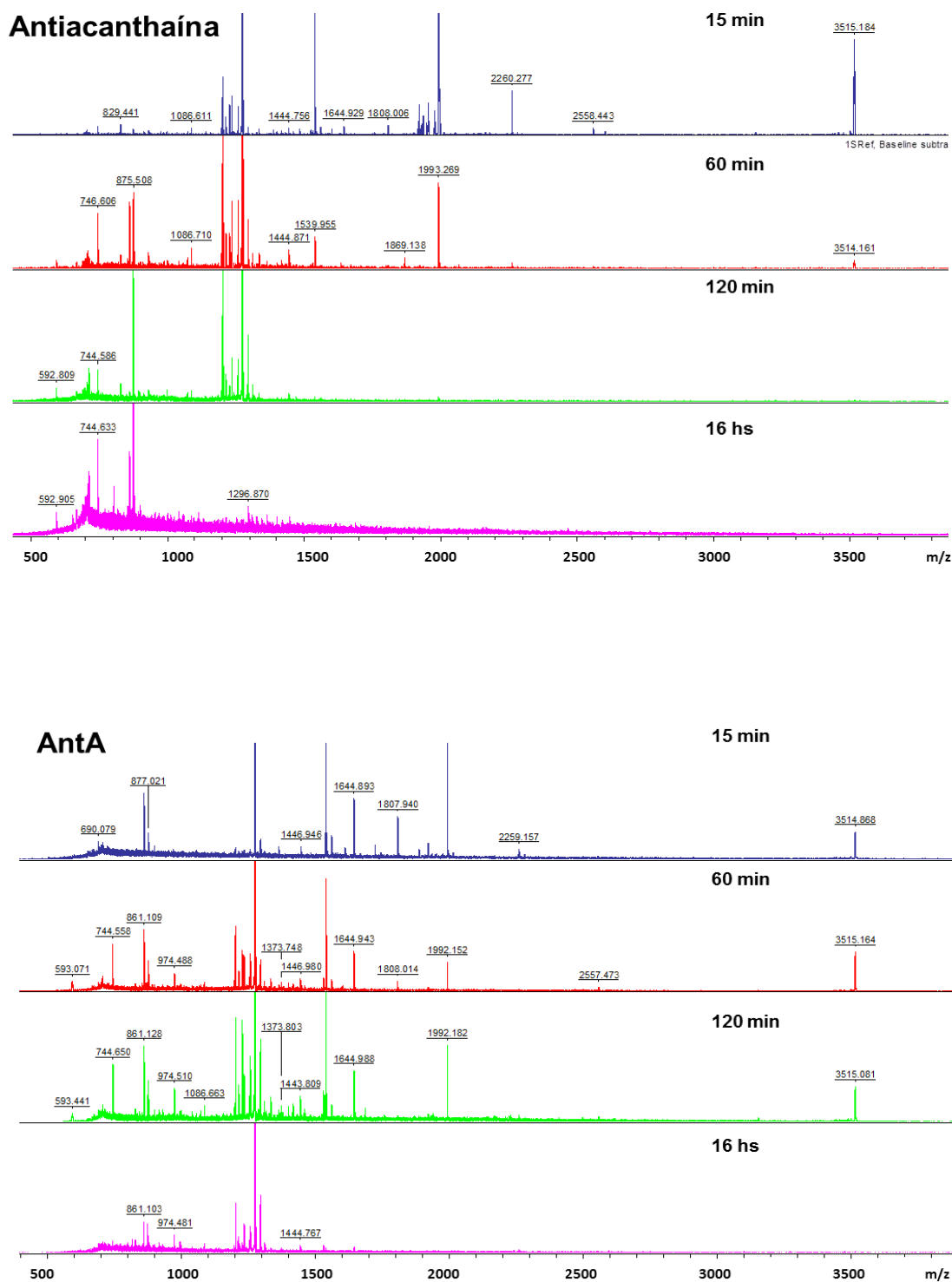


Figura 28. Espectros de Maldi-TOF MS correspondiente a los productos de hidrólisis de la cadena β de la insulina por acción de Antiacanthaína (gráfico superior) y AntA (gráfico inferior) a 15, 60, 120 min y a 16hs de incubación.

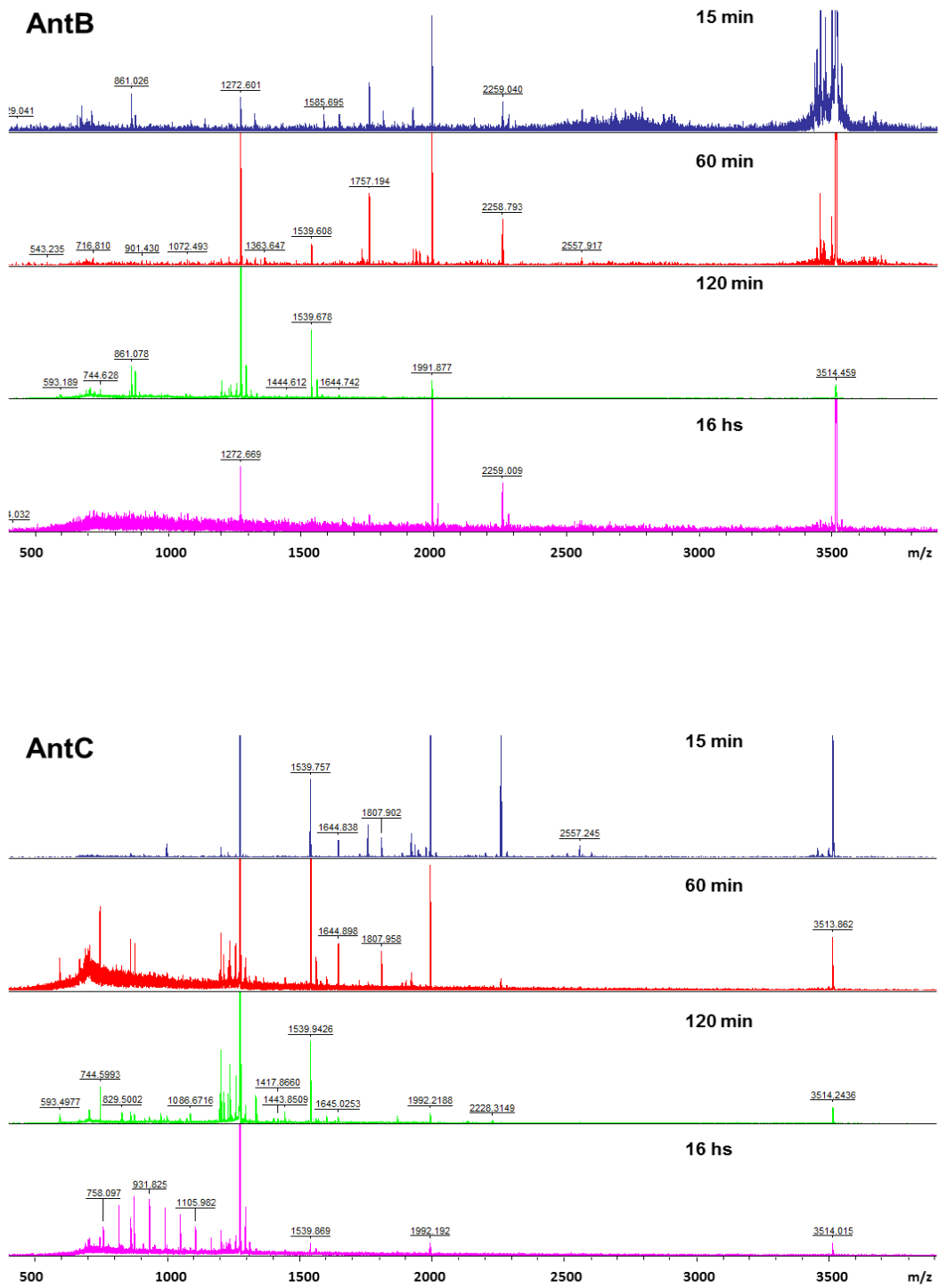


Figura 29. Espectros de Maldi-TOF MS correspondiente a los productos de hidrólisis de la cadena β de la insulina por acción de AntB (gráfico superior) y AntC (gráfico inferior) a 15, 60, 120 min y a 16hs de incubación.

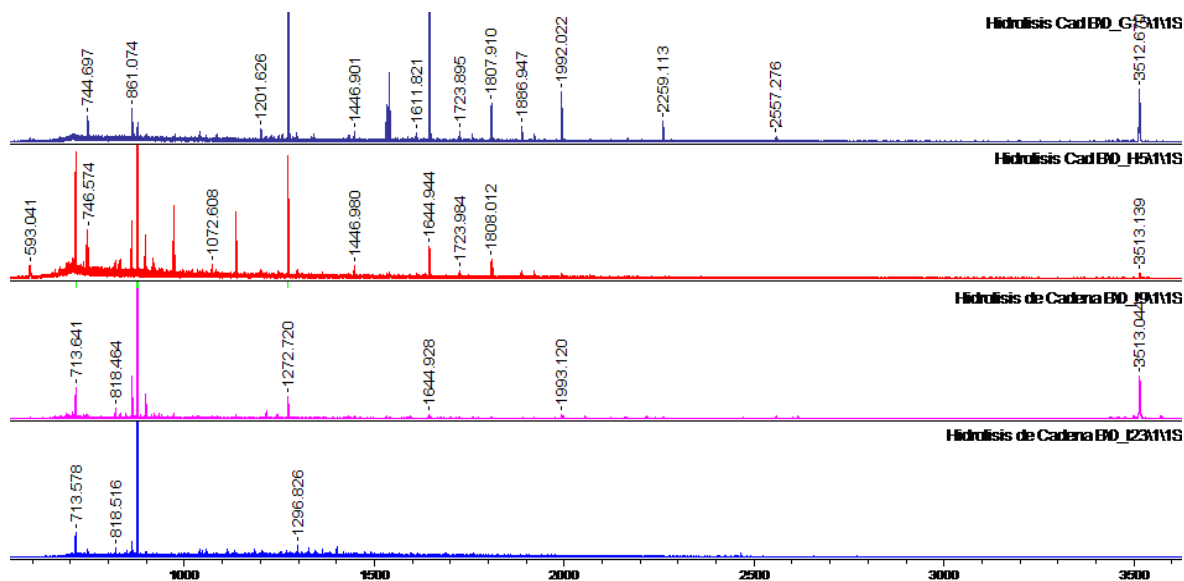


Figura 30. Espectros de MALDI-TOF MS correspondiente a los productos de hidrólisis de la cadena β de la insulina por acción de Papaína

Sin embargo, al observar los espectros a tiempos superiores vemos que el patrón de hidrólisis ha cambiado en forma apreciable, los picos que anteriormente eran minoritarios (por debajo de 1300) pasaron a ser ahora los predominantes y los que se encontraban en el intervalo de 1500 a 2000 disminuyeron sustancialmente su intensidad en el espectro y el sustrato desaparece completamente.

Para establecer los sitios de corte de AntA, AntB, AntC, Antiacanthaína y Papaína sobre la cadena β de la insulina se utilizó el programa GPMW v6.0 que permitió relacionar las secuencias aminoacídicas con las masas de los picos presentes en los espectros de la digestión a los distintos tiempos estudiados.

A los 15 min de reacción y para AntA, AntB y AntC, se identificaron ocho puntos de corte sobre el sustrato, de los cuales 5 para AntA, y 3 para AntB y AntC, se localizan en la región central de la cadena polipeptídica, rica en residuos hidrofóbicos (A, V, P, L y Y). Los tres restantes se ubican en los extremos de la cadena, dos de ellos con un entorno hidrofóbico. A tiempos de hidrólisis más alto, se identificaron nuevos sitios de corte localizados en la región central hidrofóbica de la molécula del sustrato (excepto para AntB que presenta sitios de corte a lo largo de la cadena polipeptídica).

Antiacanthaína, ya a los 15 minutos de reacción, mostró un alto grado de hidrólisis de la cadena β (>20 sitios de corte), la mayoría también adyacentes a entornos hidrofóbicos, confirmación de la

complejidad de la muestra y su potencialidad hidrolítica. A tiempos más largos, se identificaron muy pocos sitios de corte más, y en general muy pocos péptidos, evidenciado una hidrólisis casi total de la cadena β de la insulina.

En la figura 31, se indican el total de los sitios de corte de la cadena β de la insulina con las diferentes fracciones enzimáticas luego de las 16 hs de hidrólisis.

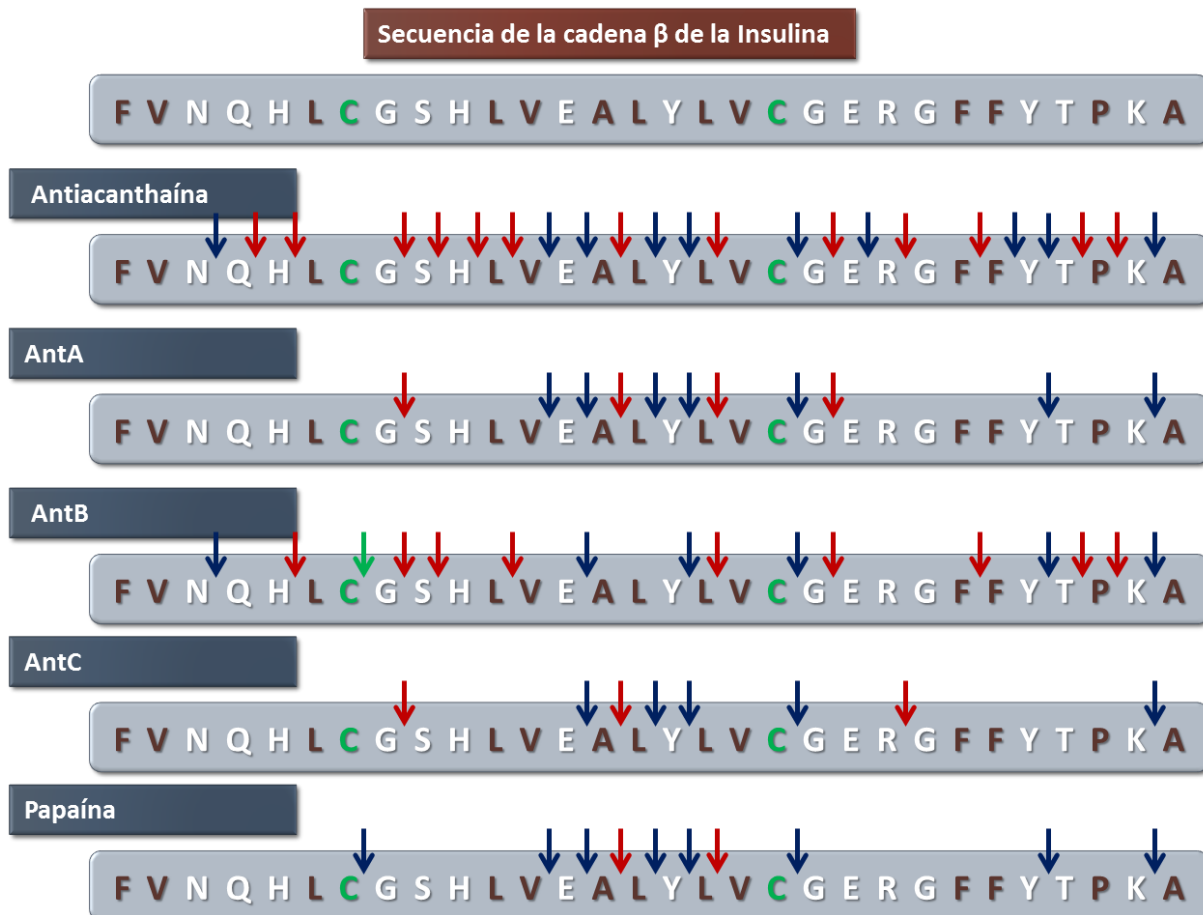


Figura 31. Determinación de los sitios de corte de Antiacanthaína, AntA, AntB, AntC y Papaína sobre la cadena β de la insulina a partir de los espectros de MALDI-TOF MS. Los residuos resaltados en marrón corresponden a residuos hidrofóbicos y voluminosos. Las flechas indican los sitios donde se produjo la hidrólisis de la cadena β de la insulina que resultaron de la suma de todos los tiempos de digestión. Cada flecha representa el sitio entre P1 Y P'1 de cada escisión. Las flechas de color azul corresponden a los cortes en los que además el residuo P2 resultó ser un residuo hidrofóbico.

A lo largo del proceso de hidrólisis, se identificaron para AntA 11 sitios de corte, de los cuales 8 coinciden con los sitios reconocidos por AntB y 7 son coincidentes con los de AntC. Para AntB se identificaron 16 sitios de corte 5 más que AntA, de los cuales uno (identificado con flecha de color naranja en Figura 31), ubicado entre los residuos de cisteína ocupando la posición P1 y glicina ocupando la posición P'1 (residuos 7 y 8 de la cadena β), fue identificado exclusivamente

en esta fracción enzimática. Este sitio no fue identificado en la hidrólisis con Antiacanthaína; que es el preparado que contiene a las tres enzimas. Esto pudo deberse a que a los tiempos en que se tomaron las muestras, las fracciones que contenían los aminoácidos de este sitio hayan sido rápidamente degradadas. Este sitio sí fue identificado en la hidrólisis de la cadena β con papaína. La hidrólisis con AntC, mostró el menor número de sitios de corte, casi todos reconocidos también por las otras dos enzimas.

En todos los casos, la predominancia en el sitio de corte parece estar gobernada por el acomodamiento de residuos aminoácidos hidrofóbicos del sustrato en la posición P2 de las enzimas, característica de las enzimas pertenecientes a la familia C1A, de la cual la papaína es la enzima de referencia (Rawlings and Barrett, 2013). Sin embargo la variación en la cantidad de sitios de corte mostrado por cada enzima, estaría indicando el reconocimiento diferencial del sustrato en su sitio activo. Estos resultados muestran una vez más que, a pesar de la gran similitud funcional de las enzimas purificadas, los procesos hidrolíticos varían dependiendo del sustrato utilizado. Sutiles variaciones posiblemente en su estructura dan como resultados cambios en su interacción con el sustrato y la forma en cómo actúa sobre él.

6. DETERMINACION DE LA SECUENCIA PARCIAL DE AntA, AntB Y AntC

6.1. Secuencia N-terminal

Por método de secuenciación por degradación de EDMAN, se obtuvo la secuencia N-terminal de las enzimas purificadas.

La secuencia de los primeros 14 residuos N-terminales de Antiacanthaína A y Antiacanthaína B resultó ser exactamente la misma, hecho que no llama la atención ya que los resultados hasta ahora obtenidos daría a pensar que son isoenzimas y esta región suele ser muy conservada para las proteasas de la familia Bromeliaceae.

La búsqueda de similitud de secuencia se realizó con el programa BLAST (Altschul et al., 1997) disponible en internet. En la tabla 9 se muestra la comparación de la secuencias N-terminal de de AntA y AntB con secuencias N-terminal de otras proteasas cisteínicas de la misma familia botánica.

Tabla 9. Identidad de secuencia del N-terminal de la AntA y AntB con proteasas de la familia *Bromeliaceae*. (Resultados obtenidos de la búsqueda en Blast)

| Material vegetal | Secuencia | Identidad (%) | Referencia |
|----------------------------|------------------|---------------|---------------------------------|
| <i>Antiacanthaína A/B</i> | AVPESIDWR -YGAVT | 14/14 (100%) | |
| <i>Bromelia hieronymi</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 13/15 (86%) | (Bruno et al., 2008) |
| <i>Fastuosaina</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 13/15 (86%) | (Cabral et al., 2006) |
| <i>Bromelaina de tallo</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 13/15 (86%) | (Ritonja et al., 1989) |
| <i>Comosaina</i> | VPQSIDWRNYGAVT | 12/14 (85%) | (Napper et al., 2015) |
| <i>Macrodongaína-2</i> | VPQSIDWRNYGAVT | 12/14 (85%) | (López et al., 2001) |
| <i>Macrodongaína-1</i> | AVPQSIDWRDYGAVN | 12/15 (80%) | (María E. Errasti et al., 2018) |
| <i>Bromelaina</i> | AVGQSIDWRDYGAVT | 12/15 (80%) | (Harrach et al., 1995) |
| <i>Ananaína</i> | VPQSIDWRDSGAVT | 11/14 (78%) | (Lee et al., 1997) |

La secuencia N-terminal de AntA y B exhibe más de un 80% de identidad con proteasas de la familia Bromeliaceae. Los porcentajes de identidad más notorios se observaron con Bromelaina de tallo, Fastuosaina, Bromelia hieronymi (todas con un 86% de identidad de secuencia) y en menor medida (85%) con Comosaina, Macrodongaína 2, Macrodongaína 1 y ananaína, todas ellas de la misma familia botánica.

Otro dato observado fue el elevado grado de conservación que presentan algunos residuos de los extremos N-terminal de 65 secuencias analizadas (Tabla 10) (Apéndice 5). El motivo Asp-Trp-Arg (DWR) (residuo 7-9, de acuerdo a la numeración de Antiacanthaína A y B) está presente en la casi totalidad de las cisteín peptidasas analizadas (64 de las 65 analizadas). El motivo Gly-Ala-Val (GAV) (11-13, en AntA y B) esta presente en 57 de las secuencia analizadas, siendo de destacar que en la mayoría de los casos Ala (A) es reemplazada por Ile (I). En muchos casos (45 de 65) Thr (T) es el aminoácido que sigue a Val (motivo GAVT, posición 11-14 de la numeración de Antiacanthaína A). Otro hecho notorio es la conservación de un residuo de Pro (P) en la posición 2 de AntA y B (3 de la numeración de papaína), presente en todas las proteasas analizadas (65/65), cuya función sería la de prevenir la proteólisis del extremo amino por acción de aminopeptidasas, ya que las uniones Xaa-Pro son inaccesibles para este tipo de enzimas (Rawlings and Barrett, 2013). En el caso de Antiacanthaína A y B, la Pro (P) es precedida por Val (V) y lo propio ocurre en las endopeptidasas que muestran un grado de identidad superior al 80% (VP, 9/10). Si bien en la mayoría de los casos el aminoácido que precede a Pro (P) es Leu (L), otro aminoácido no polar (LP, 36/65). Casi en la mitad de los casos Pro es seguida de Glu (PE, 30/65), aunque en algunas

de las proteasas de la familia de las Bromeliaceae, Glu está reemplazado por su derivado aminado Gln (Q), lo que podría obedecer a una modificación post-traducciona.

Tabla 10. Grado de conservación que presentan algunos motivos de los extremos N-terminales analizados en la Tabla 2.

| Motivo/ Residuo | Frecuencia | Motivo | Frecuencia |
|--------------------|------------|--------|------------|
| P | 65/65 | LP | 36/65 |
| DWR | 64/65 | PE | 30/65 |
| GAV | 57/65 | IDWR | 22/65 |
| SCW | 51/65 | SIDWR | 21/65 |
| GAVT | 45/65 | VP | 18/65 |

6.2. Obtención de secuencias parciales por digestión triptica (mapeo de huella peptídica)

Para ampliar la información de las secuencias de las enzimas purificadas y obtener en mayor grado, detalles de las similitudes y diferencias entre ellas, se realizó la hidrólisis de estas enzimas con Tripsina. La mezcla de péptidos obtenidos fue resuelta por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS/MS) obteniéndose lo que se conoce como “mapeo de huella peptídica” (peptide mass fingerprint, PMF).

Las electroforesis 2D de AntA, AntB, AntC mostraron más de un spot por muestra (Figura 32). Esto ya ha sido evidenciado en varios estudios anteriores y podría deberse a que no serían una única enzima sino que, con características estructurales y de carga superficial indiferenciable, coexisten una población levemente heterogénea. En este caso en particular el proceso de desnaturalización, provocado por la urea contenida en el buffer de muestra, pudo haber hecho que estas diferencias se hiciesen más evidentes y se observaran diferentes puntos isoeléctricos correspondientes a estructuras desplegadas, manteniendo el mismo tamaño molecular (PM). También se pudieron observar spot de tamaños moleculares menores, posiblemente producto de autólisis.

Se seleccionaron varios de estos spot de proteínas y se realizó la hidrólisis con Tripsina. La mezcla de péptidos obtenidos se resolvió por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS/MS) obteniéndose lo que se conoce como “mapeo de huella peptídica” (peptide mass fingerprint).

Los fragmentos de estos espectros se analizaron utilizando el motor de búsqueda Mascot Server, base de datos que permite identificar secuencias a partir de la masa molecular de los mismos.

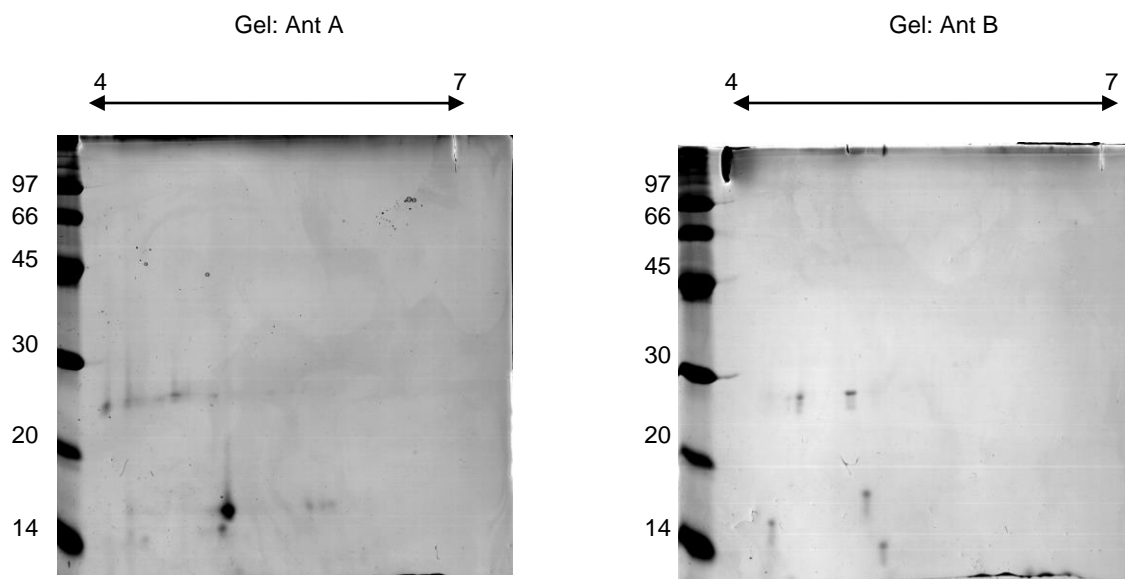


Figura 32. Electroforesis desnaturalizante 2D de AntA y AntB

Estos datos permitieron identificar otras secuencias (incluida la del N-terminal) y obtener información valiosa para el desarrollo del trabajo de biología molecular.

Tabla 11. Masa molecular y secuencia obtenida por mapeo de Huella Peptídica "Fingerprint" (Los resultados corresponden a secuencias que fueron identificadas en ambas muestras, tanto para AntA como para AntB).

| m/z | Secuencia | Ubicación (en secuencias de referencia) | Origen de secuencia de referencia |
|--------|--------------------|---|---|
| 1071,5 | AVPQSIDWR | N-terminal | Bromelaína de tallo, Fastuosáina y Bromelia hieronymi |
| 1088,5 | NNVNHETF | Secuencia interna región Pro | Bromelaína de tallo, Fastuosáina |
| 1165,4 | NSWGTSWGER | Secuencia interna | Bromelaína de tallo, Fastuosáina y Bromelia hieronymi |
| 1991,9 | AVPQSIDWRDYGAVTSVK | N-terminal extendido | Bromelaína, Fastuosáina, Bromelia hieronymi |

Se identificaron varias secuencias internas que son coincidentes con secuencias internas de Bromelaína de tallo, Fastuosáina y Hieronimaína (Tabla 11), lo que reafirma la identidad de las peptidasas purificadas y permitió con estos datos diseñar cebadores específicos para el desarrollo del trabajo en biología molecular.

6.3. Regiones identificadas en la secuencia PRO de Fastuosaína por mapeo peptídico de la digestión trípica de AntA, AntB y AntC

Las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de la masa de los fragmentos de la digestión trípica de AntA, AntB y AntC, fueron alineados con la secuencia de fastuosaína (secuencia que incluye región pro-enzima), peptidasa utilizada como referencia dado su alto porcentaje de homología. En la figura 33 se muestra el resultado del alineamiento

Las secuencias aminoacídicas identificadas de los fragmentos de AntA fueron coincidentes con el 62% de la secuencia Pro-fastuosaína. Las secuencias identificadas de los fragmentos de digestión de AntB fueron coincidentes con el 66% de la secuencia Pro-fastuosaína. Para AntC, los fragmentos de la digestión trípica permitieron identificar secuencias aminoacídicas que se correspondieron con el 4% de la de Pro-fastuosaína.

| | | | |
|-----------|--|----------------------------|--------------------------------------|
| Pro-Fast. | EPSDPMMERFEEWMAEYGRVYNDNAEKMRRFQIFKNNVNH IETFNNRSGNSYTLGVNQFTDMTNNEFLAR | | |
| AntA | FEEWMAEY | RVYNDNAEK | NNVNH IETFNNRSGN YTLGVNQFTDMTNNEFLAR |
| AntB | GRVYNDNAEK | NNVNH IETFNN | YTLGVNQFTDMTNNEFLAR |
| AntC | | | |
| Pro-Fast. | YTGASLPLNIERDPVVSFDDVDISAVPQSIDWRDYGAVTSVKNQSGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNL | | |
| AntA | | AVPQSIDWRDYGAVTSVK | AGNL |
| AntB | | AVPQSIDWRDYGAVTSVK | NQSGSCWAFSAIATVEGIY |
| AntC | | AVPQSIDWR | |
| Pro-Fast. | ISLSEQEVLDCALSYGCDGGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSN | | |
| AntA | ISLSEQEVLDCALSYGCDGGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYK | GYKGPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSN | |
| AntB | EVLDCALSYGCDGGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYK | GPCNHNDLPNKAYITGYTYVQSN | |
| AntC | | | |
| Pro-Fast. | NERSMMIAVANQPIAALIDAGGDFQYYKSGVFTGSCGTSLNHAI TVIGYGQTSSGTTYKWI VKN SWGTSWG | | |
| AntA | NERSMMIAVANQPIAALIDAGGDFQYYK | | |
| AntB | NERSMMIAVANQPIAALIDAGGDFQYYK | | NSWGTSWG |
| AntC | | | YWIVKNSWGTSWG |
| Pro-Fast. | ERGYIRMARDVSSPYGLCGIAMA PLFPTLQSGANA EVIKMISES | | |
| AntA | MARDVSSPYGLCGIAMA | PLFPTLQSGAN | |
| AntB | ER | MARDVSSPYGLCGIAMA | FPTLQSGANA EVIKMISES |
| AntC | ER | | |

Figura 33. Secuencias obtenidas por Fingerprinting de los spot de AntA, AntB y AntC identificadas en la secuencia pro de la Fastuosaína (*Bromelia fastuosa* Lindt.). Marcado en color azul, se muestran secuencias de AntA, AntB y AntC coincidentes con la de Pro-fastuosaína y que fueron identificadas en al menos dos de las peptidasas purificadas. En color rojo, se muestran las secuencias aminoacídicas coincidentes con fastuosaína que fueron identificadas a partir de los fragmentos de la digestión con tripsina en una sola de las peptidasas.

Estos resultados muestran nuevamente el alto porcentaje de identidad de secuencia de presentan estas peptidasas entre sí y con las peptidasas de la misma familia botánica.

También la obtención de fragmentos únicos, podría estar indicando las características diferenciales entre AntA, AntB y AntC.

7. CLONADO Y SECUENCIACIÓN DEL ADNc DE UNA PEPTIDASA DE *Bromelia antiacantha*

Para la obtención de clones de la/s peptidasas de *Bromelia antiacantha*, se siguieron protocolos de Biología Molecular clásico. En estos procedimientos se utilizó como estrategia, la extracción del ARNm, retrotranscripción a ADNc, amplificación e inserción en un vector de clonación y secuenciación del mismo.

7.1 Diseño de cebadores a partir de secuencia N-terminal

Como se mencionó en procedimientos experimentales (18.3.1), se utilizaron, para el diseño de los cebadores, las secuencias nucleotídicas de las peptidasas de la familia Bromeliaceae que presentaron el mayor porcentaje de identidad con la secuencia N-terminal de AntA y AntB obtenida experimentalmente (que fue la misma para ambas enzimas).

Tabla 12. Comparación de los codones que codifican para los aminoácidos de la secuencia N-terminal de peptidasas de la Familia Bromeliaceae y diseño de cebador Nt para *Antiacanthaína*. En la secuencia consenso, n es una degeneración de la secuencia y representa una G ó C

| | | | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Secuencia N-terminal | V | P | Q | S | I | D | W | R | |
| ADNc de Hieronimaína II y III | G C G | G T G | C C T | C A A | A G T | A T T | G A T | T G G A G A | |
| Secuencia N-terminal | A | L | P | E | S | I | D | W | R |
| ADNc de Hieronimaína I | G C G | C T G | C C T | G A A | A G T | A T T | G A T | T G G A G A | |
| Secuencia N-terminal | A | V | P | Q | S | I | D | W | R |
| ADNc de Fastuosaina | G C A | G T G | C C T | C A A | A G T | A T T | G A T | T G G A G A | |
| Secuencia de Ananaína | A | V | P | Q | S | I | D | W | R |
| Ananaina (AN11) | G C A | G T G | C C T | C A A | A G T | A T T | G A T | T G G A G A | |
| Secuencia Bromelaína de tallo | A | V | P | Q | S | I | D | W | R |
| ADNc de Bromelaína de tallo | G C A | G T G | C C T | C A A | A G T | A T T | G A T | T G G A G A | |
| Secuencia N-termial AntA y B | A | V | P | E | S | I | D | W | R |
| Secuencia primer Nt | G C A | G T G | C C T | n A A | A G T | A T T | G A T | T G G | A G A* |
| *Nucleótido resaltado en negro no formó parte del primer | | | | | | | | | |

Se tuvo especial atención en aquellos aminoácidos donde la secuencia proteica de las peptidasas de *Bromelia antiacantha* eran diferentes a la de las peptidasas con la que se comparó. Los codones del cebador correspondientes a estos aminoácidos se diseñaron teniendo en cuenta el grado de conservación mostrado para el mismo en las distintas peptidasas comparadas. En los casos que hubieron sustituciones conservadas de aminoácidos, se consideró un codón degenerado. El oligonucleótido diseñado como *primer* directo se muestra en la tabla 12. La secuencia nucleotídica consenso fue utilizada para sintetizar el *primer* Nt (directo) para la síntesis de ADNc proveniente de las cadenas codificantes de ADN.

7.2 Diseño de cebadores a partir de secuencias por digestión trípica.

El *primer* Sec_{int} (reverso) fue diseñado a partir de los datos de secuencias aminoacídicas obtenidas de la digestión trípica de AntA y AntB y que fueron coincidentes con la secuencia de la Fastuosaína (y que permitiría obtener la secuencia hacia el N-terminal de la enzima). Fueron utilizados para la síntesis de fragmentos proveniente de las cadenas no codificantes (complementarias) de ADNc.

También para el diseño del cebador de la secuencia For_{Ant} (que comprende una región interna de la proteína y con el que se pretende obtener el fragmento C-terminal) se utilizaron los datos obtenidos de la digestión trípica de AntA y AntB.

En la tabla 13 se muestran las secuencias de los primers diseñados para obtener las cadenas no codificantes de ADNc en el proceso de amplificación por PCR.

El *primer* RoR1polidT (cebador degenerado utilizado para peptidasas cisteínicas) fue utilizado en la reacción de retrotranscripción (RT), en tanto que el *primer* Ro (secuencia mas corta de RoR1polidT) y Sec_{int} ó For_{ant} fueron utilizados en las reacciones de PCR subsiguientes.

Tabla 13. Primers diseñados para utilizarse en 3'RACE

| Nombre | Secuencia reversa |
|-------------------------|---|
| RoR ₁ polidT | 5'-CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3' |
| Ro | 5'-CCGGAATTCAGTGCAG-3' |
| Sec _{int} | 5'-CTCACCCCATGAGGTNCCCA |
| Nombre | Secuencia directa |
| For _{ant} | 5'-TGCTCTTATCGATGCCAGCGG |

7.3. Extracción de ARNm y obtención de ADNc

Se pelaron frutos congelados, se les se retiró cáscara, fibra y semillas, quedando la pulpa, la cual se coloca en mortero con nitrógeno líquido. El producto fue triturado siguiendo el protocolo del kit de extracción de ARN aportado por el fabricante. Para obtener una mayor cantidad de ARN, el paso de extracción final se realizó de forma secuencial.

La cuantificación del ARN extraído fue de 94 $\mu\text{g/mL}$. Con este preparado se realizó un RT-PCR para la obtención del ADNc de la/s peptidasa/s de *B. antiacantha*. Se obtuvo la primera cadena de ADNc por RT (Proc. Exp. 18.2.2.1) empleando los *primer* RoR1polidT u Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (incluido en el kit).

Utilizando como molde la cadena de ADNc obtenida en el paso anterior, se realizó la amplificación de las secuencias que codifican para la/s enzimas buscadas. Los set de *primers* utilizados fueron Nt y Sec_{int}, con los que se esperaba obtener amplificados de 600 pb y Nt y R_o, donde se esperaba obtener secuencias de 1000pb. La muestra de la retro-transcripción (RT) fueron utilizadas sin diluir, diluidas 1/10 y 1/50 en la amplificación.

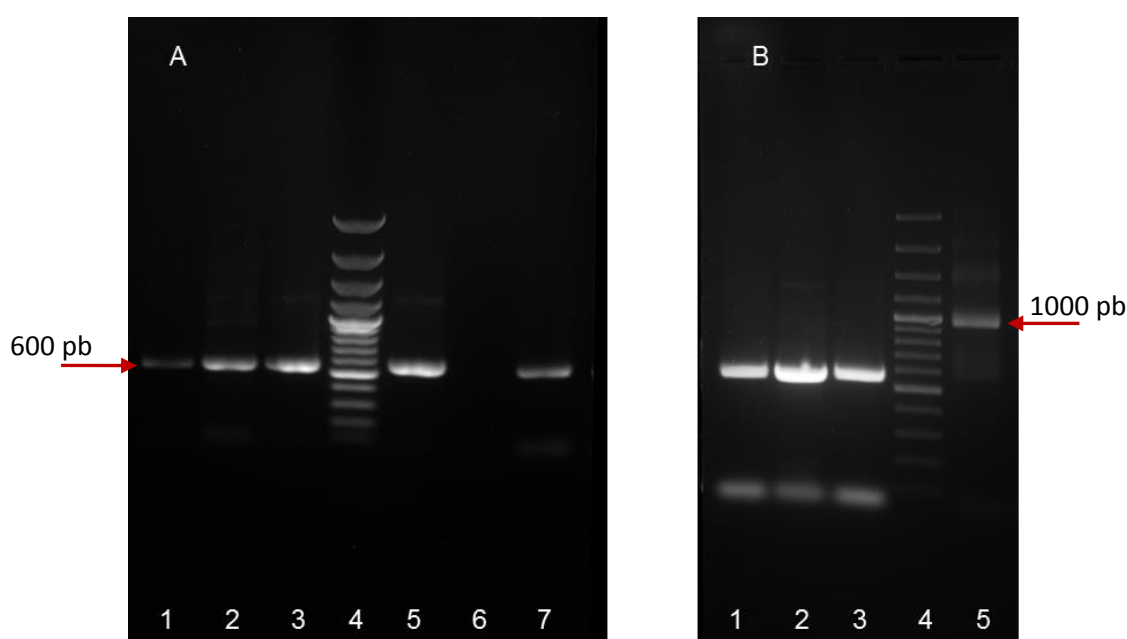


Figura 34. Electroforesis de agarosa al 2% de ADNc amplificados por PCR. Figura 34 A. Carriles 1-3: Utilizando ADNc con el primer RoR1polidT (s/dil, dil.1/10 y dil. 1/50), amplificado con los primers Nt y Sec_{int}. Carril 4: patrones de PM (GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 5 y 7: Utilizando ADNc con el primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (dil.1/10 y s/dil), amplificado con los primers Nt y Sec_{int}. **Figura 34 B** Carriles1-3: Utilizando ADNc con el primer ROR1polidT (dil 1/50), amplificado con los primers Nt y Sec_{int} Carril 4: patrones de PM (GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).Carril 5 Utilizando ADNc con el primer RoR1polidT, amplificado con Nt y Ro.

Los productos de la amplificación por PCR (Proc. Exp. 17.2.2.2.) fueron controlados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. En la figura 34 A y B, se puede observar que todos los productos controlados presentan el tamaño de fragmento esperado para el set de primers utilizados en la amplificación.

Para el producto de la amplificación del ADNc (obtenidos con el *primer* R_oR₁polidT), se obtuvo una mejor amplificación (bandas mas intensas) cuando se utilizó la dilución 1/50 y utilizando para la

amplificación, los primers Nt y Sec_{int}, obteniéndose los fragmentos de 600 pb (correspondiendo al 85% de la secuencia de la proteína madura).

Se logró obtener una sola muestra correspondiente al producto de la amplificación del ADNc s/diluir (obtenido con el primer R₀R₁polidT), utilizando los primers Nt y R₀. La banda obtenida, de baja intensidad (implicando una baja concentración de producto) de unos 1000pb, correspondería al tamaño de la la secuencia completa de la peptidasa.

Se realizaron también la amplificación del ADNc (obtenido con el primer Oligo(dT)12-18) sin diluir y dil 1/10, con los primers Nt y R₀, pero no presentaron productos de amplificación para ninguno de los casos

En las siguientes etapas se continuó trabajando con el ADNc obtenido con el *primer* R₀R₁polidT y amplificado con el set de *primers* Nt y Sec_{int}. Con el set de primers que amplificaron el fragmento de 1000pb no se logró obtener una cantidad suficiente para los trabajos de clonación posteriores ni se lograron obtener nuevos fragmentos.

7.4. Clonado del ADNc

El fragmento proveniente de las bandas de 600 pb, seleccionadas del gel de agarosa, fue extraído del gel siguiendo el procedimiento descrito en Proc. Exp 18.2.3. Luego de extraído el ADNc del gel se concentró en speed vac y se cuantificó. Se obtuvieron aproximadamente 20µL de ADN de concentración 166 µg/µL. Se realizó el clonado en células de *E. coli* (células químicamente competentes, One Shot®,) utilizando el vector Zero Blunt® TOPO®, (Invitrogen) Proc. Exp. 18.3., al que previamente se le insertó la secuencia de ADNc de interés (Ligación). Para verificar la transformación de las células de *E. Coli* y la inserción del fragmento de interés, se realizó el cultivo en medio LB conteniendo kanamicina, lo que permitió el crecimiento de las células que hubieran incorporado el vector. De las células crecidas, se seleccionan 8 colonias que se volvieron a sembrar en medio LB con kanamicina. Para confirmar que las colonias blancas contenían los vectores con el inserto, se realizó, una amplificación por PCR (Proc. Exp. 18.3.2.), utilizando los *primers* Nt y Sec_{int}. El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar si el fragmento estaba en los clones seleccionados. De los ocho clones, solo tres amplificaron por PCR una banda del tamaño esperado (600pb) y fueron seleccionados para ser secuenciados (Figura 35).

Los plásmidos se enviaron a secuenciar utilizando los *primers* "M13 Forward y M13 Reverse" que permiten secuenciar el inserto (cada uno de estos *primers* permiten amplificar a partir de cada uno de los extremos la zona de inserción de DNA en el vector Zero Blunt® TOPO®). Esto permitió obtener la secuencia de las dos cadenas de DNA para cada uno de los clones

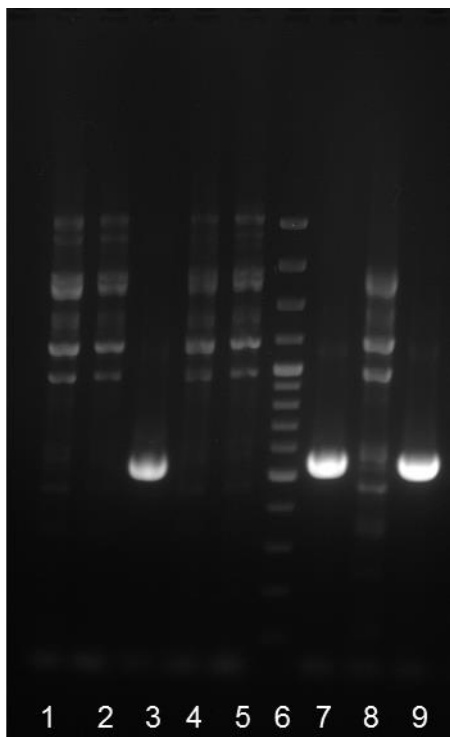


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los clones amplificado por PCR. Se utilizó el vector Zero Blunt® TOPO® como molde y los *primers* *Nt* y *Sec_{int}*. Los carriles 3, 7 y 9 mostraron el producto de amplificación esperado de 600pb. Carril 6: Marcador de PM

7.5. Obtención de la secuencia consenso de la peptidasa de *Bromelia antiacantha*

La secuencia de los 3 clones fueron alineados utilizando el programa clustal de BioEdit comprobándose que todos los clones contenían la misma secuencia. Se identificaron las secuencias nucleotídicas de los primers utilizados para su amplificación (resaltado en rojo la secuencia *Nt* y en azul la secuencia complementaria de *Sec_{int}*) y el codón de stop (Figura 36). La secuencia obtenida consta de 699 nucleótidos, de los cuales 561 (de acuerdo a los resultados obtenidos por tBlastx) codifican para una cadena polipeptídica en la que se pudieron reconocer la secuencia del extremo N-terminal de AntA y AntB y de la secuencia interna obtenida de la digestión trípica de estas peptidasas y que fueron las utilizadas para la generación de los *primers*.

La secuencia polipeptídica constó de 187 aminoácidos, que correspondió a un 80% de la secuencia madura (activa) completa de las peptidasas (usualmente entre 220 y 240 aa).

Este resultado, si bien satisfactorio para determinar la identidad de la secuencia, al no corresponder a la secuencia completa que codifica para la enzima activa, no fue suficiente para obtener datos definitivos de su identidad, parámetros fisicoquímicos, modelado etc.

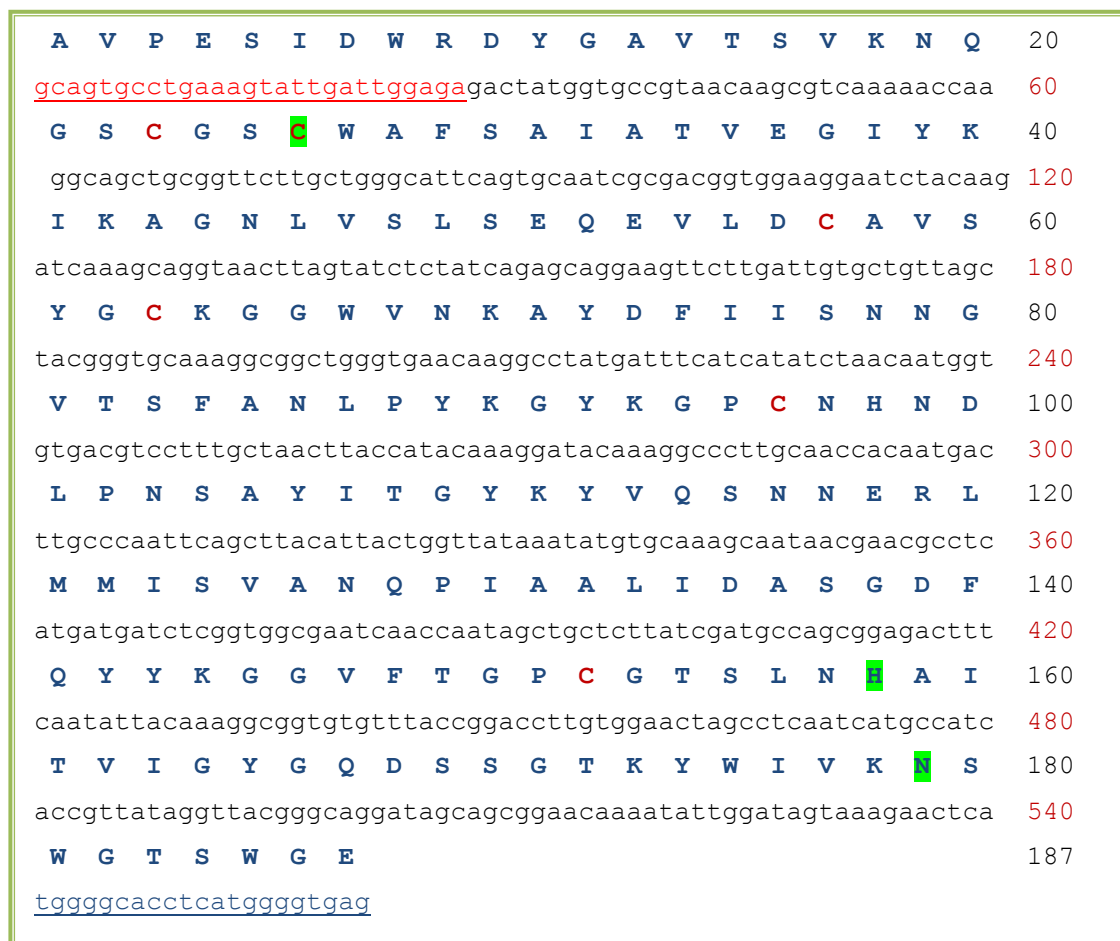


Figura 36. Secuencia de ADNc de peptidasa de *Bromelia antiacantha*. En esta figura se muestran las secuencias aminoacídica y nucleotídica consenso. La secuencia nucleotídica en rojo corresponde al primer N_t y la secuencia nucleotídica subrayada corresponde a la secuencias nucleotídica del primer Sec_{int}.

Los resultados de la digestión trípica de las enzimas purificadas, obtenidas con posterioridad a la realización de este clonado, permitió identificar secuencias con alto porcentaje de identidad en las regiones Pro de *Fastosaína* y *Bromelaína* y de la región C-terminal.

Con estos resultados se diseñaron nuevos *primers* (Tabla 14) que abarcaron la secuencia completa y región Pro de las peptidasas con las que se realizó el alineamiento.

Tabla 14. Primers diseñados para utilizarse en la amplificación por PCR

| Nombre | Secuencia reversa |
|---------------------|--------------------------|
| Rev _{Fast} | 5'-CCACAATGTCGAAGCAAG |
| Nombre | Secuencia directa |
| For _{Pro} | 5'-GAATGGATGGCTGAGTACGGC |

7.6. Obtención de la secuencia madura y secuencia Pro

La secuencia de trabajo fue exactamente la misma que la descrita anteriormente. Se realizó una nueva extracción de ARN de la pulpa de frutos maduros de *Bromelia antiacantha* y obtuvo un nuevo ADNc.

Para la amplificación del ADNc (PCR), se utilizaron set de primers diferentes. En la tabla 15 se muestran la combinación de *primers* utilizados y el tamaño de las secuencias esperadas.

Tabla 15. Combinación de *Primers* utilizados en la amplificación por PCR

| Nombre del set | Primer directo | Primer reverso | Tamaño esperado |
|----------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| D1 | For _{Pro} | Sec _{Int} | 1000 pb |
| D2 | For _{Ant} | Rev _{Fast} | 500 pb |
| D3 | N _t | Rev _{Fast} | 850 pb |
| D4 | For _{Pro} | Rev _{Fast} | 1200 pb |

En la figura 37 se muestran los resultados de la amplificación. Se puede observar que para todas las combinaciones de primers propuestas se obtuvieron los resultados esperados. En el carril 1 correspondiente a la muestra D1, se observó una banda de aproximadamente 900pb, que se correspondió con el tamaño esperado para esta amplificación

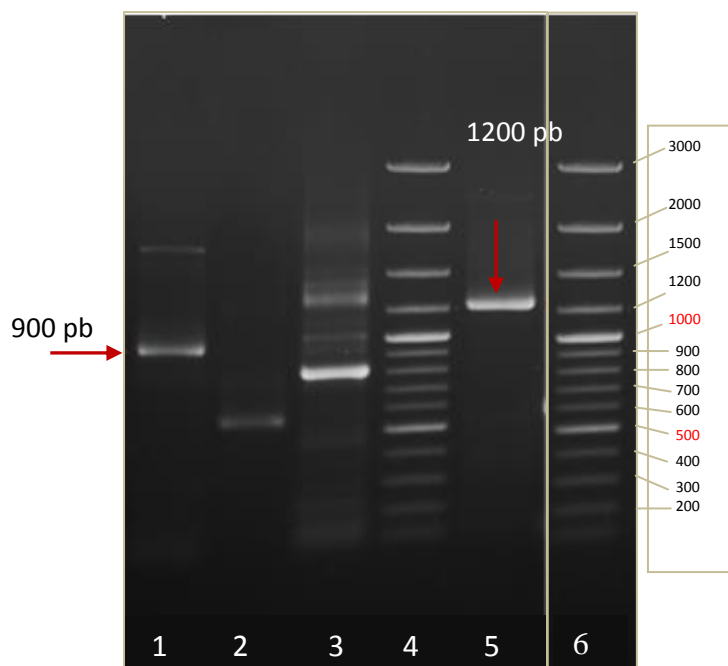


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT amplificado por PCR. Carril 1: Producto obtenido con los primers For_{Pro} y Sec_{Int} (D1). Carril 2: producto de amplificación con primers For_{Ant} y Rev_{Fast} (D2). Carril3: producto amplificado con los primers N_t y Rev_{Fast} (D3). Carril 4 y 6: Marcador de PM (GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Carril 5: producto amplificado con los primers For_{Pro} y Rev_{Fast} (D4)

En el carril 2, se observó una banda de aproximadamente 500pb que se correspondió con el producto esperado (porción final de la secuencia madura de la peptidasa de interés). En el carril 3, se observó con mayor intensidad la banda de aproximadamente 850pb, que correspondería a la

secuencia completa madura de la peptidasa. En este mismo carril se observó también varias bandas menos intensas, destacándose la banda que migró a la misma altura de la observada en el carril 5, correspondiente a la muestra D4, cuyo producto, de aproximadamente 1200pb, coincide con lo esperado (secuencia madura más región Pro).

Dado estos resultados, todas la bandas fueron cortadas y extraído el material genético para ser insertado en el vector Zero Blunt® TOPO® y clonado en células de *E. Coli* (One Shot™ TOP10 químicamente competente).

Realizada la ligación e inserción del vector en las células de *E. Coli*, se hicieron crecer en medio LB conteniendo kanamicina. Para todas las mezclas, excepto D1, se obtuvieron crecimiento de colonias características. Se seleccionan algunas colonias y se volvieron a sembrar en forma separada (se seleccionan 4 colonias de cada set). De los clones crecidos se realizó una PCR para confirmar si tenían los insertos de interés.

En la figura 38, se observan los productos de PCR de cada uno de los 4 clones provenientes de los diferentes sets. Las bandas obtenidas son coincidentes con el inserto agregado. Se puede apreciar que los carriles 1-4 presentaron una banda de 500pb, correspondientes al inserto D2.

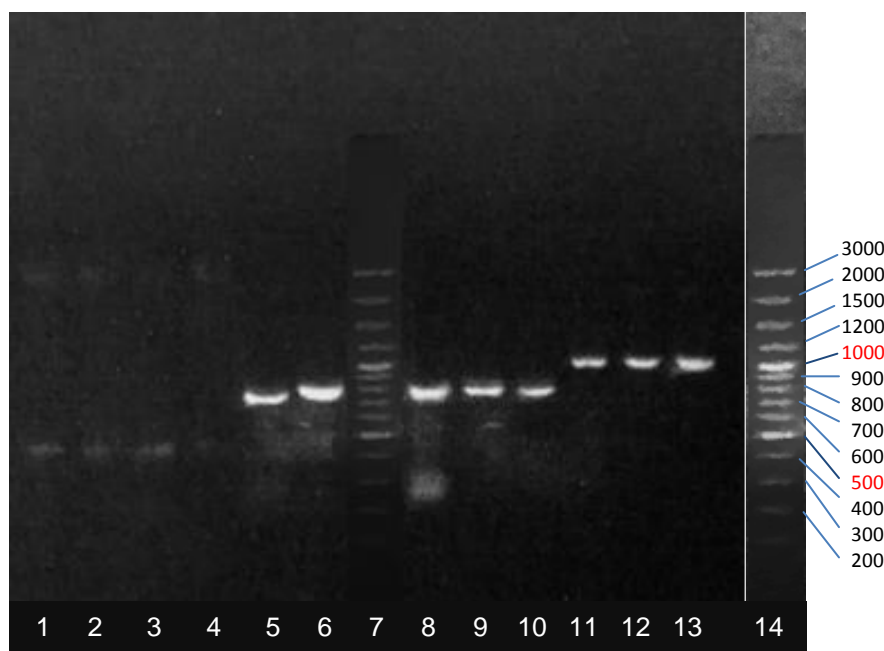


Figura 38. Electroforesis de agarosa al 2% de la amplificación del inserto de los plásmidos Carril 1-4: Clones de inserto D2, Carriles 5 y 6: Clones de inserto D3. Carril 7-14: Marcador de PM (GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 8-10: Clones de inserto D3. Carriles 11-13: Clones de inserto D4.

Los carriles 5 y 6 y 8-11 corresponden a las secuencias de aproximadamente 850 pb de D3 y los carriles 12-13 mostraron las bandas de aprox. 1200 pb correspondientes al set D4. Dados estos resultados, se seleccionaron 3 cultivos de cada amplificación para purificar el vector y enviarlo para su secuenciación utilizando los primers “M13 Forward (-20) y M13 Reverse”.

Luego de analizados y procesados, los resultados proveniente de la secuenciación de los diferentes clones D3, se muestran en la Figura 39. Utilizando el programa translate Tool de Expasy (www.expasy.org) se obtuvo para las secuencias, los diferentes marcos de lectura. Uno de

estos marcos de lectura es coincidente con la secuencia de la peptidasa. La secuencia nucleotídica está compuesta por 884 nucleótidos de los cuales los 690 primeros, justo antes de la localización del codón “tga” de stop, codifican para una cadena polipeptídica en la que pudieron ser reconocidas las secuencias de los péptidos con los que se diseñaron los *Primer* utilizados.

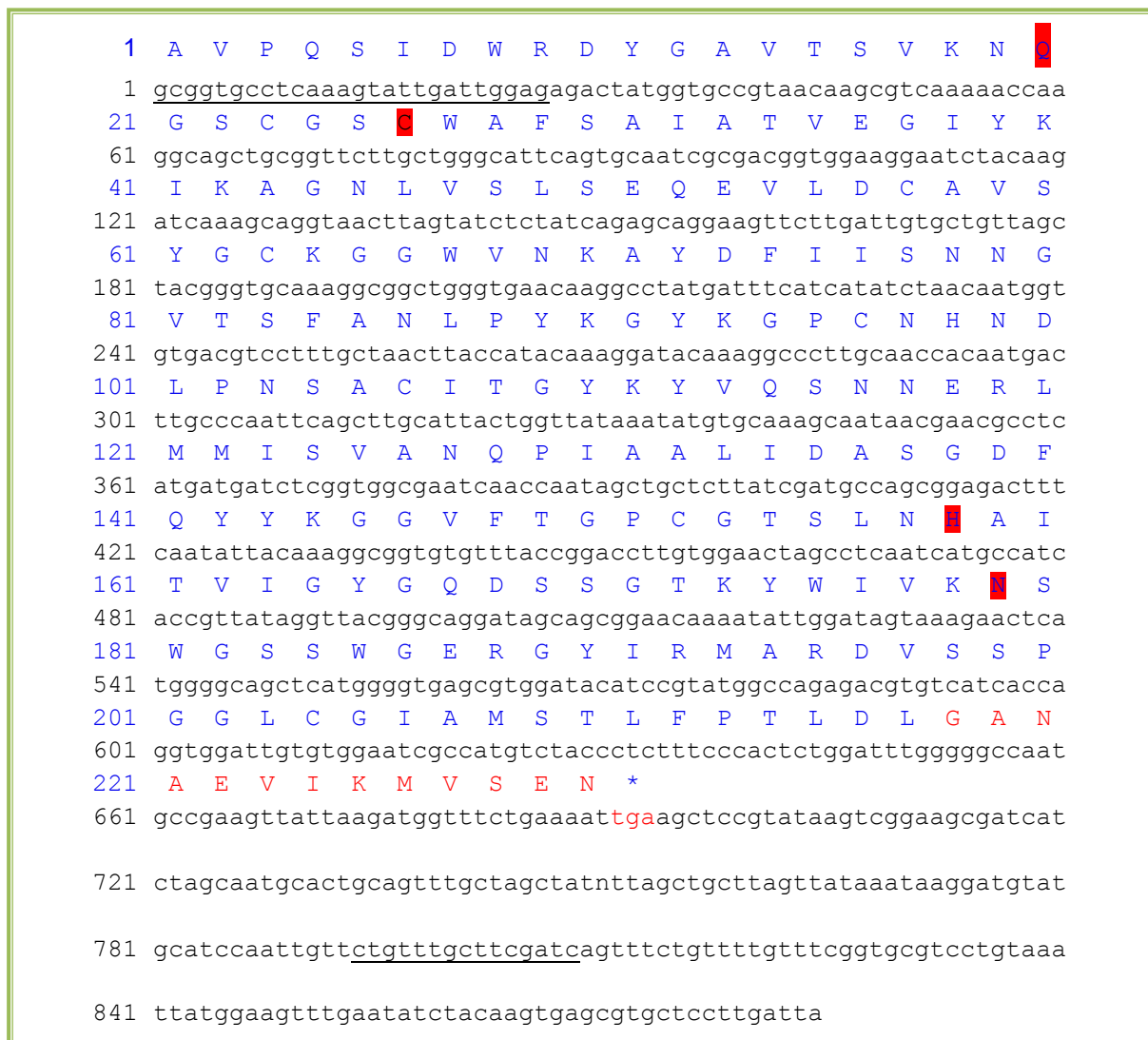


Figura 39. Secuencia consenso del ADNC de peptidasa madura de Bromelia antiacantha. En esta figura se muestran las secuencias aminoacídica y nucleotídica consenso. El triplete “tga” que se muestra en rojo corresponde a la señal de stop para la síntesis proteica. Subrayadas se observan las secuencias de los primers correspondiente a los residuos de la secuencia N-terminal y de la región posterior al C-terminal utilizadas en la amplificación del gen.

La secuencia C-terminal, marcada en rojo es definida como secuencia Pro, de acuerdo a los datos de la secuencia de fastuosaina, la enzima utilizada como referencia por su alto porcentaje de identidad de secuencia (Cabral et al., 2006) por lo que no formaría parte de la secuencia madura (secuencia activa de la proteasa). En esta secuencia se pueden identificar claramente los residuos que conformarían la tríada catalítica (Cys 26/His158/Gln20/Asn179).

Esta secuencia fue introducida en el programa ProtParam tool del sitio web Expasy (www.expasy.org), Gasteiger et al., 2009) para calcular algunas de las propiedades fisicoquímicas del polipéptido. De acuerdo a los resultados para la secuencia de 217 aminoácidos, la masa molecular es de 23,270 kDa, coeficiente de extinción molar a 280 nm ($52870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y pI: 7,69. Tanto el valor de pI como la masa molecular no coinciden de forma exacta con ninguna de las proteasas purificadas y caracterizadas. Sus valores se aproximan mucho a los obtenidos experimentalmente para AntA (PM: 23300 Da y pI: 7,4).

Estos resultados, sin embargo, no permitieron designar con seguridad la identidad de la peptidasa a ninguna de las tres purificadas, dado que las diferencias, en algunos aspectos mínimas solo podrían definirse si se expresara el gen, purificara la enzima y se comparara experimentalmente con los datos ya obtenidos. Por tal motivo, la secuencia que codifica para la peptidasa de *Bromelia antiacantha*, será denominada antiacanthaína P (AntP)

En la tabla 16 se muestra la composición aminoacídica de AntP con bromelaína de tallo y bromelaína de fruto.

La composición aminoacídica de las tres enzimas comparadas, no mostró diferencias significativas respecto al porcentaje de cada aminoácido. Los aminoácidos más abundantes de acuerdo a la secuencia primaria de antiacanthaína P, serían serina y glicina, al igual que para ambas bromelaínas. Sin embargo el porcentaje de glicina en AntP mostró ser varios puntos porcentuales superior al de estas peptidasas. Para las tres enzimas, la Histidina fue el aminoácido minoritario, apenas superando el punto porcentual en bromelaína de tallo. Otro aspecto que resaltó respecto a la composición, fue el contenido de aminoácidos polares (arginina y lisina) y de aminoácidos ácidos (aspartato y glutamato) donde las diferencias fueron más marcadas en las tres enzimas. Bromelaína de tallo presentó un porcentaje de aminoácidos polares mayor que bromelaína de fruto y AntP, Los aminoácidos ácidos, sin embargo fueron mayoritarios en bromelaína de fruto, respecto a la de tallo y a AntP. La diferencia en estos aminoácidos está estrechamente relacionada con los valores de pI de las tres enzimas. Los cálculos teóricos de pI mostraron para bromelaína de fruto, valores entre 4,6 a 5,6, característico de enzimas ácidas. Para bromelaína de tallo, el cálculo de pI fue de 8,3 a 8,6, reflejando su carácter básico. Para AntP, el cálculo teórico de pI fue de 7,4, evidenciando un carácter neutro de esta peptidasa y que puede ser explicado por lo equilibrado en la composición de los aminoácidos polares (16%) y ácidos (15%)

La comparación de las dos secuencias de AntP, obtenidas por la amplificación con diferentes set de primers y mostradas anteriormente se muestran en la figura 40. La secuencia 2 (SEQ2), correspondiente a la secuencia completa, presenta 2 aminoácidos distintos a los de la secuencia 1 (SEQ1, secuencia parcial). La primera diferencia observada en el extremo N-terminal, corresponde a una sustitución conservada (ác. glutámico por glutamina) y prevista, ya que proviene del codón degenerado diseñado para esta secuencia N-terminal

Tabla 16. Composición aminoacídica de AntP, Bromelaína de Tallo y Bromelaína de fruto.

| Aminoácido | <i>Ant.P</i> | CAA08861 (Brom. tallo) | BAA21848 (Brom. fruto) |
|------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Ala (A) | 5,8% | 7.8% | 8,2% |
| Asn (N) | 6,5% | 6.4% | 7,7% |
| Asp (D) | 4,6% | 4.2% | 6,0% |
| Cys (C) | 3,7% | 2.2% | 2,3% |
| Gln (Q) | 3,2% | 3.9% | 3,7% |
| Glu (E) | 2,3% | 4.5% | 4,5% |
| Gly (G) | 12,0% | 7.8% | 8,8% |
| Ile (I) | 6,9% | 7.3% | 6,2% |
| Leu (L) | 5,5% | 3.9% | 3,7% |
| Met (M) | 1,8% | 3.1% | 3,1% |
| Phe (F) | 2,8% | 4.2% | 4,3% |
| Pro (P) | 3,7% | 3.6% | 3,4% |
| Ser (S) | 10,6% | 11.5% | 10,2% |
| Thr (T) | 4,6% | 3.6% | 4,0% |
| Trp (W) | 2,8% | 2.2% | 2,6% |
| Tyr (Y) | 6,0% | 5.0% | 6,0% |
| Val (V) | 6,9% | 7.8% | 7,7% |
| Lys (K) | 5,1% | 4.2% | 3,7% |
| Arg (R) | 2,3% | 5.3% | 3,4% |
| His (H) | 0,9% | 1.1% | 0,6% |
| (Asp+Glu) | 15 (6,9%) | 31 (9%) | 37 (11%) |
| (Arg+Lys) | 16 (7,4%) | 34 (12%) | 25 (7%) |
| pl teórico | 7,4 | 8.32 | 4,67 |

En el extremo C-terminal, en la secuencia 1, la tirosina que formaba parte de la secuencia del *primer* reverso, fue sustituida por una serina en la secuencia 2, ambos residuos también conservados. Estas sustituciones pueden deberse también a la presencia de secuencias correspondiente a las diferentes isoformas observadas en las 3 enzimas purificadas en este trabajo.

ALINEAMIENTO DE LAS DOS SECUENCIAS OBTENIDAS EXPERIMENTALMENTE

| | | |
|------|---|-----|
| SEQ2 | AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQGS CGS C WAFSAIATVEGIYKIKAGNLVSLSEQEVLDCAVS | 60 |
| SEC1 | AVPESIDWRDYGAVTSVKNQGS CGS C WAFSAIATVEGIYKIKAGNLVSLSEQEVLDCAVS | 60 |
| | *****:***** | |
| SEQ2 | YGC K GGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGP C NHNDLPNSA C ITGYKYVQSNNERL | 120 |
| SEC1 | YGC K GGWVNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGP C NHNDLPNSA C ITGYKYVQSNNERL | 120 |
| | *****:***** | |
| SEQ2 | MMISVANQPIAALIDASGDFQYYKGGVFTGP C GTSLNHAITVIGYGQDSSGTKYWIVKNS | 180 |
| SEC1 | MMISVANQPIAALIDASGDFQYYKGGVFTGP C GTSLNHAITVIGYGQDSSGTKYWIVKNS | 180 |
| | *****:***** | |
| SEQ2 | WGS S WGERGYIRMARDVSSPGGL C GIAMSTLFPTLDL | 217 |
| SEC1 | WGT S WGE----- | 187 |
| | ** : **** | |

Figura 40. Comparación de las secuencias aminoacídicas consenso total y parcial de la peptidasa madura de *Bromelia antiantha*

La secuencia correspondiente a los clones D4, se muestra en la figura 41. La misma corresponde a la secuencia pro-peptidasa que contiene un dominio N-terminal asociado a la enzima inactiva o zimógeno (secuencia resaltada en rojo). La eliminación del dominio inhibitor N-terminal ya sea por interacción con una segunda peptidasa o por escisión autocatalítica activaría el zimógeno, liberando este dominio y dejando la enzima activa. El comienzo de la secuencia pro, en la región N terminal, presenta un dominio conocido como I29 (MEROPS) subrayado en rojo, que sería la región de este propéptido, que bloquea la entrada del sustrato y mantiene inactiva la enzima.

En el mismo dominio, resaltado en amarillo, se ubica el motivo ERFNIN, altamente conservado entre las peptidasas de la familia C1A. El papel principal del motivo ERFNIN es restringir la disposición tridimensional de las tres hélices y una cadena β del pro dominio en una forma globular discreta. También se ha visto que los residuos del motivo ERFNIN regulan el mecanismo de activación autocatalítica mediado por el pH de la proteasa (Luniak et al., 2017). Otro motivo altamente conservado en el pro-dominio de las proteasas cisteínicas, es el motivo GxNxFxD

(Figura 41, resaltado en gris). Este motivo parece estar involucrado en el correcto procesamiento de las proteasas maduras (Aich and Biswas, 2018)

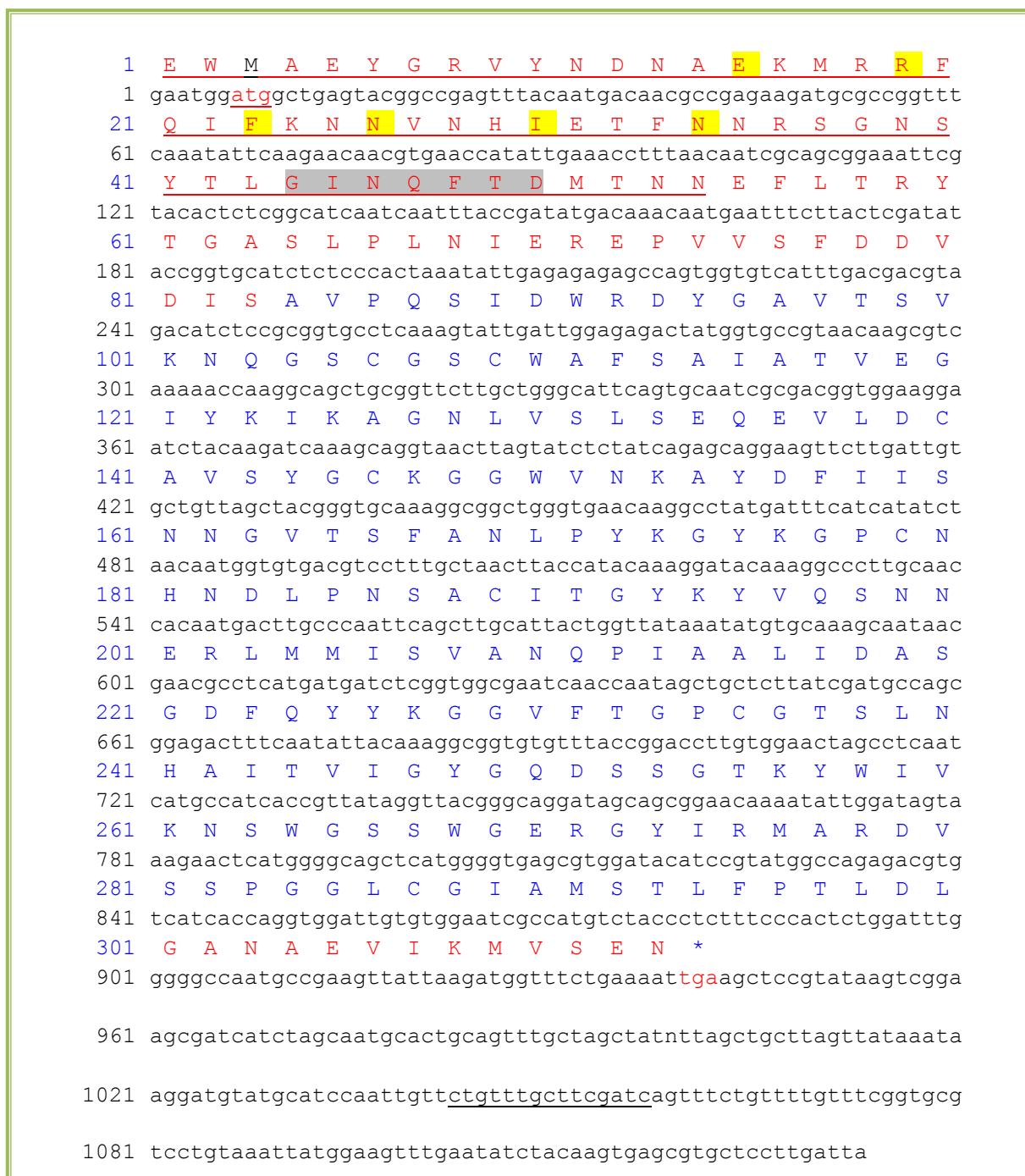


Figura 41. Secuencia consenso del ADNc del pro-peptidasa de Bromelia antiacantha (Antiacanthaina). En esta figura se muestran las secuencias aminoacídica y nucleotídica consenso del ADNc obtenido por PCR. El triplete “atg” que se muestra en rojo al comienzo de la secuencia nucleotídica corresponde a la Met1 del comienzo de la traducción. En rojo se muestran las regiones pro-enzima. Subrayado, se identifica región conocida como dominio I29 (MERPOS). Resaltado en amarillo, se identifica el motivo ERFNIN y en gris el motivo GxNxFx D. Sin subrayar, la secuencia pro-enzima en la región C-terminal.

El otro segmento pro resaltado en rojo corresponde a la región C-terminal. Este segmento está bastante conservado en las proteasas de la familia Bromeliaceae. No está presente en secuencias relacionadas a pro-papaína. Esta extensión podría estar involucrada en la localización o escisión autocatalítica. Las alineaciones de secuencia con más de otras 50 cisteín proteasas de plantas, hongos y animales no permitieron una predicción funcional de esta secuencia (Luniak et al., 2017).

7.7. Análisis de homología

Como se mencionó anteriormente, los resultados de la secuencia obtenida a partir del ADNc de frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol., no permitió definir a cuál de las peptidasas purificadas correspondería. Se denominó genéricamente Antiacanthaína P (AntP) a la secuencia que representa la forma activa de la enzima y Pro-antiacanthaína (Pro-ant) a la secuencia inactiva de la misma.

La secuencia de la peptidasa AntP, fue analizada utilizando el motor de búsqueda Protein-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), dando como resultado, más de 100 secuencias de peptidasas con un porcentaje de identidad superior al 55%. De este grupo, 20 secuencias presentaron un alto grado de identidad, entre el 70 y 92% para la secuencia de la proteasa activa. Solamente la Ananaína (no utilizada para el alineamiento) tiene la estructura cristalográfica resuelta con alta resolución.

En la figura 42 se muestra el alineamiento de la estructura primaria de AntP con las secuencias completas de algunas proteasas cisteínicas con las que presentó el mayor porcentaje de identidad de secuencia. En todos los casos se trata de peptidasas de la misma familia botánica, lo que era esperado dado el alto grado de conservación que se había observado con la secuencia N-terminal.

Además de la secuencia N-terminal, se observa un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos, algunos de los cuales son esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas proteasas, representada por dos dominios principales que flanquean el sitio activo de la enzima (Ramli et al., 2018).

Así, se encuentran conservados los residuos Cys26 e His158 (Cys25 e His159 en numeración de papaína) que conforman la díada catalítica presente en todas las cisteín-endopeptidasas.

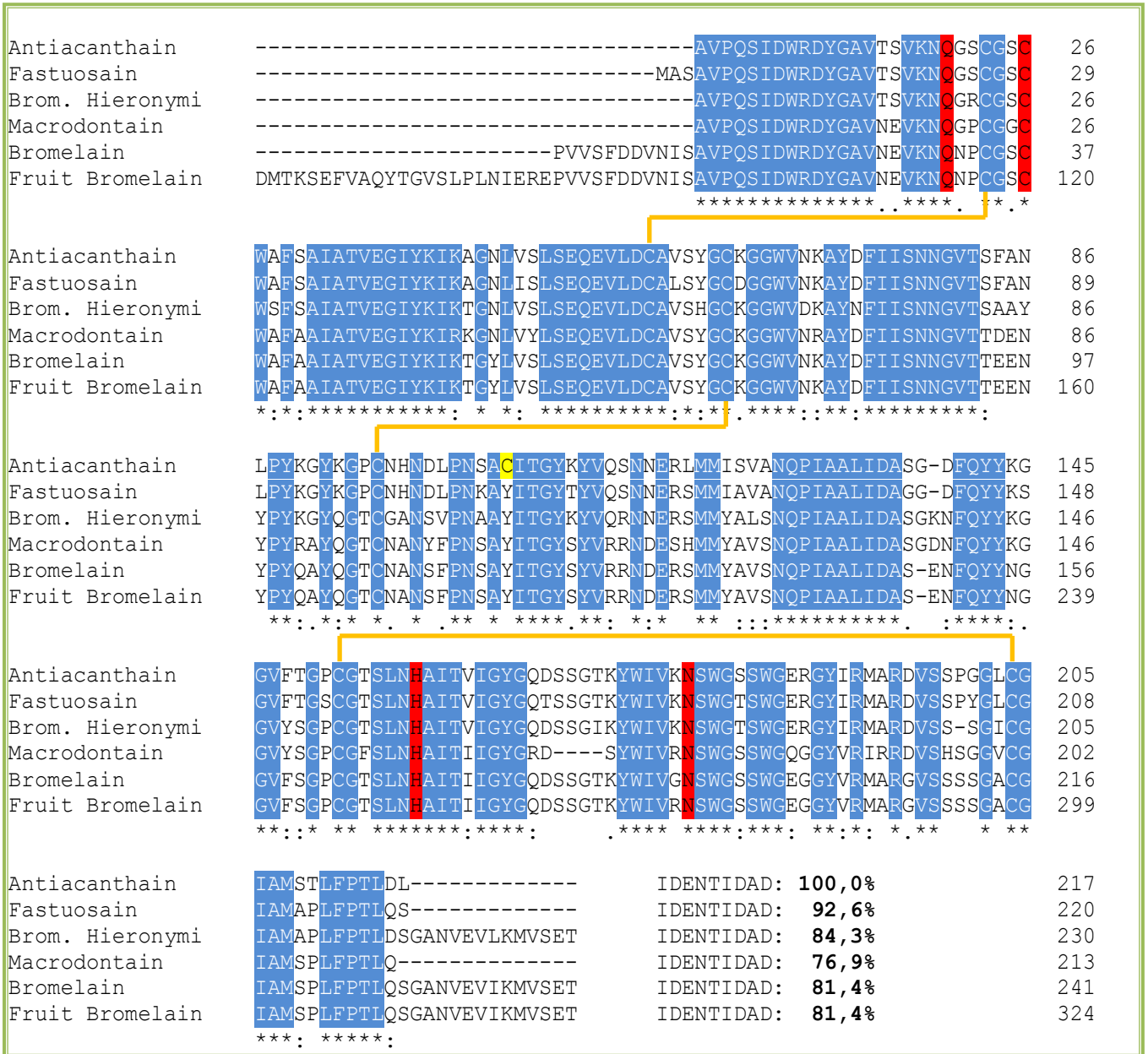


Figura 42 Alineamiento múltiple de Antiacanthaina con las secuencias completas de endopeptidasas cisteínicas de la familia Bromeliaceae. Los residuos del centro catalítico se representan resaltados en color rojo. Los residuos coincidentes en todas las secuencias están resaltados en azul y con asterisco al final de cada línea. Los dos puntos (:.) representan sustituciones conservadas y un solo punto (.) representa sustituciones coincidentes.

Entre otros residuos a los que se les ha asignado distintos roles funcionales se encuentra la Gln20, a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe140, Trp176 y Trp182, que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn180 y la His159.

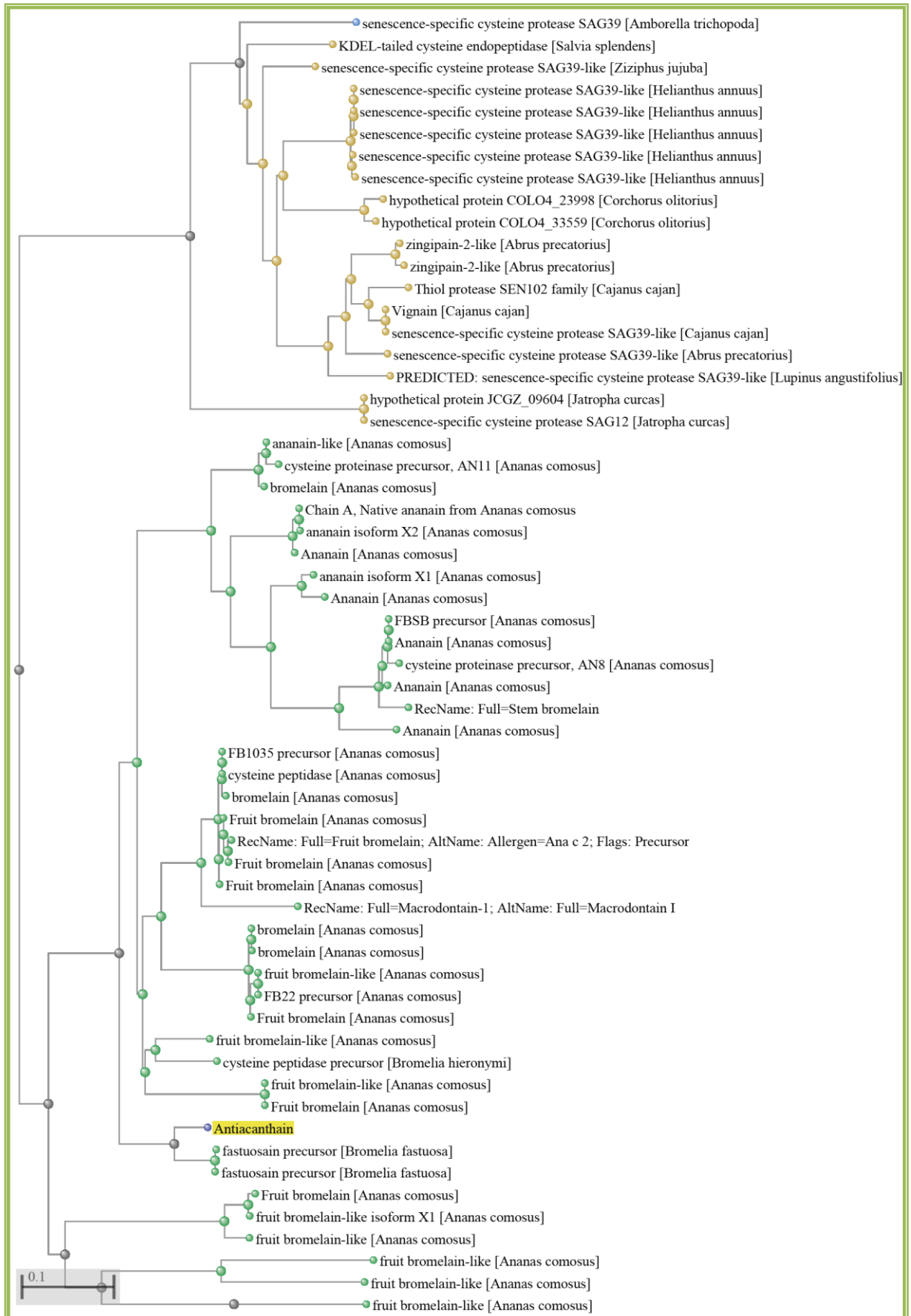


Figura 43 (Página anterior). Cladograma del alineamiento de antiacanthaína utilizando el servicio BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Los puntos en verde se destaca la relación de de Antiacanthaína (*resaltada en amarillo*) con las proteasas vegetales con las que exhibe el mayor grado de homología (>60%) y los puntos en amarillo, muestra la relación con otras proteasas con la que presenta una relación de identidad de <50%.

A diferencia de las otras peptidasas comparadas, Antiacanthaína contiene ocho residuos Cys, siete de los cuales están altamente conservados: Cys26 corresponde al sitio activo, en tanto que las otras seis Cys conservadas participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas (Cys22-Cys57, Cys63-Cys96 y Cys152-Cys204). La octava cisteína se ubica en la posición 106. Esta ubicación en otras peptidasas está ocupada por tirosina, serina o treonina, todos residuos polares.

De los datos presentados se observó una clara conservación de la secuencia entre AntP y las proteasas analizadas, confirmando que esta proteasa integra la familia C1A de las proteasas cisteínicas que lidera papaína.

El alineamiento también permitió elaborar diagramas cladísticos (cladogramas) en base a los cuales pudo obtener información funcional y evolutiva sobre las proteínas a ser comparadas. Como se observa en la figura 43, el análisis comparado de la secuencia de Antiacanthaína con más de 100 proteasas, reveló la estrecha relación filogenética que podría indicar la relación funcional y estructura con las proteasas de la misma familia botánica (>60% de identidad, puntos en verde). También se pudo observar el parentesco funcional con otras proteasas vegetales que integran la subfamilia C1A, así como una cercana ubicación taxonómica con otras especies, sugiriendo la existencia de ancestros comunes (<50% identidad, puntos en amarillo). La mayoría de estas proteasas cumplen sus funciones fisiológicas en procesos como la senescencia en los vegetales en donde se han identificado.

8. MODELADO DE AntP Y Pro-ant

8.1. Selección de los moldes y obtención de modelos

Llegados a este punto de información, estarían dadas las condiciones para modelar la estructura 3D de AntP y Pro-ant. Los alineamientos hechos anteriormente para evaluar la identidad de secuencias y motivos conservados de estas enzimas con las secuencias de otras proteasas de la familia bromeliaceae, no sirvieron para generar los templates (moldes) para el modelado. Se necesitaron estructuras obtenidas por difracción de RX o RMN de buena calidad depositadas en el servidor Protein Data Bank (PDB). Para la búsqueda de secuencias con las que generar los moldes, se utilizaron 3 servidores de acuerdo a lo detallado en procedimiento experimental (19.1).

La búsqueda de proteínas en el servidor HHpred, mostró los resultados de más de 94 secuencias con estructuras resueltas que podrían ser candidatas a utilizarse como moldes. De éstas, se seleccionaron 7, de las 20 primeras ponderadas, que cubrían los aspectos buscados para el modelado de AntP, Pro-ant. En esta selección también se tuvo en cuenta secuencias de peptidasas que hubieran sido co-cristalizadas con el inhibidor E-64. De las estructuras de estas secuencias, se buscó tener las características geométricas del posicionamiento y puntos de contacto entre la enzima y dicho compuesto

Con el otro servidor predictivo, I-TASSER, para la selección de las secuencias a utilizarse se consideraron los resultados del alineamiento estructural, en el cual se ponderaron 10 estructuras. De estas se seleccionaron 4 que fueron coincidentes con las seleccionadas de HHpred y que cubren las tres condiciones que se quieren estudiar, secuencia madura, secuencia pro y posicionamiento del inhibidor.

Los resultados de la búsqueda de secuencias a ser utilizadas como moldes del tercer servidor utilizado, Swiss-Model, mostró más de 100 proteínas estructuralmente resueltas por RMN ó RX, posibles de ser utilizadas como moldes. Las secuencias mejor posicionadas en este servidor coincidieron con las seleccionadas de los dos servidores anteriores. Se seleccionaron además, 3 estructuras más, correspondientes a la papaína, que es la enzima “modelo” de esta familia de enzimas. Estas tres secuencias adicionales corresponden a estructuras cristalinas de: secuencia madura, secuencia pro y secuencia co-cristalizada con el inhibidor E-64.

Dado estos resultados y la coincidencia en las secuencias seleccionadas de los tres servidores utilizados, se continuó trabajando con las secuencias obtenidas del servidor Swiss-Model para generar los moldes con los cuales modelar AntP, AntP-E64 y Pro-ant.

Se seleccionaron 5 moldes para generar el modelo de la estructura madura que, de acuerdo a la secuencia de AntP fueron consideradas como relevantes para definir el molde adecuado (incluidas las secuencias que contenía el inhibidor).

Para el caso de la secuencia Pro, se seleccionaron 4 moldes. En la tabla 16 se resumen los principales parámetros considerados. Para ambas secuencias, el primer parámetro considerado es la identidad de secuencia, que ya se utilizó para evaluar la secuencia de AntP con la de otras enzimas que tienen su secuencia anotada pero que no tienen estructuras obtenidas por cristalización, que en este caso sí las secuencias corresponden a proteínas cristalizadas.

Tabla 16. Parámetros utilizados para definir la calidad de los moldes generados para la secuencia de AntP y Pro-ant a partir de los modelos cristalográficos seleccionados. Los recuadros en rojo indican los modelos que presentaron los mejores score y fueron seleccionados para generar la modelo 3D.

| Modelo (PDB) | Muestra | Identidad de secuencia (%) | GMQE | QMEAN | Ligando | RX (Å) |
|--|---------------------------|----------------------------|------|-------|---------|--------|
| SECUENCIA MADURA ANTIACANTHÁINA | | | | | | |
| 6ojk | Ananain | 76,74 | 0,94 | -0,36 | No | 1,73 |
| 4yyw | Ficin B | 54,76 | 0,82 | -0,19 | No | 1,35 |
| 1yal | Chymopapain | 55,02 | 0,80 | -0,74 | No | 1,70 |
| 5a24 | Dionain-1 | 48,36 | 0,80 | -0,81 | E64 | 1,50 |
| 1meg | Caricain | 48,36 | 0,78 | -0,62 | E64 | 2,00 |
| SECUENCIA PRO-ANTIACANTHÁINA | | | | | | |
| 5ef4 | (Ambroisa artemisiifolia) | 41,22 | 0,75 | -1,81 | - | 2,05 |
| 3qj3 | Cathepsin L | 41,18 | 0,75 | -2,01 | - | 1,85 |
| 1pci | Procaricain | 44,75 | 0,75 | -2,61 | - | 3,20 |
| 54qrv | Papain | 43,55 | 0,72 | -3,12 | - | 1,98 |

De las secuencias seleccionadas para obtener el molde de AntP, se pudo observar que la correspondiente a la enzima ananaína (cod PDB: 6ojk), sobresalió sobre los demás por su alta identidad de secuencia (76,74%), siendo la secuencia que le sigue en esta escala de 55%,

correspondiente a la quimiopapaína (cod PDB: 1yal). En el caso de los modelos evaluados para la secuencia pro-antiacanthaína, presentaron todos un porcentaje de identidad de secuencia que ronda el 40%, bastante menor que los de la secuencia madura.

El segundo parámetro seleccionado fue el GMQE (Global Model Quality Estimation). Es un algoritmo que utiliza un score de 0-1 para estimar la calidad del modelo generado, reflejando la exactitud esperada del modelo construido a través del alineamiento y la cobertura de la secuencia modelo.

Cuanto más cercano al valor unidad, mejor calidad del modelo generado. Para la secuencia madura, el molde obtenido a partir de la estructura de 6mir, presentó el score más alto (0,94). Para la secuencia pro, todos los moldes comparados mostraron un valor similar (0,75).

El tercer parámetro considerado en la evaluación de los moldes, fue el QMEAN (Benkert et al., 2011b), también un algoritmo que permite estimar el compuesto basado en las diferencias de las propiedades geométricas, dando una estimación local y global de la calidad en base a un modelo simple. El score considera como un buen indicador de calidad valores cercanos a cero, siendo -4 un valor indicativo de baja calidad. Para las secuencias evaluadas con AntP, el menor valor de QMEAN y por tanto una mejor calidad del modelo fue la Ficina B (cod PDB: 4yyw) con un valor de -0,19, seguida por la ananaína con un valor de -0,36. Para las secuencias con el segmento Pro, los valores de QMEAN fueron más bajos y por tanto de menor calidad, siendo la secuencia de *Ambrosia artemislifolia* (cod PDB: 5ef4) la de mejor calidad con valor de -1,81.

Para la secuencia pro, también se tuvo en cuenta, la resolución de la difracción de RX con la que se obtuvieron las estructuras evaluadas. En los anexos 1 y 2 se muestran los resultados completos de la búsqueda en Swiss-model de las estructuras seleccionadas.

Definidas las secuencias a utilizar como moldes, se realizó el alineamiento con el programa Toolkit usando el formato Clustal, para verificar el grado de conservación de los aminoácidos. La figura 44 muestra los resultados de los alineamientos con la secuencia de AntP (Figura 44 A) y Pro-ant (Figura 44 B) con las secuencias de los moldes seleccionados. Se pudo observar, indicado en negrita, los residuos de las secuencias alineadas que fueron coincidentes con los de la secuencia de AntP y Pro-ant. Resaltado en verde, se muestran las cadenas plegadas β y en violeta, las hélices α que conforman las estructuras secundarias de las secuencias proteicas comparadas. Estas estructuras presentaron un posicionamiento muy conservado en todas las secuencias de las proteínas analizadas, independientemente de la identidad de los residuos que las componen, presentando todas, un perfil de plegamiento similar.

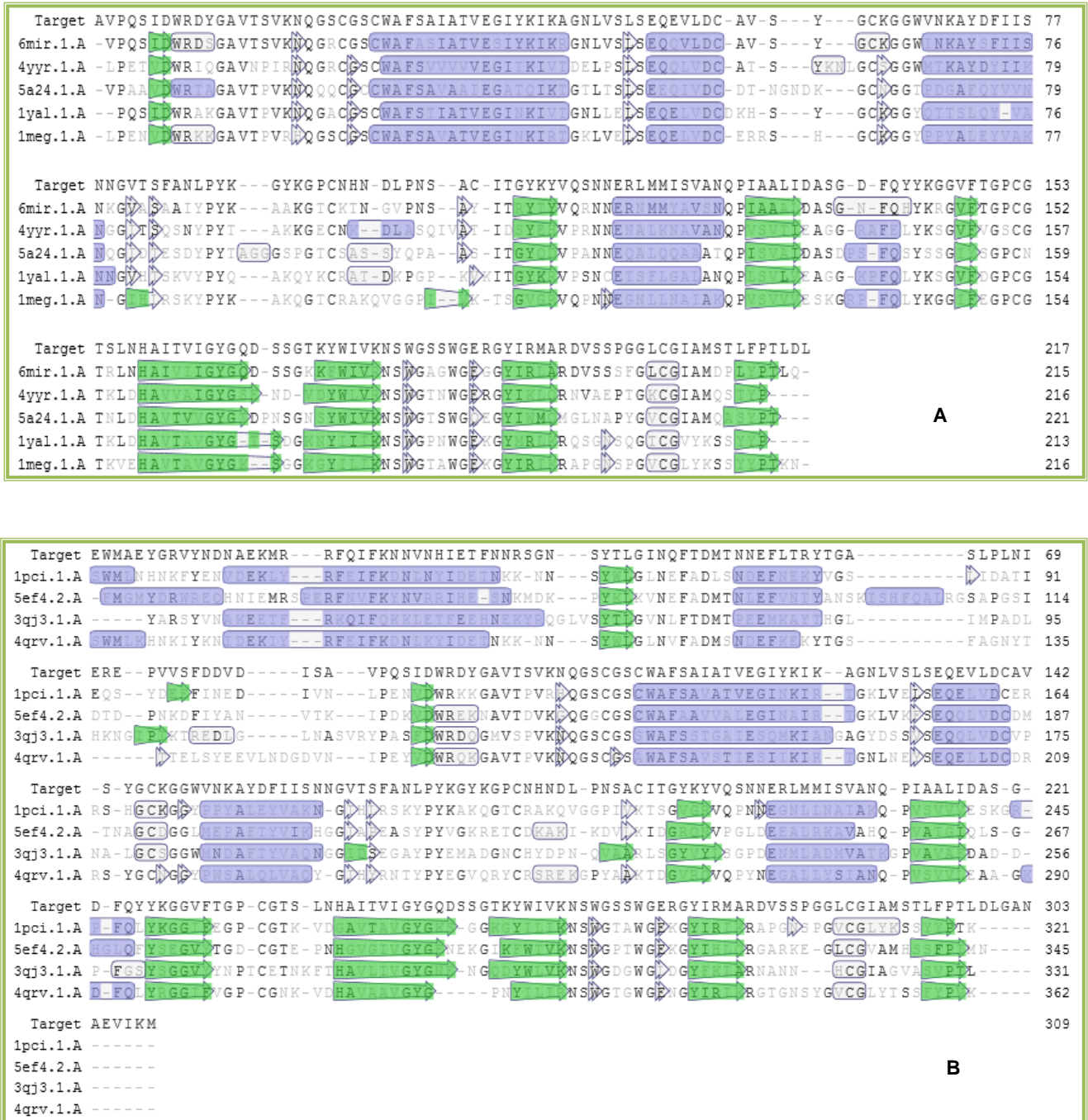


Figura 44. Alineamiento y definición de estructura secundaria de AntP y Pro-ant a partir de las secuencia de referencia Los residuos que se muestran en violeta pertenecen a una región de cadenas β, los que están en verde pertenecen a una hélice α. Los aminoácidos resaltados en negrita son coincidentes en todas las secuencias comparadas.

Con los resultados del alineamiento y teniendo en cuenta los demás parámetros evaluados, se generaron 3 modelos. El primer modelo consideró la secuencia de la peptidasa AntP, utilizando como molde la estructura de Ananaína (PDB: ojk). El segundo modelo generado, correspondió a la secuencia madura de antiacanthaína con el ligando E64, utilizando la estructura de la proteasa

Dionaína 1 (PDB: 5a24) (Risør et al., 2016) como molde. Para generar el molde del tercer modelo, correspondiente a la secuencia Pro-ant, se decidió utilizar la estructura de la peptidasa de polen de ambrosía (PDB: 5ef4) (Groeme et al., 2016).

8.2. Validación y refinado del modelo

Los modelos obtenidos en el paso anterior fueron evaluados en función de la compatibilidad tridimensional del modelo atómico, contra su propia secuencia de aminoácidos (3D-1D) y de los gráficos de Ramachandran a través de los programas Verify_3D (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS>) y PROCHECK, respectivamente Proc. Exp. 19.5.

La figura 45 muestra los gráficos comparativos del posicionamiento de cada residuo de la secuencia de AntP, AntP-E64 y Pro-ant respecto a las coordenadas geométricas de la estructura 3D, obtenidos con VERIFY3D. La figura 45 A muestra el gráfico para el modelo Ant-6ojk. Los resultados del análisis mostraron que el 97,67% de los residuos tiene una puntuación media de compatibilidad 3D – 1D mayor que 0.2, lo que indica que solo el 2.33% de los residuos no complementó el Perfil 3D – 1D. En lo que respecta a la compatibilidad secuencia-estructura se pudo confirmar que el modelo propuesto no viola ninguna restricción de esta naturaleza. Para el modelo Ant-5A24 (Figura 45 B), el 90,67% de los residuos mostro una puntuación mayor a 0,2 y tampoco se observaron residuos que no sean compatibles al modelo. Para la secuencia Pro-ant-5ef4 (Figura 45 C), los residuos que presentaron valores superiores a 0,2 fueron el 85,9%, por lo que también mantuvo la compatibilidad secuencia-estructura. Por tanto para todos los modelos generados a partir de diferentes estructuras cristalinas de peptidasas utilizadas como moldes, se observó una muy buena calidad de los modelos generados

Como segundo criterio de validación de los modelos se realizó el análisis de la calidad estereoquímica de cada residuo mediante gráficos de Ramachandran, utilizando el programa PROCHECK (Figura 46). Los resultados para el modelo Ant-6ojk predijeron que el 89,6% de los residuos están ubicados en la estructura tridimensional, en la posición más favorable y el 10,6% restantes se ubica en una región permitida, no observándose residuos en regiones atípicas o no permitidas (Figura 46 A). Para el modelo Ant-5a24 (Figura 46 B), el gráfico de Ramachandran mostró que el 87,6% de los residuos de esta estructura, están en la región favorecida, el 11,9% en regiones permitidas y un 0,6% en una región generosamente permitida. En la figura 46 C, el gráfico de Ramachandran predijo, para el modelo pro-ant-5ef4, que el 87,5% de los residuos se ubicaron en la región favorecida y los restantes residuos residieron en las regiones permitidas (11,7%), en valores atípicos (0.4%) y en región no permitida (0,4%).

Para todos los casos, los resultados indicaron que las tres estructuras generadas no presentaron restricciones espaciales y se generaron modelos con una buena calidad en el posicionamiento espacial de los residuos. Por tanto sobre la base del análisis de validación y evaluación, se construyó un modelo predecible y razonable de la secuencia madura de Antiacanthaína (AntP), de

AntP-E64 y Pro-ant. La calidad geométrica de las conformaciones de las estructuras primarias, las interacciones de los residuos y los contactos entre los residuos de las estructuras mostraron estar todos dentro de los límites aceptables, establecidos para estructuras confiables

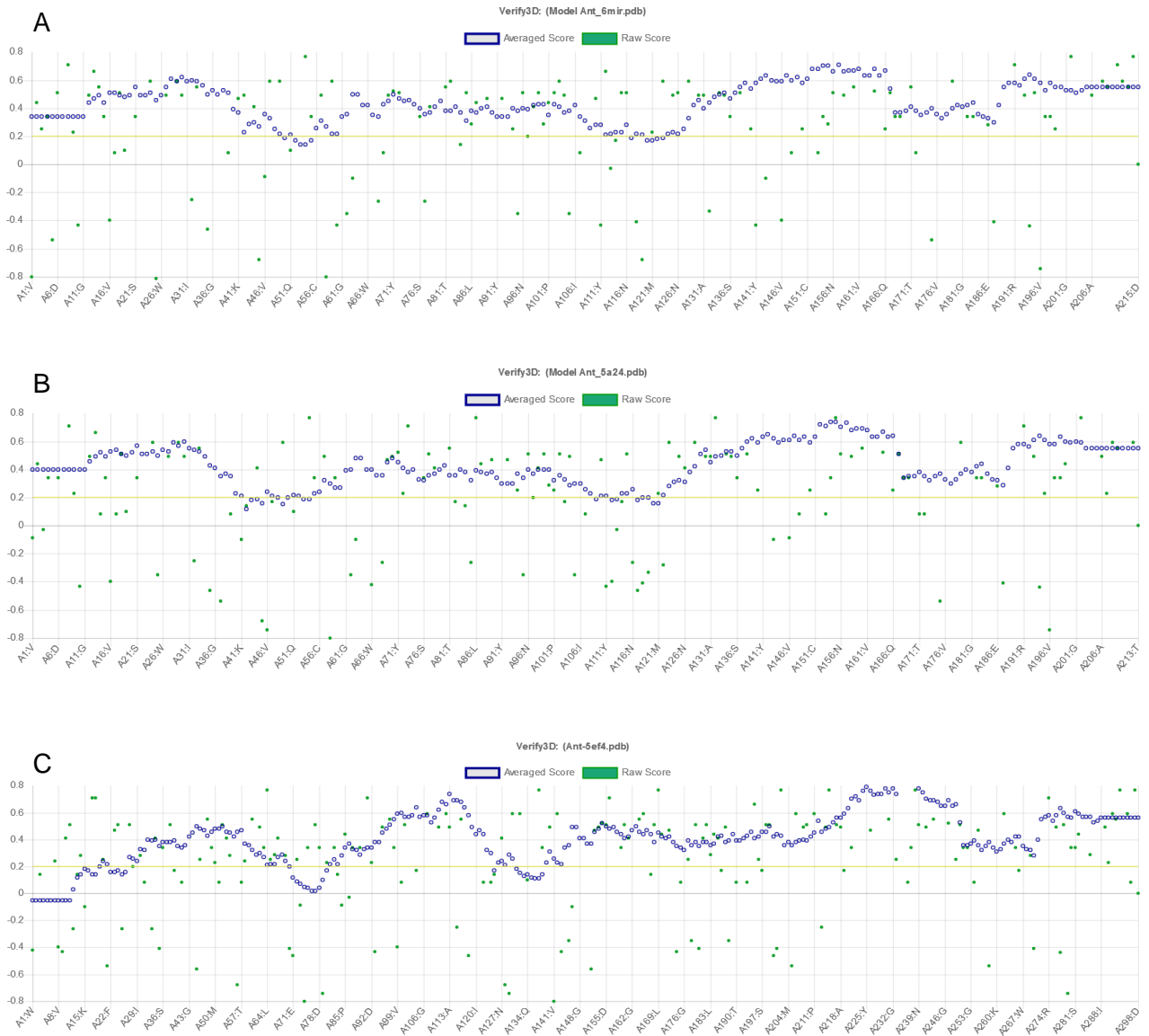


Figura 45. Validación por relación secuencia-estructura de los modelos refinados de AntP (A y B) y secuencia Pro-ant (C). Este gráfico se obtuvo con el programa Verify_3D. Se muestra la puntuación de la compatibilidad estructura-secuencia (3D-1D) obtenida para cada residuo del modelo. La línea en amarillo muestra el rango de valor umbral sobre el que se compara la compatibilidad (por debajo de este valor aparecen los residuos con incompatibilidad 3D-1D)

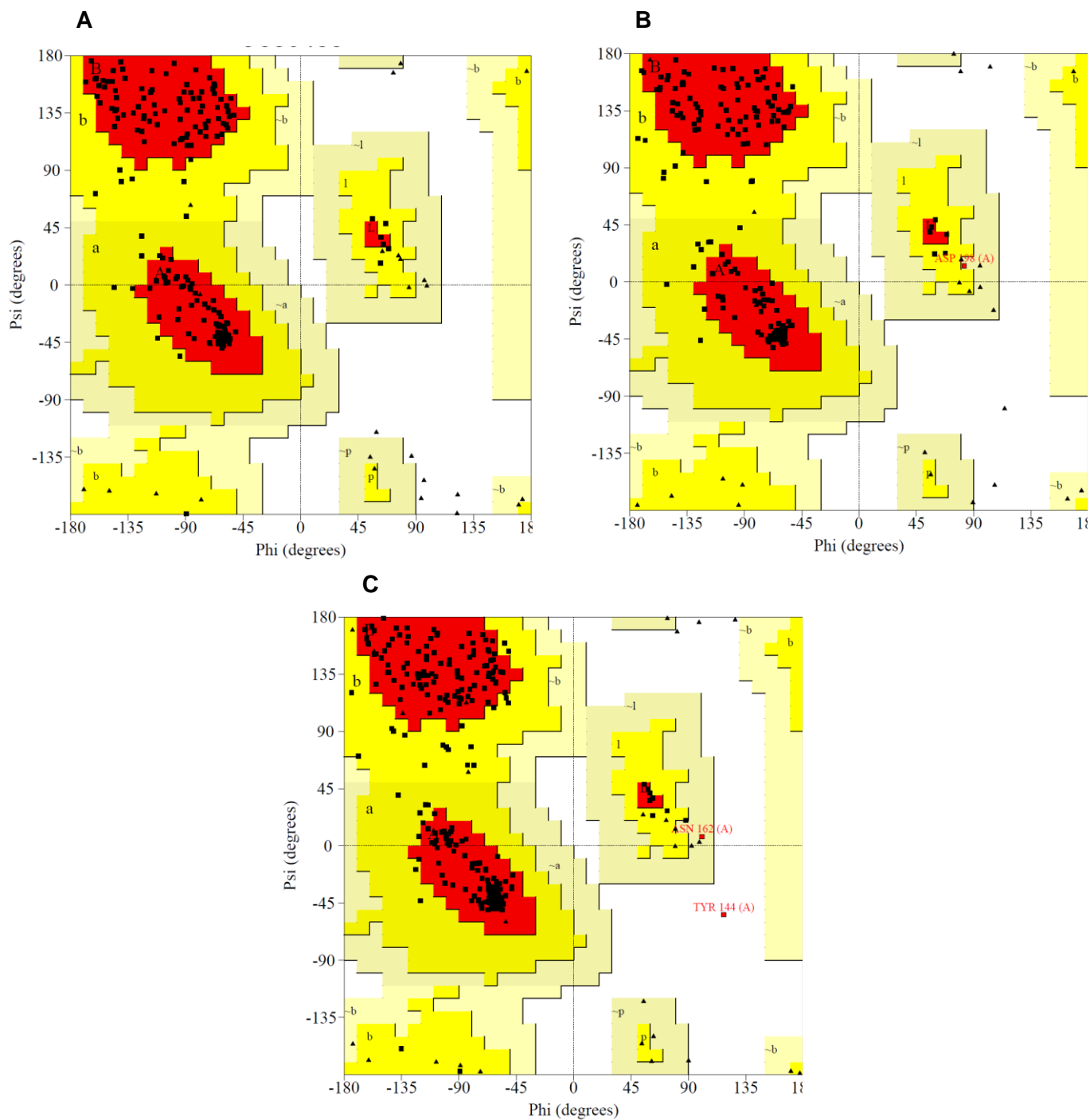


Figura 46. Gráficos de Ramachandran generados por el programa Procheck. A) Gráfico realizado con las coordenadas de la estructura tridimensional del modelo Ant-6ojk. **B)** Grafico de las coordenadas del modelo Ant-5a24 y **C)** Grafico obtenido con las coordenadas de la estructura tridimensional del modelo proant-5ef4.

8.3. Análisis del modelo de la estructura

8.3.1. Secuencia de AntP

Con el fin de proporcionar una perspectiva de las propiedades bioquímicas e investigar más a fondo las relaciones estructura-función, se realizó el análisis de los modelos generados, utilizando el programa Pymol, y se compararon las estructuras de AntP con las estructuras cristalinas de las peptidasas con las cuales se generaron los modelos.

En la figura 47 A se observan los detalles de la estructura del modelo tridimensional de la secuencia madura (activa) de AntP obtenida a partir del modelado con la estructura cristalina de la ananaína (PDB: 6ojk). Se observó que dicha estructura mantuvo la base estructural de las enzimas de la familia C1A, consistente en dos dominios, identificados en color verde, el dominio L y en color azul el dominio R. En la interfase de estos dominios, se identificó claramente la hendidura en forma de V, donde se ubica el sitio activo de la enzima. En la figura 47 B, se muestra la estructura se antiacanthaína definida por sus conformaciones secundarias. Esta figura permitió reconocer la conformación de cada dominio, donde cada segmento está definido, mayoritariamente, por una de las dos estructuras secundarias.

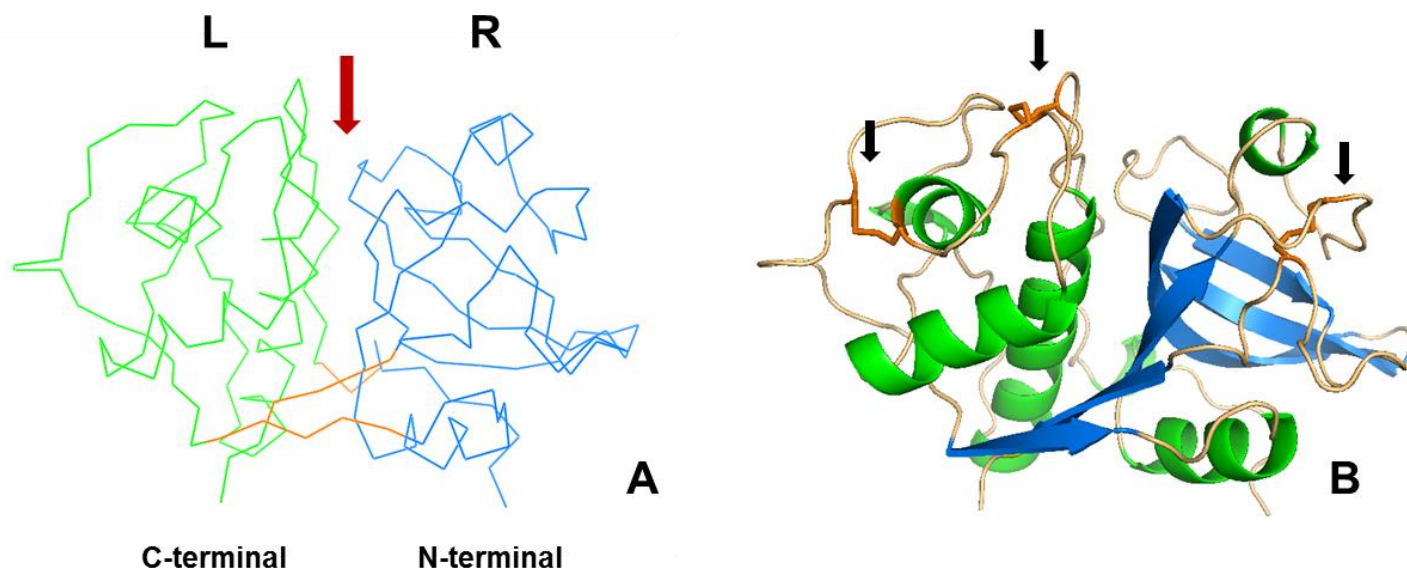


Figura 47. Modelo tridimensional de AntP. A) Diagrama de líneas representando en verde, el dominio L, en azul el dominio R y en naranja conexión interdominios. Con flecha roja se indica la hendidura donde se ubica el sitio catalítico. **B)** Diagrama de cintas representando las estructuras secundarias. En color azul se representan las láminas β , en color verde las hélices α , los puentes disulfuro se representan en color naranja (flechas negras).

El segmento L está formado de loops y hélices α mientras que el segmento R está conformado principalmente por las estructuras de láminas β antiparalelas y loops. Las estructuras de ambos segmentos están estabilizados por la presencia de puentes disulfuro (flechas negras), dos estabilizando la estructuras de hélices α en el segmento L y uno estabilizando las láminas β en el segmento R.

Los parámetros de procesamiento del modelo se ajustaron teniendo en cuenta los apareamientos disulfuro entre las Cys23-Cys63, Cys57-Cys96 y Cys152-Cys204 (numeración correspondiente a antiacanthaína).

Los residuos catalíticos (que actúan específicamente en el ataque nucleofílico y en la escisión del enlace peptídico) de las peptidasas de la familia C1A, donde la papaína es la enzima de referencia, son Cys e His (25 y 159 respectivamente, numeración correspondiente a la papaína) que conforman la díada catalítica. Además de Cys y His, los otros dos residuos, Gln y Asn (19 y 175, numeración de papaína), se han identificado que contribuyen de forma significativa en la catálisis (Rawlings and Barrett, 2013; Ritonja et al., 1989). La función que ha sido asociada a estos residuos, se cree que es para la Gln que precede a la Cys catalítica, la de ayudar a la formación del hueco oxianión, mientras que el residuo de Asn orienta el anillo imidazolio de la His catalítica. Los residuos catalíticos de AntP, formado por la díada Cys26-His158, se sitúan en la apertura de la hendidura, ubicados uno en cada dominio (Figura 48 A). Complementando a estos residuos, cumpliendo una función de estabilización de la catálisis, se ubican los residuos de Gln20-Asn179, también ubicados cada uno en uno de los dominios. Los detalles de la ubicación y distribución de los residuos catalíticos se observan en la figura 48 B.

El rol y la definición de los residuos catalíticos es todavía un tema de discusión entre los investigadores que trabajamos con estas enzimas dado que la conservación y distribución de los mismos no es homogénea. En comparación con Cys e His que sí están presentes en todas las secuencias de peptidasas de la familia Bromeliaceae, los residuos de Gln y Asn no se encuentran tan conservados. Ramli y colaboradores (Ramli et al., 2018), encontraron que algunas secuencias de bromelaína de frutas presentan segmentos, al comienzo de la secuencia N-terminal, que carecen de aproximadamente 12 residuos, entre ellos el sitio donde reside la glutamina (Gln).

Se desconoce si la ausencia de estos residuos afecta la especificidad del sustrato o a la estabilización de los residuos catalíticos. También se ha visto que en una de las secuencias de bromelaína de tallo (ID MEROPS: CAA08861) el residuo de la histidina catalítica (His156, numeración de la papaína) es reemplazado por un residuo de glutamina (Gln).

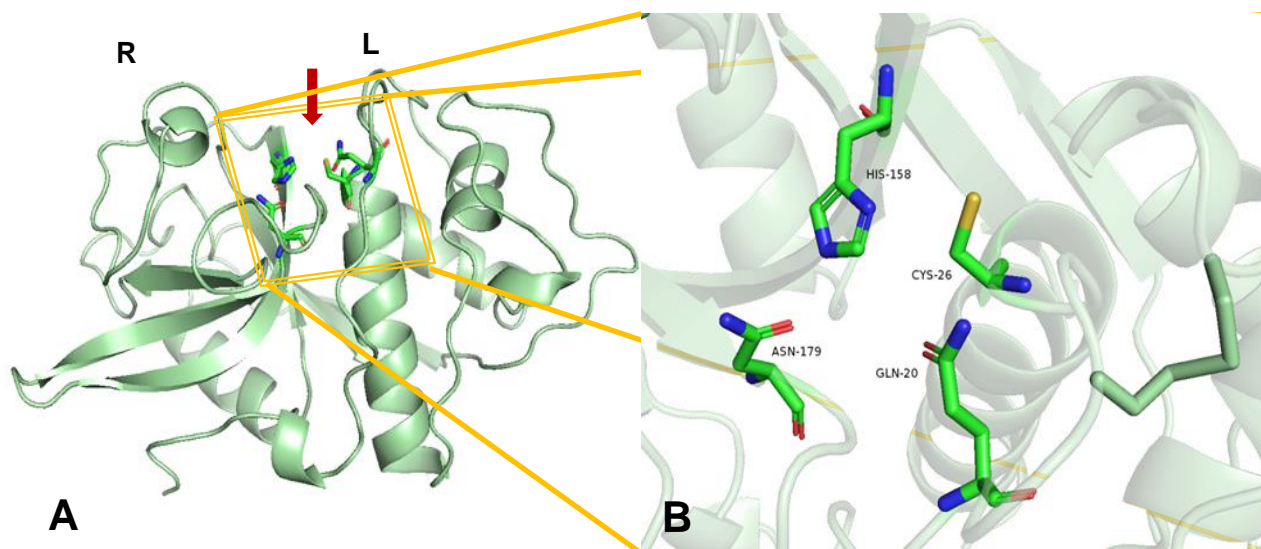


Figura 48. Ubicación de los residuos catalíticos en AntP. **A)** Representación de la estructura tridimensional de la peptidasa, mostrando la ubicación de los residuos catalíticos el comienzo de la hendidura formada a ambos lados de los dominios L y R. **B)** Ubicación de los cuatro residuos catalíticos en el sitio activo. La díada compuesta por los residuos de Cys26-His158 y los residuos de Asn179 y Gln20 asistiendo y estabilizado a los dos primeros.

El residuo de asparagina (Asn, 179 en papaína) se conserva para todas las secuencias de bromelaína alineadas, excepto la bromelaína del tallo P14518 que posee una Lys en la misma posición. El alineamiento por homología de AntP con las secuencias de varias peptidasas de la familia bromeliaceae, mostró que la posición de estos residuos catalíticos son conservados en todas las enzimas evaluadas (Figura 42, resaltado en rojo).

Los valores de r.m.s.d. obtenidos de para la estructura del modelo con cada una de las estructuras de referencia generadas con el programa I-Tasser (6ojk: 0,60, 5a24: 0,82, 1yal: 0,68 y 1meg: 1,09), mostraron una absoluta concordancia con el alineamiento múltiple de las cadenas de C α entre estas mismas, como se observa en la Figura 49 A. Estos resultados aportan una visión estructural a las relaciones evolutivas ya evidenciadas por los estudios de alineamiento de secuencias previamente efectuados.

Las posibilidades que brinda el análisis 3-D permitieron además, visualizar el bolsillo donde se aloja el sitio activo de la enzima, así como un detalle de los residuos aminoacídicos que conforman el mismo y lo conservado del posicionamiento respecto a las estructuras con las cuales fueron evaluadas (Figura 49 B).

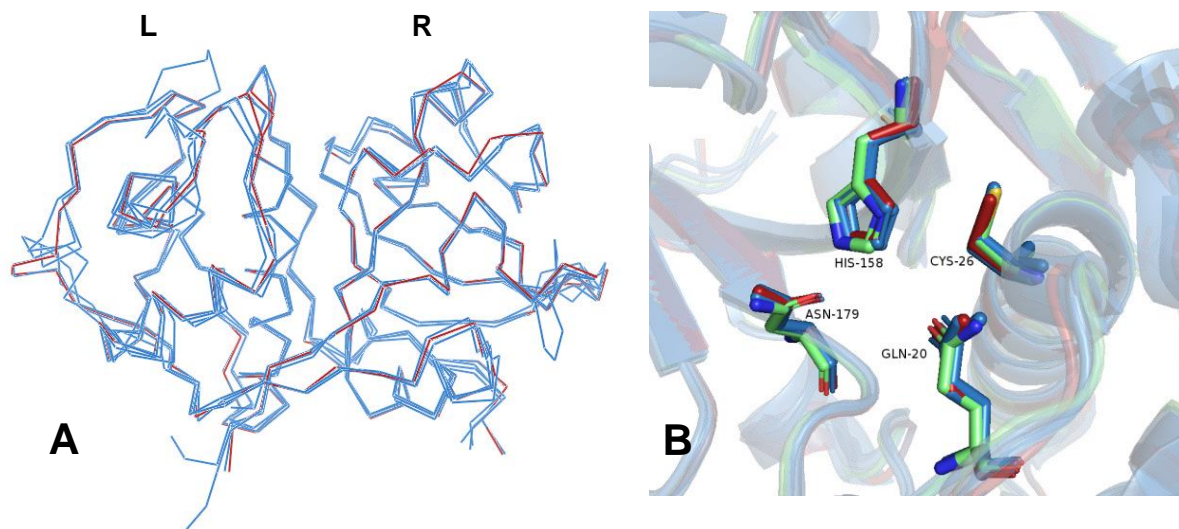


Figura 49. Superposición 3D del modelo de AntP y las estructuras de referencia. A) Se muestra la superposición de las cadenas de C α representadas en diagrama de cinta. Representado en color rojo la estructura modelada de antiacanthaína y en color azul, se representan las estructuras de referencia. **B)** Se muestran los residuos del sitio activo del modelo de Antiacanthaína (celeste) alineados con los residuos del sitio activo de las estructuras de referencia.

La comprensión de la interacción entre la peptidasa y los posibles sustratos es un gran desafío en toda investigación y permite entender varios aspectos relacionados a su especificidad, su acción frente a diferentes residuos y medios de reacción. Siguiendo la nomenclatura de la asignación de sitios de interacción entre un sustrato polipeptídico y la enzima, propuesto por Schechter y Berger, los residuos se enumeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc.

En la figura 50 A se muestra la superficie de AntP, vista desde arriba. Centrado en el dibujo se encuentra la hendidura donde se ubica el sitio activo, interaccionando con el inhibidor E64. La estructura 3D, corresponde al modelo generado con la estructura cristalina de la peptidasa Dionaína (5a24), con la que se estableció la geometría, teniendo en cuenta la interacción con la molécula del inhibidor. En función de la ubicación del inhibidor, se pudieron identificar las distintas regiones que definen los sitios de unión al sustrato. La figura 50 B, muestra la posición del inhibidor y las distancias de interacción con los residuos de AntP. Se pudo observar que los residuos del sustrato se unen a lo largo de la hendidura del sitio activo en una conformación extendida, con las cadenas laterales orientadas alternativamente hacia los dominios L y R.

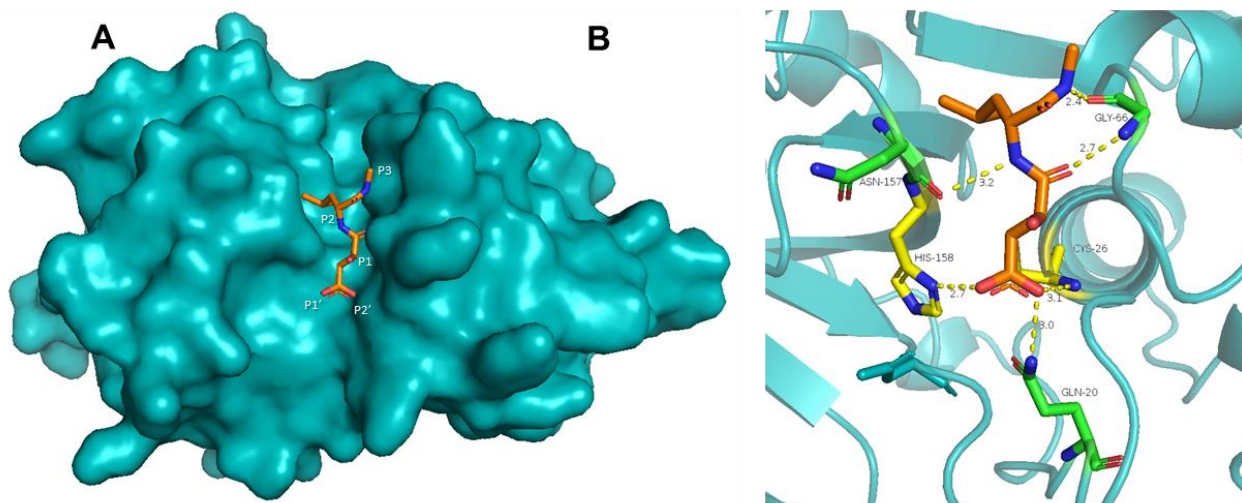


Figura 50. Sitios de unión del sustrato a AntP **A)** Vista desde arriba: unión del sustrato E64 a la hendidura del sitio activo de Antiacanthaína. La geometría de unión del sustrato fue generado en base al modelado con la estructura cristalina del inhibidor y su interacciones con la proteína 5a24. **B)** Se muestran las distancias de interacción de los residuos del sitio activo del modelo de Antiacanthaína con el sustrato E64.

Los residuos P2, P1 y P1' se unen en sitios de unión bien definidos. Se pudo percibir que el posicionamiento de estos residuos se rige por interacciones que involucran tanto los átomos de la cadena principal como los de la cadena lateral de la enzima y el sustrato.

El sitio de unión S2 es en realidad el único bolsillo que presenta una hendidura profunda, siendo además en las enzimas de esta familia, quien rige la especificidad de sustrato, mientras que los sitios S1 y S1' proporcionan una superficie de unión. El posicionamiento del residuo P3 está mediado solamente por interacciones de cadena lateral. Por esta razón, las geometrías de unión de estas últimas están dispersas en un área amplia y son únicas para cada par proteasa-sustrato.

Otro aspecto importante que se definió, fue el potencial electrostático de superficie. Para el cálculo de dicho potencial se utilizó el programa APBS (Adaptative Poisson-Boltzman Solver) incluido en Pymol, que permitió refinar el mapa de superficie generado a partir de la secuencia de la proteína. Este mapa del potencial, muestra en color rojo las regiones con carga negativa, azul las regiones de carga positiva y blanco las neutras, permitiendo identificar la nucleofilicidad y electrofilicidad de las diferentes regiones de la superficie de la molécula.

Estos aspectos son fundamentales para entender la función biológica y las características particulares de cada proteasa en relación a la especificidad de sustrato. En la figura 51, se

observan los potenciales electrostáticos de superficie de 4 peptidasas: AntP, ananaína (6ojk), dionaína I (5a24) y quimiopapaína (1yal).

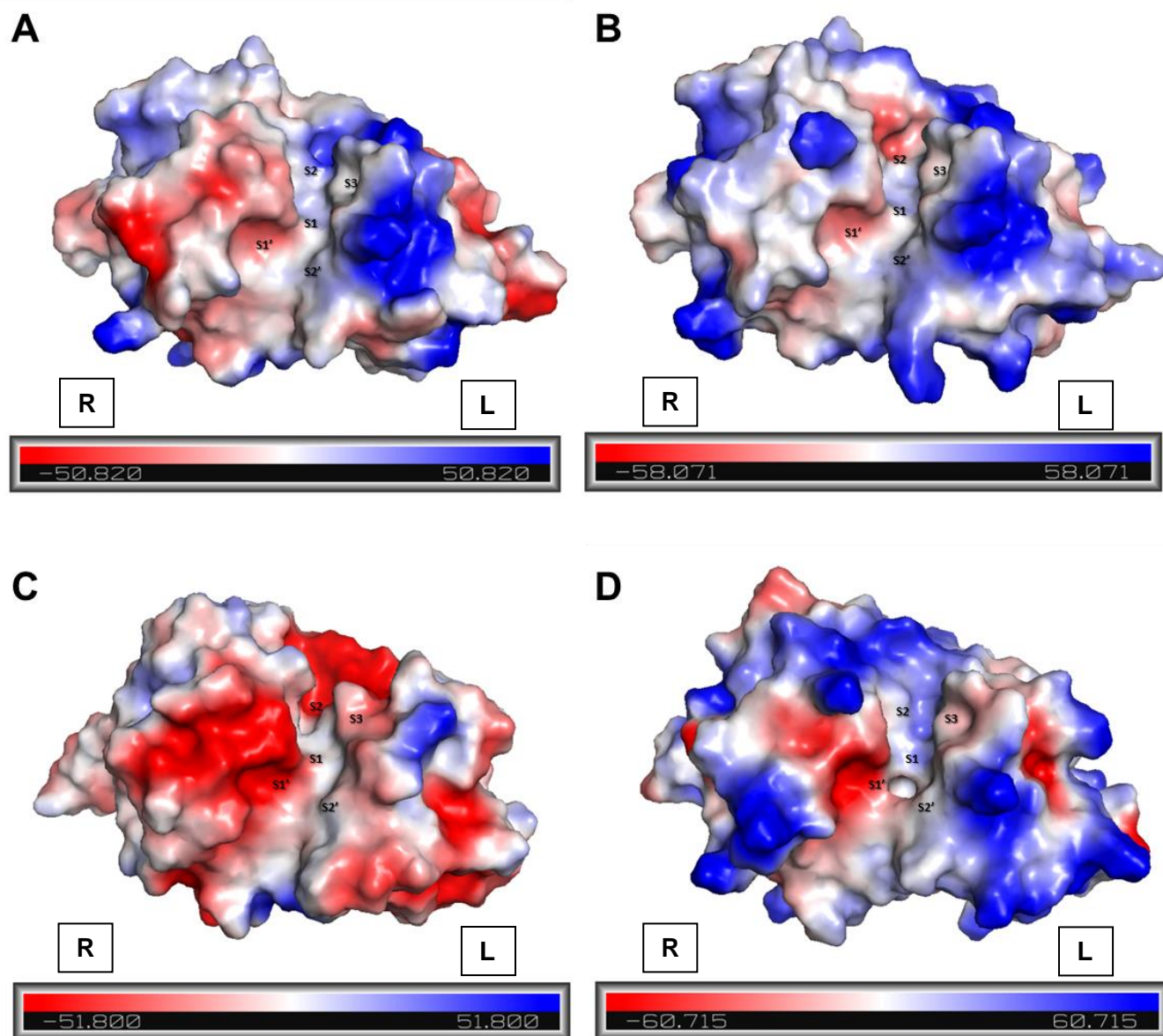


Figura 51. Potencial electrostático de superficie calculado con el programa APBS (Adaptative Poisson-Boltzman Solver) y posición de los sitios de unión al sustrato A) AntP, B) Ananaína (6ojk) C) Dionaína I (5a24) D) Quimiopapaína (1yal). Posicionado en el centro (correspondiente a la hendidura del centro activo) se indica las diferentes regiones correspondiente a los sitios de unión al sustrato.

Resultan bastante claras las diferencias en la carga superficial de estas enzimas. Para la AntP (Figura 51 A), se pudo observar que el dominio R presenta, adyacente al surco del sitio activo, regiones con potencial electrostático negativo, mientras que el dominio L, mostró un potencial

positivo adyacente al sitio activo. Las diferentes posiciones donde se une el sustrato al sitio activo, está dominado principalmente por regiones neutras lo que es acorde a la amplia especificidad que presenta esta enzima.

Comparado con la estructura de Ananaína (Figura 51 B), lo que más resaltó fue que el dominio R está dominado por una región neutra y algunos sectores con carga positiva. En el sitio activo, al final del subsitio S2, mostró una región de potencial negativo, siendo que en AntP esta región está dominada por cargas positivas. La figura 51 C, muestra el potencial de la Dionaína I, que resalta por presentar de forma mayoritaria un potencial negativo rodeando el sitio activo, mientras que la quimiopapaína (Figura 51 D) mostró un potencial positivo alrededor del sitio activo, exceptuando la región correspondiente al S1' que presentó un potencial negativo, al igual que las otras tres peptidasas. Estas diferencias en su perfil de cargas, define de cierta forma las capacidades de interactuar con los diferentes aminoácidos que componen las proteínas y perfilan las afinidades mostradas de cada una de estas enzimas.

8.3.2. Secuencia Pro de antiacanthaína

El último aspecto que se decidió estudiar, fue la conformación estructural de la secuencia Pro-antiacanthaína, conocida como zimógeno o estructura inactiva de la peptidasa. La estructura y motivos definidos de la región Pro, se visualizan en la figura 52. Como ya se ha descrito, el dominio I29, como es denominado por MEROPS, contiene la secuencia que actúa como inhibitoria de la actividad de la enzima. El pro-péptido de antiacanthaína, está conformado por tres hélices α , y varias regiones sin conformación definida, en las que se ubica el motivo GxNxFxD, resaltado en azul. El otro motivo altamente conservado en dicho dominio, fue la secuencia ERFNIN, mostrada en color amarillo. Este motivo forma parte de la hélice α H2 y como se ha mencionado anteriormente, el papel principal es restringir la disposición tridimensional de las tres hélices del dominio Pro en una conformación globular.

La secuencia pro-antiacanthaína contiene además una extensión en la región C-terminal que también forma parte de la dominio pro. Esta misma extensión de la región C-terminal la presentan las pro-peptidasas de *A. comosus* pero no está presente en secuencias altamente relacionada a pro-papaina (Aich and Biswas, 2018). Esta extensión podría estar involucrada en la localización o escisión autocatalítica. Las alineaciones de secuencia con más de otras 50 cisteín proteasas de plantas, hongos y animales no permitieron una predicción funcional.

Se pudo apreciar también que la cadena pro N-terminal se ubica en la superficie de la enzima en una conformación extendida y se posiciona a través de la hendidura del sitio activo en dirección opuesta al sustrato, bloqueando así el acceso de este último al sitio activo (Figura 52). En la

estructura de la mayoría de las pro-enzimas, los contactos entre el segmento Pro N-terminal y resto de la molécula de la peptidasa (que conforma la estructura activa) se generan a través de las interacciones hidrofóbicas, puentes salinos y enlaces de hidrógeno.

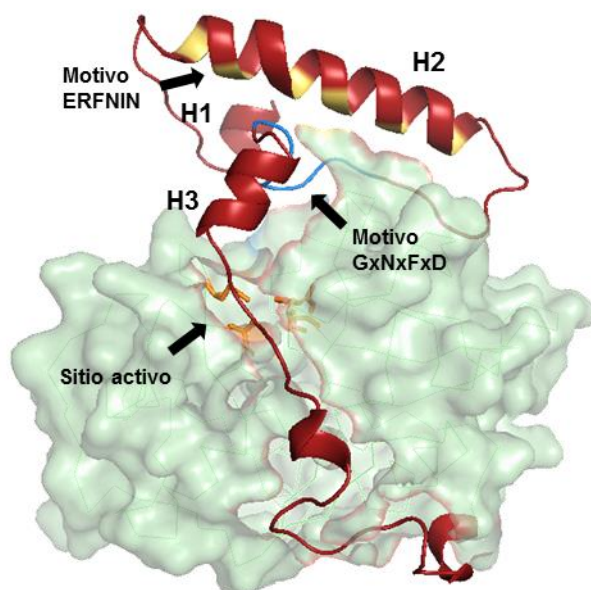


Figura 52. Estructura tridimensional de la secuencia pro-antiacanthaína El dominio catalítico se representa en verde claro, resaltado en naranja los residuos del sitio activo. En color rojo se indica el dominio I29 (secuencia pro). Los motivos conservados del dominio pro se indican en amarillo, motivo ERFNIN ubicado en hélice H2 y en azul el motivo GxNxFxD.

Se ha demostrado *in vitro*, que los pro-péptidos, luego de liberados durante el procesamiento de las catepsinas cisteínicas, son potentes inhibidores de sus enzimas afines (Turk et al., 2012).

La figura 53 muestra el alineamiento de proantiacanthaína con las estructuras cristalinas de las peptidasas utilizadas como moldes para la generación del modelo de Pro-ant (ambrosia a. 5ef4: catepsina L, 3qj3: procaricaína 1pci y papaína, 4qrv).

Se evidenció claramente la conservación del patrón estructural del dominio I29, con la región extendida ocluyendo la hendidura que conforma el sitio activo de la AntP y la región de hélices α que forma la zona globular del dominio. La hélice H1, presentó en las distintas estructuras analizadas, tamaños de segmento diferentes y en alguna de las estructuras no se visualizó. En muchas de estas estructuras, las regiones de señalización de localización celular o secreción se ubican hacia el extremo N-terminal de la hélice H1 del propéptido. La escisión del péptido señal (pre-propéptido) en el extremo N-terminal del precursor inactivo se produce durante el paso al retículo endoplásmico de la peptidasa en formación. El pro-péptido funciona, luego de la escisión

del péptido señal, como una chaperona intramolecular que cataliza el plegamiento del dominio catalítico de la proteasa (Aich and Biswas, 2018).

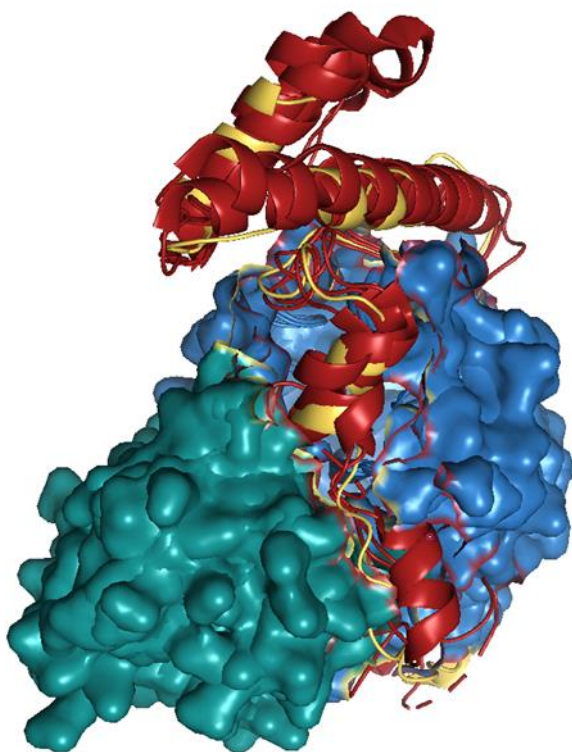


Figura 53. Estructura tridimensional de la secuencia pro-antiacantháina Como diagrama de superficie se muestra el dominio catalítico, representado en color verde el subdominio L, en azul el subdominio R. El dominio I29 se muestra en color rojo para las estructuras de las secuencias utilizadas como molde (5ef4, 3qj3 y 4qrv). En amarillo está el dominio pro de antiacantháina.

Llegado a este punto se ha logrado obtener un cúmulo de información suficiente para poder afirmar que la secuencia nucleotídica obtenida a partir del ADNc de frutos maduros de *Bromelia antiacantha*, corresponde a una pro-enzima constituida por 301 residuos aminoacídicos. En su secuencia se pudieron identificar todos los elementos característicos de la subfamilia C1A de las endopeptidasas cisteínicas; los motivos ERFNIN y GNFD del propéptido, la díada catalítica Cys26/His158 y los residuos Gln20 y Asn179 que participan de la catálisis, como así también los tres puentes disulfuro que confieren estabilidad a la molécula. Por todo ello proantiacantháina fue identificada como un nuevo miembro de la subfamilia C1A, representada por papaína.

VI – EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES APLICACIONES

1. EVALUACIÓN DE LAS POSIBLES APLICACIONES

En el transcurso de esta tesis, el conocimiento de la composición enzimática, estudios de las propiedades bioquímicas y otras características particulares de las enzimas proteolíticas presentes en extracto de frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol., permitió explorar diferentes aplicaciones de las mismas.

Varios de estos trabajos no fueron abordados en el marco de esta tesis, pero fueron fundamentales los datos que se fueron recabando en la misma tanto para el diseño como el uso de las mismas.

En algunos de estos desarrollos hubo una participación directa tanto en el diseño como en la ejecución de las tareas experimentales. En otros, los resultados obtenidos fueron la base para su desarrollo.

Se hará una breve reseña de las aplicaciones realizadas:

1.1. Búsqueda de péptidos antihipertensivos por hidrólisis de proteínas de lactosuero.

Este tema se enmarcó en el proyecto de Tesis, defendida en el año 2017 por la Dra. Carolina Villadóniga.

En el desarrollo experimental se utilizó el preparado parcialmente purificado, Antiacanthaína, para la hidrólisis de las proteínas lácteas. Los resultados relevantes del estudio previo del preparado enzimático y que fueron parte esencial en el desarrollo de las estrategias de hidrólisis de estas proteínas fueron, primero, que se trataba de una nueva fuente de biocatalizadores proteolíticos, proveniente de flora autóctona y no reportada hasta ese momento. Segundo, los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de estas peptidasas fueron vitales en el diseño del trabajo.

Se conocía la gran estabilidad de estas enzimas, que mantenían más del 80% de la actividad proteolítica en un amplio rango de pH, lo que fue fundamental en la estrategia de hidrólisis selectiva respecto a las proteínas del lactosuero, además de su performance a distintas temperaturas en las que se realizó la acción enzimática. Fueron relevantes también los resultados del estudio de especificidad de corte de estas peptidasas, donde se demostró la amplia capacidad hidrolítica que mostró el preparado de Antiacanthaína.

Se obtuvieron fragmentos peptídicos, producto de la hidrólisis, que presentaron actividad antihipertensiva. Estos resultados han dado lugar a un trabajo publicado (Villadóniga et al., 2018) y están en preparación otros.

1.2. Hidrólisis controlada de tejidos para uso en entomología

Se utilizó el extracto crudo de *B. antiacantha* para la hidrólisis de tejidos blandos que rodean los órganos esclerotizados de arácnidos para los estudios entomológicos de distintas estructuras como los órganos reproductivos. Esta acción sirve para “limpiar” los órganos en estudio de este tejido blando permitiendo observar e identificar estructuras pequeñas por microscopía electrónica de barrido (SEM) o microscopía óptica.

La hipótesis para este desarrollo estuvo fundamentada por los resultados ya probados, de otros preparados proteolíticos, en el desbridamiento o aseo quirúrgico (eliminación del tejido muerto, dañado o infectado) (Hebda et al.,1998; Muhammad Z. et al., 2017).

En el diseño se buscó que el procedimiento fuera sencillo, rápido y económico. Se pensó como una opción a las técnicas convencionales que utilizan agentes químicos más agresivos con los tejidos y el medio ambiente.

Como resultado, se realizaron varias ponencias en congresos nacionales y regionales y la publicación en revista internacional (Macció et al., 2013) (Anexo 4).

1.3. Valorización de los subproductos de la fruta de *Bromelia antiacantha* Bertol.: Obtención de proteasa y su potencial como aditivo para detergentes para ropa.

Este trabajo se enmarcó en un proyecto de colaboración con el Laboratorio de Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Argentina, grupo de investigación liderado por la Dra. Sonia Barberis.

Para la planificación de este desarrollo nos basamos nuevamente en la gran estabilidad presentada por el preparado parcialmente purificado, Antiacanthaína, a diferentes condiciones de pH, temperatura y agentes químicos como Urea, cloruro de guanidinio y SDS.

Como objetivo nos planteamos evaluar al preparado parcialmente purificado Antiacanthaína, como potencial aditivo enzimático en formulaciones de detergentes para uso en lavandería.

Los resultados obtenidos, fueron presentados en varios congresos regionales y dio lugar a una publicación en revista internacional (Bersi et al., 2019) (Anexo 4).

1.4. Adsorción en soportes sólidos

La adsorción de las enzimas en soportes sólidos, principalmente alúmina (óxido de aluminio) y actualmente en nanopartículas metálicas, ha sido estudiada y desarrollada en nuestro grupo de investigación.

Los objetivos buscados con esta práctica han sido los de obtener preparaciones enzimáticas que puedan ser removidas de la mezcla de reacción, sin necesidad de una inactivación por cambios drásticos en el medio y además que tengan la capacidad de ser reutilizadas. Elementos tendientes a disminuir costos productivos, valorización de productos y mejor control de procesos.

En esta línea, se realizaron estudios con Antiacanthaína (preparado parcialmente purificado), adsorbiéndola en ambos soportes, alúmina y nanopartículas.

El desarrollo experimental fue realizado por la Lic. Shirley Furtado, como tesina final para optar al título de Licenciada en Química. y dio lugar a una publicación en revista arbitrada (Furtado et al., 2018).

Los resultados mostraron datos promisorios en la utilización de estos soportes como una forma alternativa de uso de estos biocatalizadores

1.5. Síntesis enzimática en medios no convencionales

Otra de las acciones que se vienen desarrollando tanto con el preparado parcialmente purificado, Antiacanthaína, como con las enzimas purificadas (AntA, B y C), es la síntesis de péptidos en medios no convencionales.

Esta tarea se viene realizando junto con el grupo de investigación de San Luis (Argentina)

El principal interés en la biocatálisis en fase no acuosa, se ha centrado en la especificidad de las enzimas, la transformación de sustratos inestables o poco solubles en agua y en la ausencia de contaminación bacteriana. Estas características son muy importantes para utilizar proteasas como catalizadores en la síntesis de péptidos con diferentes actividades biológicas (péptidos bioactivos).

VII - CONCLUSIONES

1. OBTENCIÓN DE Antiacanthaína

En el presente trabajo se reporta la extracción, purificación, caracterización bioquímica y estructural de proteasas presentes en frutos bien desarrollados y maduros de *Bromelia antiacantha* (Bertol.) (*Bromeliaceae*), especie conocida en nuestro país como “gravatá” o “banana do mato”. La especie, perteneciente a la familia de las Bromeliaceae, es una planta autóctona. Se ubica a lo largo de la mata atlántica, desde Río de Janeiro, Brasil descendiendo hasta la región noreste del Uruguay. En particular para este trabajo los frutos fueron colectados en la colonia de vacaciones Don Bosco, ruta 16 Km 21500 Laguna Negra, Castillo, departamento de Rocha.

Los extractos de frutos maduros (EC rindieron un contenido de proteínas de 0,02% ($0,22 \pm 0,02$ mg/g de peso fresco de frutos). La actividad proteolítica de los extractos fue de $9,0 \pm 0,2$ U_{Azocas} por gramo de frutos. Dado el elevado contenido de azúcares, así como a la presencia de compuestos hidrosolubles de naturaleza fenólica, el extracto fue parcialmente purificado por precipitación con cuatro volúmenes de acetona. Esto permitió la eliminación de los azúcares solubles y de los compuestos fenólicos, proveyendo un extracto parcialmente purificado que mantiene el 96 % del total de proteínas y 94 % de la actividad proteolítica del EC. Presentó por IEF cuatro bandas con actividad proteolítica de pI: 7,6; 8,2; 8,8 y mayor a 9,0. El extracto fue denominado Antiacanthaína (Ant).

2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

Por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando la matriz Hi-trap SP-HP, se obtuvieron tres picos bien definidos cuyas fracciones presentaron actividad proteolítica y se denominaron antiacanthaína A (AntA), antiacanthaína B (AntB) y antiacanthaína C (AntC). El procedimiento de la purificación permitió recuperar un 44% de la actividad inicial, siendo AntA la fracción que presentó el mayor porcentaje, con 20%, AntC con un 13% y AntB con un 11%.

La homogeneidad de las enzimas purificadas fue confirmada por diferentes técnicas electroforéticas: PAGE, Tricine-SDS-PAGE, isoelectroenfoque y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Para las tres peptidasas aisladas, se observó que presentan 2 isoformas de diferente pI pero una misma masa molecular, hecho que ha sido constatado en casi todas las peptidasas aisladas de la misma familia botánica y se cree que es debido a modificaciones químicas en los residuos aminoacídicos de la peptidasa, que afectan la carga neta de la misma pero no su PM. Para AntA, los resultados indicaron que es una peptidasa con dos isoformas de pI 7,4 y 8,0 y masa molecular determinada por espectrometría de masas de 23.300 Da. La peptidasa AntB, presentó dos bandas proteicas de pI 8,2 y 8,7 y masa molecular de 23.474 Da y AntC estaría conformado por dos isoformas de pI de 8,9 y >9 y masa molecular de 23.932 Da.

La técnica modificada de Schiff, aplicada a geles de poliacrilamida conteniendo las fracciones purificadas, dio resultado negativo, evidenciando el carácter no glicoproteico de las enzimas.

Las tres peptidasas mostraron una actividad >80% en un amplio rango de pH (5-10). Todas mostraron el valor óptimo a pH alcalinos, siendo AntA la que mostró su mejor performance a pH 9 mientras que AntB y AntC presentaron mayor actividad a pH 8,5. AntC mostró también un pico de actividad, aunque de menor valor, a pH 6. Si bien estos resultados muestran una diferencia respecto al EC que mostró la mayor actividad a pH 6, estas diferencias han sido reportadas para otras peptidasas.

La actividad máxima de AntA, AntB y AntC se obtuvo a temperaturas mayores a 60 ° C, lo que estaría indicando una estabilidad estructural que las mantienen activas en estas condiciones. AntA, mostró la máxima actividad en los ensayos realizados a 70°C, mientras que AntB y AntC, mostraron ambas su mayor actividad a una temperatura levemente inferior, a 65°C. Nuevamente las enzimas aisladas muestran mejor desempeño que formando parte del EC, en el que se registró el máximo de actividad a 60°C.

La estabilidad estructural, evaluada por el mantenimiento de la actividad catalítica, también fue demostrada al estudiar la acción de agentes caotrópicos, urea y GndHCl. En estos ensayos, tanto AntA como AntB (las únicas peptidasas ensayadas), mostraron no solo ser estables a lo largo del tiempo (1080min) cuando fueron incubadas con 8M de Urea y 6M de GndHC sino que en el caso de AntB, mostraron un efecto activador de la acción proteolítica. Estos resultados han sido determinantes en la elección de estas enzimas para evaluarlas como aditivos enzimáticos para detergentes de lavandería.

Las tres fracciones enzimáticas mostraron un porcentaje de enzima activa entre 50 y 60% cuando se titularon con el inhibidor específico para cisteín peptidasas E64. Teniendo en cuenta esta característica, se realizaron ensayos cinéticos con los sustratos PFLNA (específico para cisteín peptidasas) y z-Lys-oNp (específico para bromelaína de tallo).

Los resultados de los estudios cinéticos con el sustrato PFLNA, mostraron para las tres enzimas una afinidad por el sustrato similar: AntA ($K_m = 0,203 \text{ mM}$), AntB ($K_m = 0,126 \text{ mM}$) y AntC ($K_m = 0,140 \text{ mM}$). La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) fue dos veces superior en AntC ($900 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) respecto a AntA ($470 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) y AntB quien mostró una eficiencia 10 veces menor ($87 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). Para los estudios cinéticos utilizando el sustrato z-Lys-oNp, AntA y AntB mostraron afinidades similares ($K_m = 0,86$ y $0,65 \text{ mM}$) pero una mayor eficiencia catalítica de AntA ($6376 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) respecto a AntB ($3050 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$). AntC no mostró actividad frente a este sustrato, evidenciado características diferenciales del sitio activo de las peptidasas estudiadas.

En la búsqueda de mayor información respecto a las diferencias de las peptidasas AntA, AntB y AntC, se realizaron estudios de especificidad de sustrato utilizando la cadena β de la insulina. Los fragmentos resultantes de la hidrólisis de este sustrato, a diferentes tiempos, con AntA, AntB y AntC, se analizaron por espectrometría de masas. El análisis de los fragmentos permitió identificar

los diferentes sitios de corte para cada una de las enzimas. Luego de 16 hs de hidrólisis, utilizando AntA, se obtuvieron 11 sitios de corte, para AntB, 16 sitios de corte y para AntC, 8 sitios de corte de la cadena β de la insulina. De estos sitios, en la mayoría correspondió a un residuo hidrofóbico en la posición S2 (8 para AntA, 11 para AntB y 5 para AntC) Siendo esta una característica distintiva de las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1A.

Las secuencias N-terminales AntA y B se obtuvieron por secuenciación de Edman. Los resultados mostraron un 100% de identidad de secuencia para los 13 residuos N-terminal de ambas enzimas.

El análisis de similitud de secuencia en la región N-terminal, fue mayor al 80% para proteasas de la familia botánica de la que derivan (Bromeliaceae). Este alto porcentaje también se correlaciona con la alta conservación de varios residuos ubicados en esta región que las identifican dentro del clan CA y de la familia C1 (papaína).

Los spot de proteínas de las tres peptidasas, obtenidas por electroforesis 2D, fueron digeridas con tripsina y los fragmentos separados por espectrometría de masas Maldi-TOF MS/MS. El análisis, de los fragmentos utilizando el servidor Mascot, permitió identificar varias secuencias que alineadas con peptidasas de referencia permitió conocer su ubicación en la cadena polipeptídica, incluidos fragmentos correspondientes a regiones de las proenzimas (zimógenos).

3. OBTENCIÓN POR CLONADO DE ADNc PARA UNA PEPTIDASA Y PRO-PEPTIDASA

Con el propósito de conocer la secuencia completa de la/s enzima/s purificada/s, se procedió a clonar la secuencia que codifica para dichas enzimas empleando como material de partida el ARN total extraído de la pulpa de frutos maduros de *Bromelia antiacantha*. Con los datos de las digestiones tríplicas se diseñaron los cebadores específicos para obtener secuencias de la enzima madura y de la pro enzima. Mediante RT-PCR y PCR se obtuvieron dos fragmentos del ADNc que codifican para la enzima madura y la pro-enzima. El ADNc así obtenido fue luego clonado en *Escherichia coli* utilizando el vector Zero Blunt® TOPO®, PCR Cloning Kit (Invitrogen) y finalmente secuenciado. Dado que solo se obtuvo una secuencia para la peptidasa madura y para la pro-enzima, no se pudo identificar a cuál de las tres peptidasas purificadas correspondía, se decidió denominar a dichas secuencias como AntP y Pro-ant.

La secuencia obtenida para AntP está constituida por 884 nucleótidos, de los cuales los 690 previos al codón TGA ("stop") codifican para 230 aminoácidos. Esta secuencia fue analizada por Protein-BLAST dando como resultado de la búsqueda, más de 100 secuencias de peptidasas pertenecientes a la familia C1A con un porcentaje de identidad superior al 55%. De este grupo, 20 secuencias presentaron un alto grado de identidad, entre el 70 y 92% para AntP. De los 230 aminoácidos, los 13 finales de la región C-terminal fueron identificados como segmento de la pro-enzima. Por tanto, la secuencia correspondiente AntP, está conformada por 217 aminoácidos.

La secuencia obtenida que codifica para Pro-ant, está formada por 940 nucleótidos previos al condón de stop (TGA) que se tradujo en una proteína compuesta por 313 aminoácidos. Los primeros 83 aminoácidos, sobre la región N-terminal y los 13 sobre la región C-terminal, corresponden a la región pro-enzima

Los análisis de identidad de secuencia identificaron más de 100 pro-peptidasas con más de 40% de homología. En dicha región, se identificó un dominio conocido como I29 (MEROPS) que actúa como propéptido, bloqueando la entrada del sustrato y manteniendo inactiva la enzima. También se identificaron dos secuencias altamente conservadas el motivo ERFNIN y el motivo GxNxFxD.

4. MODELADO PARA LAS ESTRUCTURAS 3D DE AntP Y Pro-ant.

A partir de la secuencia primaria de AntP y Pro-ant, se construyeron los modelos moleculares. Utilizando diferentes herramientas bioinformáticas se obtuvieron, a partir de las estructuras de proteínas cristalizadas, los moldes con los que se generaron los modelos para ambas secuencias. Se evaluó la calidad de los modelos y se generaron las estructuras que fueron visualizadas utilizando Pymol.

Se construyeron, con una buena calidad los modelos para ambas secuencias, donde se pudieron visualizar las características estructurales de las peptidasas cisteínicas de la familia C1A.

La estructura obtenida para AntP, está conformada por dos dominios. En dicha interfase y ubicados en el dominio L, se encuentran los residuos catalíticos Gln20 y Cys26. Los mismos están estabilizados por la presencia de dos puentes disulfuro (Cys23-Cys63 y Cys57-Cys965). En la misma interfase y ubicados en el dominio R, se ubican los residuos catalíticos His158 y Asn180. Este dominio, está estabilizado por un puente disulfuro entre la Cys152 y la Cys204.

El análisis del potencial electrostático de superficie de AntP mostró en el dominio R, adyacente al surco del sitio activo, regiones con potencial electrostático negativo, conformado por el subsitio S2'. El dominio L, mostró un potencial positivo adyacente al sitio activo, pudiendo estar implicado en el reconocimiento del sustrato sobre el subsitio S3. Las diferentes posiciones donde se une el sustrato al sitio activo (S2, S1 y S1'), está dominado principalmente por regiones neutras lo que es acorde a la amplia especificidad que presentan estas enzimas.

El modelado de pro-antiacanthaína, mostró la estructura y ubicación de los dominios pro (N y C terminal). La estructura de la región N-terminal fue la única que pudo visualizarse ya que las estructuras cristalinas con las que se generó el modelo, no presentan la región pro del C-terminal (región conservada en familia Bromeliaceae). El pro-péptido N-terminal tiene una conformación extendida que se sitúa a lo largo del surco conformado por el sitio activo. Está conformado por tres hélices α y varias regiones sin estructura secundaria regular, en las que se ubica el motivo GxNxFxD. El otro motivo altamente conservado en dicho dominio, ERFNIN, forma parte de la

hélice α H2 y ambos están incluidos en el dominio I29, que forma la secuencia que actúa como inhibitoria de la actividad de la enzima.

VIII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agyei, D., Danquah, M.K., 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 29, 272–277. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.01.001>

Ahmad, B., Rathar, G.M., Varshney, A., Khan, R.H., 2009. pH-Dependent urea-induced unfolding of stem bromelain: unusual stability against urea at neutral pH. *Biochem.* 74, 1337–1343. <https://doi.org/BCM74121642> [pii]

Aich, P., Biswas, S., 2018. Highly Conserved Arg Residue of ERFNIN Motif of Pro-Domain is Important for pH-Induced Zymogen Activation Process in Cysteine Cathepsins K and L. *Cell Biochem. Biophys.* 76, 219–229. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0838-x>

Ako, H., Nip, W.K., 2007. Enzyme Classification and Nomenclature. *Food Biochem. Food Process.* 135–154. <https://doi.org/10.1002/9780470277577.ch6>

Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A., Ghezzehei, T.A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* 97, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>

Aleem Sidek, N.A., Abdul Halim, A.A., Kadir, H.A., Tayyab, S., 2013. Structural stability of commercial ficin under different denaturing conditions. *Turkish J. Biochem.* 38, 319–328. <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.33043>

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25.

Antonio Blanco, G.B., 2017. Enzymes are biological catalysts, in: Antonio Blanco, G.B. (Ed.), *Medical Biochemistry*. Academic Press, pp. 153–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4/00008-2>

Arshad, M.S., Kwon, J.-H., Imran, M., Sohaib, M., Aslam, A., Nawaz, I., Amjad, Z., Khan, U., Javed, M., 2016. Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review. *Cogent Food Agric.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1261780>

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Wiley, C.J., Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Allison, R.D., Bittner, M., Blackshaw, S., 2003. *Current Protocols in Molecular Biology* Current Protocols in Molecular Biology.

- Azarkan, M., Matagne, A., Wattiez, R., Bolle, L., Vandenameele, J., Baeyens-Volant, D., 2011. Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry* 72, 1718–1731. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.05.009>
- Barberis, S., Adaro, M., Origone, A., Bersi, G., Guzmán, F., Illanes, A., 2018. Peptide Synthesis Using Proteases as Catalyst, in: Guevara, G., Daleo, G.R. (Eds.), *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Springer Nature Switzerland, pp. 70–106. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2>
- Barberis, S., Quiroga, E., Barcia, C., Liggieri, C., 2013. Effect of laundry detergent formulation on the performance of alkaline phytoproteases. *Electron. J. Biotechnol.* 16, 1–8. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-1>
- Barrett, A.J., McDonlad, J.K., 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* 237, 1986.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T., 2011a. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T., 2011b. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Bersi, G., Vallés, D., Penna, F., Cantera, A.M., Barberis, S., 2019. Valorization of fruit by-products of *Bromelia antiacantha* Bertol.: Protease obtaining and its potential as additive for laundry detergents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101099>
- Beuth, J., 2008. Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: Fact or fiction? *Integr. Cancer Ther.* 7, 311–316. <https://doi.org/10.1177/1534735408327251>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T., 2017. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Binossek, M.L., Niemer, M., Maksimchuk, K., Mayer, B., Fuchs, J., Huesgen, P.F., McCafferty, D.G., Turk, B., Fritz, G., Mayer, J., Haecker, G., Mach, L., Schilling, O., 2016. Identification of Protease Specificity by Combining Proteome-Derived Peptide Libraries and Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 2515–2524. <https://doi.org/10.1074/mcp.o115.056671>

- Bruno, M.A., Lazza, C.M., Errasti, M.E., López, L.M.I., Caffini, N.O., Pardo, M.F., 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.003>
- Bruno, M.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O., López, L.M.I., 2003. Hieronymain I, a New Cysteine Peptidase Isolated from Unripe Fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *J. Protein Chem.* 22, 127–134. <https://doi.org/10.1023/A:1023418812832>
- Bruno, M.A., Trejo, S.A., Avilés, X.F., Caffini, N.O., López, L.M.I., 2006. Isolation and characterization of hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Protein J.* 25, 224–231. <https://doi.org/10.1007/s10930-006-9005-8>
- Bruno, M.A., Trejo, S.A., Caffini, N.O., López, L.M.I., 2008. Purification and characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *Protein J.* 27, 426–433. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9152-1>
- Cabral, H., Leopoldino, A.M., Tajara, E.H., Greene, L.J., Faça, V.M., Mateus, R.P., Ceron, C.R., Judice, W.A.S., Juliano, L., Bonilla-Rodríguez, G.O., 2006. Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of fastuosain, a cysteine peptidase isolated from the fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein Pept. Lett.* 13, 83–89. <https://doi.org/10.2174/092986606774502072>
- Cambra, I., Hernández, D., Diaz, I., Martinez, M., 2012. Structural basis for specificity of propeptide-enzyme interaction in barley C1A cysteine peptidases. *PLoS One* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037234>
- Castro, S., Vazquez Peyronel, D., Maria Cantera, A.B., 1996. Proteolysis of Whey Proteins by a *Bacillus subtilis* Enzyme Preparation. *ht. Dairy J.* 6, 285–294.
- Chobotova, K., Vernallis, A.B., Majid, F.A.A., 2010. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Lett.* 290, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.001>
- Cornish-Bowden, A., 2014. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspect. Sci.* 1, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.006>
- de Lencastre Novaes, L.C., Jozala, A.F., Lopes, A.M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P.G., Pessoa Junior, A., 2016. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol. Prog.* 32, 5–13. <https://doi.org/10.1002/btpr.2190>

- De Paula, L.A., 2015. Caracterização do caraguatá (*Bromelia antiacantha* Bertol) utilizado na medicina popular nos municípios de Caraguatatuba e Paraibuna - SP utilizado na medicina popular nos municípios de Caraguatatuba e Paraibuna - SP. Camilo Castelo Branco.
- DeLano, S.L., 2009. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
- Delaria, K., Fiorentino, L., Wallace, L., Tamburini, P., Brownell, E., Muller, D., 1994. Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxic T- lymphocyte antigen-2 β . *J. Biol. Chem.* 269, 25172–25177.
- Dettko, G.A., Milaneze-Gutierrez, M.A., 2008. ANATOMIA VEGETATIVA DE *Bromelia Antiacantha* Bertol. (*Bromeliaceae*, *Bromelioideae*). *Balduinia* 13, 1–14.
- Dittz, D., Figueiredo, C., Lemos, F.O., Viana, C.T.R., Andrade, S.P., Souza-Fagundes, E.M., Fujiwara, R.T., Salas, C.E., Lopes, M.T.P., 2015. Antiangiogenesis, loss of cell adhesion and apoptosis are involved in the antitumoral activity of proteases from *v. Cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in murine melanoma B16F1. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 7027–7044. <https://doi.org/10.3390/ijms16047027>
- Domsalla, A., Melzig, M.F., 2008. Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta Med.* 74, 699–711. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074530>
- Duarte, M.M., Gandolfi, S., 2013. Enriquecimento de florestas em processo de restauração: aspectos de epífitas e forófitos que podem ser considerados. *Hoehnea* 40, 507–514. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062013000300010>
- Dullius, A., Goettert, M.I., de Souza, C.F.V., 2018. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *J. Funct. Foods* 42, 58–74. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.12.063>
- Eisenberg, D., Lüthy, R., Bowie, J.U., 1997. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles, in: *Methods in Enzymology*. pp. 396–404. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8)
- Ekchaweng, K., Evangelisti, E., Schornack, S., Tian, M., Churngchow, N., 2017. The plant defense and pathogen counterdefense mediated by *Hevea brasiliensis* serine protease HbSPA and *Phytophthora palmivora* extracellular protease inhibitor PpEPI10. *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175795>
- Elavarasan, K., Shamasundar, B.A., 2016. Effect of oven drying and freeze drying on the

- antioxidant and functional properties of protein hydrolysates derived from freshwater fish (*Cirrhinus mrigala*) using papain enzyme. *J. Food Sci. Technol.* 53, 1303–1311.
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2084-9>
- Elisa, R., López, S., Elisa Da Silva López, R., 2017. Debridement Applications of Bromelain: A Complex of Cysteine Proteases from Pineapple. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 3, 6109–6111.
<https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.03.555624>
- Elsässer, B., Zauner, F.B., Messner, J., Soh, W.T., Dall, E., Brandstetter, H., 2017. Distinct Roles of Catalytic Cysteine and Histidine in the Protease and Ligase Mechanisms of Human Legumain As Revealed by DFT-Based QM/MM Simulations. *ACS Catal.* 7, 5585–5593.
<https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01505>
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Murphy, M., Mynott, T.L., 2001. Bromelain activates murine macrophages and natural killer cells in vitro. *Cell. Immunol.* 210, 5–10.
<https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1793>
- Errasti, M.E., Natalucci, C.L., Caffini, N.O., Rotelli, A.E., Brullo, A., Maras, B., Trejo, S.A., López, L.M.I., 2018. Structural Properties of Macrodontain I, a Cysteine Protease from *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 186, 186–198.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2725-3>
- Errasti, M.E., Néstor, &, Caffini, O., María, L., López, I., Caffini, N.O., López, L.M.I., Néstor, &, Caffini, O., María, L., López, I., 2018. Proteolytic extracts of three Bromeliaceae species as eco-compatible tools for leather industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 21459–21466.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1096-6>
- Fabri, R.L., Batista Marques da Costa, J.A., 2012. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *pharmacognostic profile and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities of the Bromelia antiacantha Bertol*. *Rev. Electron. Farmácia IX*, 37–48.
- Feijoo-Siota, L., Villa, T.G., 2011. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol.* 4, 1066–1088.
<https://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., Hormigo, D., 2017. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 68, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>

- Filice, M., Aragon, C., Mateo, C., Palomo, J., 2016. Enzymatic Transformations in Food Chemistry. *Curr. Org. Chem.* 21, 139–148. <https://doi.org/10.2174/1385272820666161007130227>
- Filippon, S., Fernandes, C.D., Ferreira, D.K., Duarte, A.S., Reis, M.S., 2012. Producao de frutos para uso medicinal em *Bromelia antiacantha* (caraguat??): Fundamentos para um extrativismo sustent??vel. *Rev. Bras. Plantas Med.* 14, 506–513. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000300013>
- Filippon, S., Fernandes, C.D.D., Ferreira, D.K., Silva, D.L.S. Da, Altrak, G., Duarte, A.S., Reis, M.S. Dos, 2012. *Bromelia antiacantha* Bertol.(Bromeliaceae): caracterização demográfica e potencial de manejo em uma população no Planalto Norte Catarinense. *Biodiversidade Bras.* 2, 83–91.
- Filippova, I.Y., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Rudenskaya, G.N., Stepanov, V.M., 1984. I-Pyroglutamyl-I-phenylalanyl-I-leucine-p-nitroanilide-A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. *Anal. Biochem.* 143, 293–297. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90665-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90665-1)
- Fiser, A., Šali, A., 2003. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods Enzymol.* 374, 461–491. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)74020-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)74020-8)
- Furtado, S., Brandes, M., Alamón, C., Botasini, S., Cantera, A.M.B., 2018. The use of magnetic nanoparticles for immobilization and recycling of enzymes. *MRS Adv.* 3, 3581–3587. <https://doi.org/10.1557/adv.2018.559>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2009. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gerber, D., Pertille, C.T., Lubke, L., Lubke, M., Seidel, D.S., Campanh, F., 2017. The use of *Bromelia antiacantha* Bertol. in ecological restoration projects. *Acta Biológica Catarinense* 4, 60–67.
- Gomaa, A., 2018. Application of Enzymes in Brewing. *J. Nutr. Food Sci. Forecast* 1, 1–5.
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S., Oliver-Salvador, M. del C., 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>

- Groeme, R., Airouche, S., Kopečný, D., Jaekel, J., Savko, M., Berjont, N., Bussieres, L., Mignon, M. Le, Jagi, F., Zieglmayer, P., Baron-Bodo, V., Floch, V.B. Le, Mascarell, L., Briozzo, P., Moingeon, P., 2016. Structural and functional characterization of the major allergen amb a 11 from short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* 291, 13076–13087.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702001>
- Guevara, G., Daleo, G., 2018. *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*, Springer. Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2>
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H.R., Machleidt, I., Machleidt, W., Nuck, R., 1998. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem.* 17, 351–361. <https://doi.org/10.1023/A:1022507316434>
- Harrach, T., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Nuck, R., Grunow, D., Maurer, H.R., 1995. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. Protein Chem.* 14, 41–52. <https://doi.org/10.1007/BF01902843>
- He, S., Franco, C., Zhang, W., 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res. Int.* 50, 289–297.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>
- Hebda, P.A., Flynn, K.J., Dohar, J.E., 1998. Evaluation of the efficacy of enzymatic debriding agents for removal of necrotic tissue and promotion of healing on porcine skin wounds. *Wounds A Compend. Clin. Res. Pract.* 10, 83–95.
- Illanes, A., 2009. Aplicaciones convencionales en reacciones de hidrólisis, in: Caffini, N.O. (Ed.), *Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores: Aplicaciones Industriales*. CYTED, pp. 187–200.
- Jabalia, N., Mishra, P.C., Chaudhary, N., 2014. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. *J. Agroecol. Nat. Resour. Manag.* Print ISSN 1, 2394–786.
- Jay, G.D., Culp, D.J., Jahnke, M.R., 1990. Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: Enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Anal. Biochem.* 185, 324–330. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90302-P](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90302-P)
- Karnjanapratum, S., Benjakul, S., 2014. Glycyl endopeptidase from papaya latex: Partial purification and use for production of fish gelatin hydrolysate. *Food Chem.* 165, 403–411.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.123>

- Kaushik, M., Sinha, P., Jaiswal, P., Mahendru, S., Roy, K., Kukreti, S., 2016. Protein engineering and *de novo* designing of a biocatalyst. *J. Mol. Recognit.* 29, 499–503. <https://doi.org/10.1002/jmr.2546>
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 345–51.
- Krumreich, F.D., Corrêa, A.P.A., Silva, S.D. da, Zambiasi, R.C., 2015. Composição físico-química e de compostos bioativos em FRUTOS de *Bromelia antiacantha* Bertol. *Rev. Bras. Frutic.* 37, 450–456. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-127/14>
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Lee, K.L., Albee, K.L., Bernasconi, R.J., Edmunds, T., 1997. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *Biochem. J* 327, 199–202.
- Leipner, J., Iten, F., Saller, R., 2001. Therapy with Proteolytic Enzymes in Rheumatic Disorders. *BioDrugs* 15, 779–789. <https://doi.org/10.2165/00063030-200115120-00001>
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., Restrepo-Betancur, L.F., 2017. Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Rev. Cuba. Quím* 29, 2224–5421.
- López, L.M.I., Sequeiros, C., Trejo, S.A., Pardo, M.F., Caffini, N.O., Natalucci, C.L., 2001. Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Biol. Chem.* 382, 875–878. <https://doi.org/10.1515/bchm.2001.382.5.875>
- Luniak, N., Meiser, P., Burkart, S., Müller, R., 2017. Heterologous expression of the plant cysteine protease bromelain and its inhibitor in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 33, 54–65. <https://doi.org/10.1002/btpr.2405>
- Macció, L., Vallés, D., Cantera, A.M., 2013. Proteolytic enzymes from *Bromelia antiacantha* as tools for controlled tissue hydrolysis in entomology. *Springerplus* 2, 2–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-307>

- Mahajan, R., Chaudhari, G., Chopadaa, M., 2015. Report on Biotechnological Applications of Proteolytic Enzymes from Lattices of Euphorbian Plants. J. Appl. Biotechnol. Reports Orig. Artic. J. Appl. Biotechnol. Reports Autumn 2, 333–337.
- Manetti, L.M., Turra, A.F., Takemura, O.S., Svidzinski, T.I.E., Laverde, A., 2010. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). Rev. Bras. Plantas Med. 12, 406–413. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400002>
- Marita, J.M., Hatfield, R.D., Brink, G., 2010. *In Vitro* Proteolytic Inhibition, Polyphenol Oxidase Activity, and Soluble *o*-Diphenols in Grasses and Cereals. J. Agric. Food Chem. 58, 959–966. <https://doi.org/10.1021/jf903555e>
- Martínez Cuesta, S., Rahman, S.A., Furnham, N., Thornton, J.M., 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. Biophys. J. 109, 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
- Matagne, A.A., Bolle, L., El Mahyaoui, R., Baeyens-Volant, D., Azarkan, M., 2017. The proteolytic system of pineapple stems revisited: Purification and characterization of multiple catalytically active forms. Phytochemistry 138, 29–51. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.019>
- Maurer, H.R., 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cell. Mol. Life Sci. 58, 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>
- Mehtani, P., Sharma, C., Chatterjee, S., Bhatnagar, P., 2013. Proteases : The Industrial Biocatalyst Proteases. J. Sci. Technol. 2, 1–12.
- Meiser, P., Xu, Z., Kirsch, G., Jacob, C., 2014. Systemic Enzyme Therapy: Fact or Fiction? A review with focus on bromelains, proteolytic enzymes from the Pineapple Plant., in: Jacob C., Kirsch G., Slusarenko A., Winyard P., B.T. (Ed.), Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products. Springer, Dordrecht, pp. 449–467. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0>
- Meza-espinoza, L., García-magaña, M.D.L., Vivar-vera, M.D.L.Á., Sáyago-ayerdi, S.G., Chacón-lópez, A., Becerra-verdín, E.M., Dolores, M., Efigenia, M., 2017. DE EXTRACTOS DE FRUTOS DEL GÉNERO *Bromelia* ETHNOBOTANICAL AND NUTRITIONAL ASPECTS , AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FRUIT EXTRACTS OF THE GENUS *Bromelia* 40, 425–437.
- Misas-Villamil, J.C., van der Hoorn, R.A.L., Doehlemann, G., 2016. Papain-like cysteine proteases

- as hubs in plant immunity. *New Phytol.* 212, 902–907. <https://doi.org/10.1111/nph.14117>
- Moodie, P., 2001. Traditional Baking Enzymes - Proteases. *Enzym. Development* 212, 736–1580.
- Moreno-Hernández, J.M., Hernández-Mancillas, X. D., Coss-Navarrete, E.L., Bañuelos-Pérez, M.J., Salazar-Leyva, J.A., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V.A., Mazorra-Manzano, M.A., 2017. Partial Characterization of Milk- Clotting and Caseinolytic Activities of aguama fruit (*Bromelia pinguin* L.) proteases. *Rev. ciencias biológicas y la salud* 19, 19–24. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v19i2.380>
- Muhammad, Z.A., Ahmad, T., 2017. Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care — a review. *J. Pak. Med. Assoc.* 67, 121–125
- Napper, A., Bennett, S., Borowski, M., 1994. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J* 301 (Pt 3, 727–735.
- Napper, A., Bennett, S.P., Borowski, M., Holdridge, M.B., Leonard, M.J., Rogers, E.E., Duan, Y., Laursen, R.A., Reinhold, B., Shames, S.L., 2015. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *Biochem. J.* 301, 727–735. <https://doi.org/10.1042/bj3010727>
- Natalucci, C.L., Pardo, M.F., Canals, F., Caffini, N.O., Avilés, F.X., López, L.M.I., 2002. Purification of Balansain I, an Endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) . *J. Agric. Food Chem.* 48, 3795–3800. <https://doi.org/10.1021/jf0002488>
- Novinec, M., Lenarčič, B., 2013. Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol. Concepts* 4, 287–308. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0054>
- Nowakowski, A.B., Wobig, W.J., Petering, D.H., 2014. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions Andrew. *Metallomics* 6, 1068–1078. <https://doi.org/doi:10.1039/c4mt00033a>.
- Origone, A., Bersi, G., Illanes, A., Sturniolo, H., Liggieri, C., Guzmán, F., Barberis, S., 2018. Enzymatic and chemical synthesis of new anticoagulant peptides. *Biotechnol. Prog.* 34, 1093–1101. <https://doi.org/10.1002/btpr.2658>
- Ota, S., Muta, E., Katahira, Y., Okamoto, Y., 1985. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains. *J. Biochem.* 98, 219–228. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135261>

- Pavan, R., Jain, S., Shraddha, Kumar, A., 2012. Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnol. Res. Int.* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/976203>
- Payrol, J.A., Obregón, W.D., Trejo, S.A., Caffini, N.O., Abreu, J., Ae, P., Obregón, W.D., Trejo, S.A., Néstor, A., Caffini, O., Payrol, J.A., Obregón, W.D., Trejo, S.A., Caffini, N.O., 2008. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *Protein J.* 27, 88–96. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9111-2>
- Pérez, A., Carvajal, C., Trejo, S., Torres, M.J., Martin, M.I., Lorenzo, J.C., Natalucci, C.L., Hernández, M., 2010. Penduliflorain I: A cysteine protease isolated from *Hohenbergia penduliflora* (A.Rich.) Mez (Bromeliaceae). *Protein J.* 29, 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9243-7>
- Polaina, J., MacCabe, A.P., 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Springer. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0>
- Polgár, L.A.A., 2013. Catalytic Mechanisms of Cysteine Peptidases. *Handb. Proteolytic Enzym.* 2, 1773–1784. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00405-1>
- QIAGEN, 2012. June 2012 RNeasy® Mini Handbook QIAGEN Sample and Assay Technologies.
- R. M. Zacharius, T. E. Zell, J. H. Morrison, J. J. Woodlock, 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30, 148.
- Raj Kapoor, B., Sankari, M., Sumithra, M., Anbu, J., Harikrishnan, N., Gobinath, M., Suba, V., Balaji, R., 2007. Antitumor and Cytotoxic Effects of *Phyllanthus polyphyllus* on Ehrlich Ascites Carcinoma and Human Cancer Cell Lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2177–2183. <https://doi.org/10.1271/bbb.70149>
- Rakesh, R.L., Prasad, A., Kumar, D., Sankar, M., Nasir, A., Latchumikanthan, A., Saini, V.K., Magbool, I., Kushwaha, B., 2016. In vitro evaluation of anthelmintic efficacy of bromelain against goat gastrointestinal nematodes. *Jorunal Vet. Parasitol.* 30, 68–74.
- Ramli, A.N.M., Aznan, T.N.T., Illias, R.M., 2017. Bromelain: from production to commercialisation. *J. Sci. Food Agric.* 97, 1386–1395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8122>
- Ramli, A.N.M., Manas, N.H.A., Hamid, A.A.A., Hamid, H.A., Illias, R.M., 2018. Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food Chem.* 266, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.125>

- Rawlings, N.D., 2013. Proteases Families, Evolution and Mechanism of Action, in: Brix, K., Stöcker, W. (Eds.), *Proteases: Structure and Functions*. Springer Vienna, Viena, pp. 1–37.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 2013. Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00404-X>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290 (Pt 1, 205–18.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Thomas, P.D., Huang, X., Bateman, A., Finn, R.D., 2018. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 46, D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Risør, M.W., Thomsen, L.R., Sanggaard, K.W., Nielsen, T.A., Thøgersen, I.B., Lukassen, M. V., Rossen, L., Garcia-Ferrer, I., Guevara, T., Scavenius, C., Meinjohanns, E., Gomis-Rüth, F.X., Enghild, J.J., 2016. Enzymatic and structural characterization of the major endopeptidase in the Venus flytrap digestion fluid. *J. Biol. Chem.* 291, 2271–2287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672550>
- Ritonja, A., Rowan, A.D., Buttle, D.J., Rawlings, N.D., Turk, V., Barrett, A.J., 1989. Stem bromelain: Amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* 247, 419–424. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81383-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81383-3)
- Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, 320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
- Rowan, A.D., 2013a. Ananain, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00425-7>
- Rowan, A.D., 2013b. Comosain. *Handb. Proteolytic Enzym.* 2, 1876–1877. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00426-9>
- Rowan, A.D., 2013c. Stem Bromelain, in: Neil D. Rawlings and Guy Salvesen (Ed.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, pp. 1871–1873. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00423-3>
- Rowan, A.D., 2013d. Fruit Bromelain, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Ltd, pp. 1874–1875. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00424-5>
- Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A.J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant.

- Biochem. J 266, 869–875.
- Salvesen, G.S., Nagase, H., 2001. Inhibition of proteolytic enzymes, in: Beynon, R., Bond, J.S. (Eds.), *Proteolytic Enzymes : Practical Approach*. Oxford University Press, New York, Oxford, pp. 105–130.
- Schägger, H., 2006. Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16–22.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schagger, H., Von Jagow, G., 1987. Tricine-SDS polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368–379.
- Schechter, I., Berger, A., 1967. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.015>
- Scopes, R.K., 1987. Separation by Precipitation, in: *Protein Purification*. Springer New York, New York, NY, pp. 41–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1957-4_3
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli[sbrev], J., Olsen, J. V, Mann, M., 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Shivaprasad, H. V, Rajesh, R., Yariswamy, M., Vishwanath, B.S., 2011. Procoagulant Properties of Plant Latex Proteases, in: Kini R, Clemetson K, Markland F, McLane M, M.T. (Ed.), *Toxins and Hemostasis*. Springer Netherlands, pp. 591–603. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9295-3_33
- Silverstein, M., 1974. The Assay of the Bromelains Ester and N-CBZ-Glycine Ester as Substrates
Several different methods have been used to assay the bromelains , the sulfhydryl proteases from the pineapple stem . These procedures employ as substrates casein (1 , 2), N ” -benz. *Anal. Biochem.* 484, 478–484.
- Singh, M.K., Dominy, B.N., 2010. Thermodynamic resolution: How do errors in modeled protein structures affect binding affinity predictions? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 78, NA-NA.
<https://doi.org/10.1002/prot.22691>
- Stepek, G., Buttle, D.J., Duce, I.R., Lowe, A., Behnke, J.M., 2005. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. *Parasitology* 130, 203–211.
<https://doi.org/10.1017/S0031182004006225>

- Storer, A.C., Ménard, R., 2013. Papain. *Handb. Proteolytic Enzym.* 2, 1858–1861.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00418-X>
- Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A., 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases : A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 211–220.
- Tantamacharik, T., Carne, A., Agyei, D., Brich, J., Ahmed Bekhit, A.E.-D., 2018. Use of Plant Proteolytic Enzymes for Meat Processing, in: Guevara, G., Daleo, G.R. (Eds.), *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Springer Nature Switzerland, pp. 44–69. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-97132-2>
- Tavano, O.L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., Fernandez-Lafuente, R., 2018. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 412–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Technology, L., 2005. PureLink™ Quick Plasmid Miniprep.
- Tipton, K., Boyce, S., 2000. History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics* 16, 34–40.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.34>
- Tochi, B.N., Wang, Z., Xu, S.-Y., and Wenbin Zhang, Zhyzhneuskaya, S., 2008. Therapeutic application of pineapple protease. *Pak J Nutr* 7, 513–520.
- Torres, M.J.M.J., Trejo, S.A.S.A., Obregón, W.D., Avilés, F.X., López, L.M.I., Natalucci, C.L., Obregón, W.D., Avilés, F.X., López, L.M.I., Natalucci, C.L., 2012. Characterization of the proteolytic system present in *Vasconcellea quercifolia* latex. *Planta* 236, 1471–1484.
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1701-3>
- Turk, B., Turk, D., Turk, V., 2000. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477, 98–111. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00263-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00263-0)
- Turk, B., Turk, V., 2003. Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem. Soc. Symp.* 70, 15–30.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
- Vallés, D., Bruno, M., López, L.M.I.L.M.I., Caffini, N.O.N.O., Cantera, A.M.B.A.M.B., 2008. Granulosain I, a cysteine protease isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso-leprosum*

- (Solanaceae). *Protein J.* 27, 267–275. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9133-4>
- Vallés, D., Furtado, S., Cantera, A.M.B.M.B., 2007. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme Microb. Technol.* 40, 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.011>
- Van Der Hoorn, R.A.L., 2008. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms Key Words. *Annu. Rev. Plant Biol* 59, 191–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>
- Venkatesha, S.H., Rajaiah, R., Vishwanath, B.S., 2016. Hemostatic Interference of Plant Latex. *SM J. Clin. Pathol.* 1, 1–7.
- Verma, S., Dixit, R., Pandey, K.C., 2016. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front. Pharmacol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>
- Villadóniga, C., Macció, L., Cantera, A.M.B., 2018. Acid whey proteolysis to produce angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolyzate. *Environ. Sustain.* 1, 267–278. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0027-x>
- Villamil, O., Váquiro, H., Solanilla, J.F., 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chem.* 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Vizovišek, M., Vidmar, R., Drag, M., Fonović, M., Salvesen, G.S., Turk, B., 2018. Protease Specificity: Towards In Vivo Imaging Applications and Biomarker Discovery. *Trends Biochem. Sci.* 43, 829–844. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.07.003>
- Vorster, B.J., Cullis, C.A., Kunert, K.J., 2019. Plant Vacuolar Processing Enzymes. *Front. Plant Sci.* 10, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00479>
- Wald, M., Rovenský, J., 2017. Systemic Enzyme Therapy in Comprehensive Treatment of Degenerative Rheumatic Diseases in the Elderly Martin, in: Rovenský, J. (Ed.), *Gerontorheumatology*. Springer International Publishing, pp. 363–366. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31169-2>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., De Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–

W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Westergaard, J.L., Hackbarth, C., Treuhafr, M.W., Roberts, R.C., 1980. DETECTION OF PROTEINASES IN ELECTROPHORETOGRAMS OF COMPLEX MIXTURES 1. *J. Immunol. Methods* 34, 167–175.

Wiederanders, B., 2003. Structure-function relationships in class CA1 cysteine. *Biochemistry* 50, 3–8.

Woodley, J.M., 2013. Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.017>

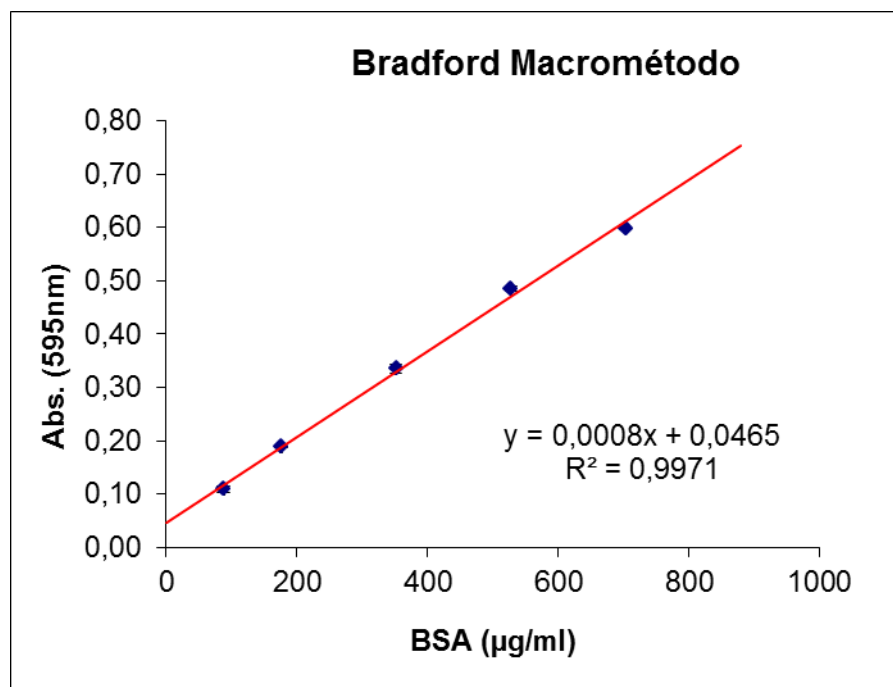
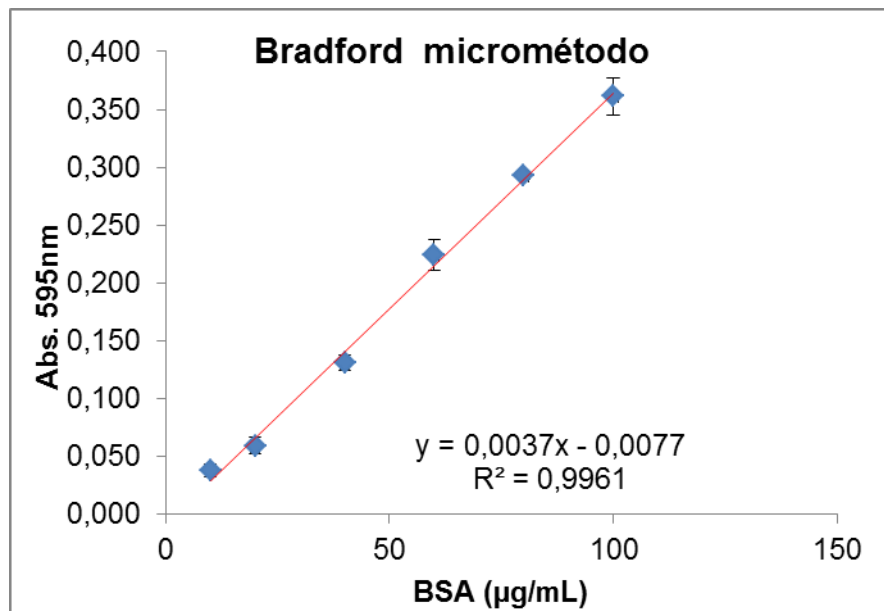
Yang, J., Zhang, Y., 2015. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43, W174–W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>

Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A.N., Alva, V., 2018. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J. Mol. Biol.* 430, 2237–2243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.007>

IX – APÉNDICES

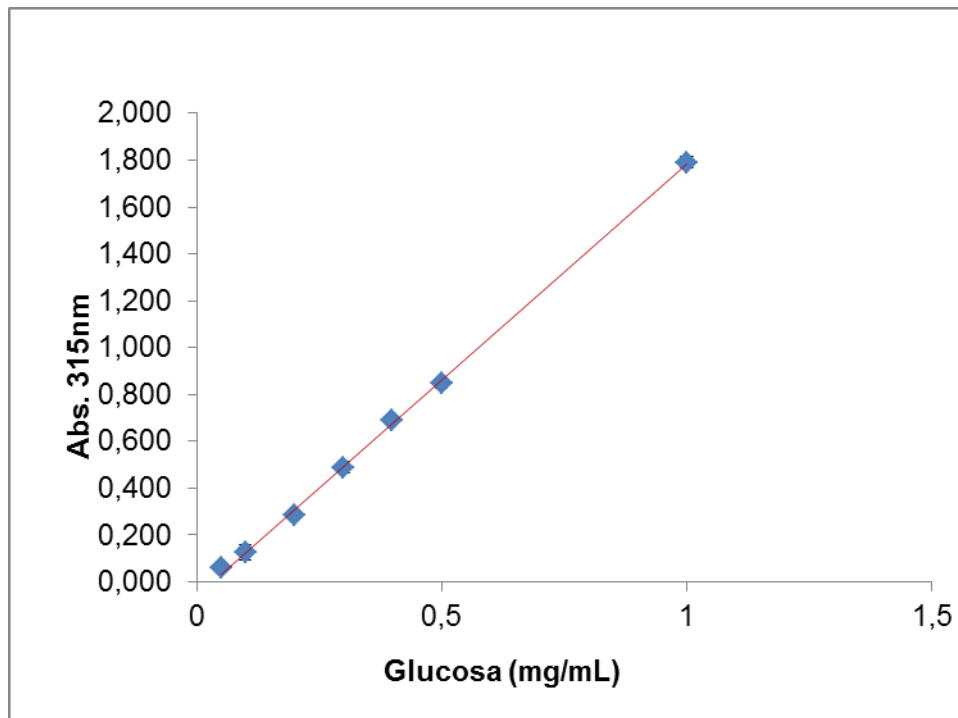
APENDICE 1

Curvas de calibración para proteínas por método de Bradford



APÉNDICE 2

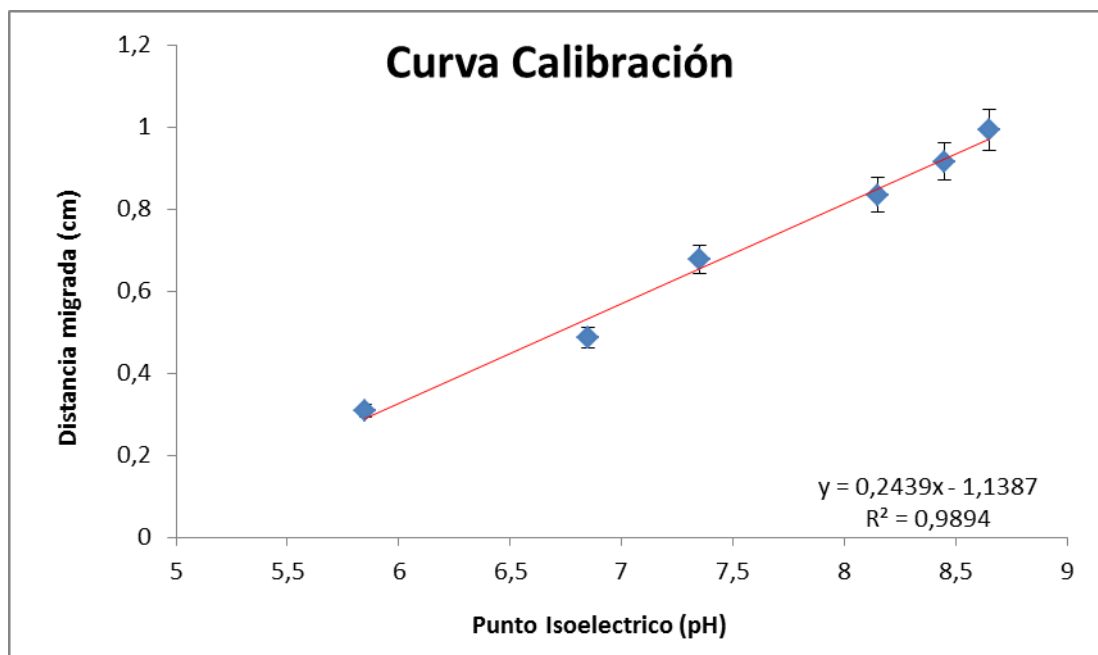
Determinación del contenido de carbohidratos curva de calibración



| MUESTRA | [Carbohidratos] (mg/mL) |
|----------------|-------------------------|
| EC | 254,6 |
| Antiacanthaína | 101,5 |
| AntA | 0,4 |
| AntB | 0,4 |
| AntC | 0,3 |

APENDICE 3

Determinación de puntos isoelectricos por medida de la distancia migrada en Isoelectroenfoque

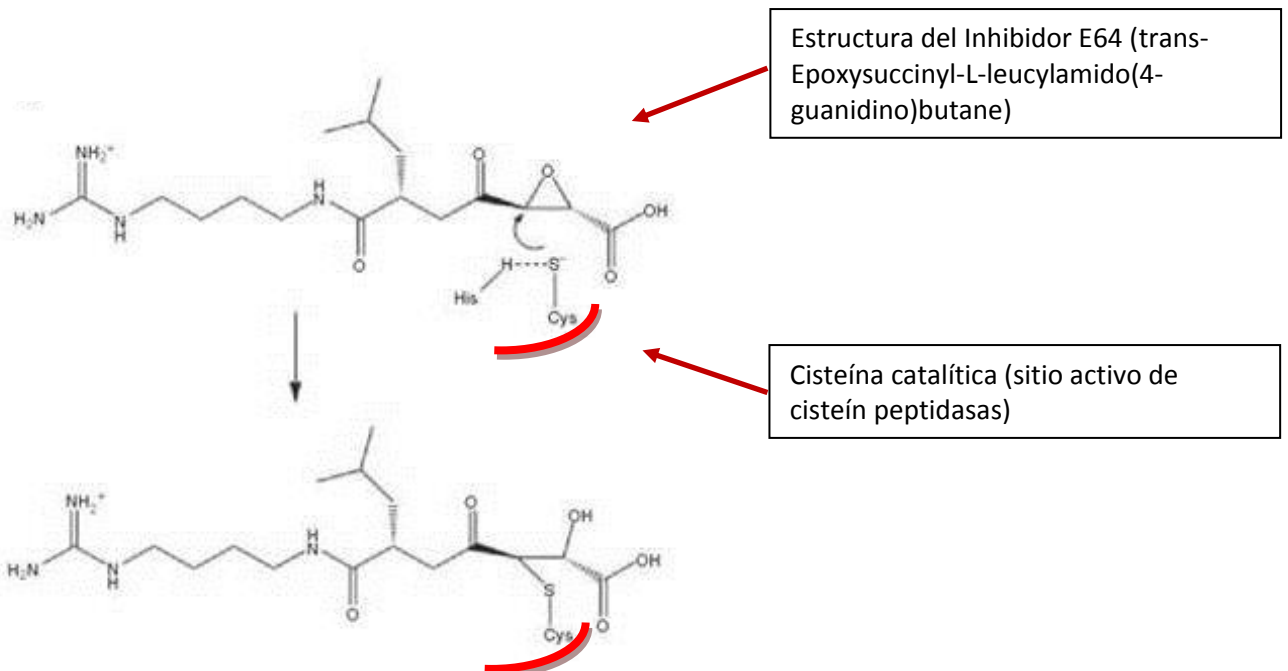


| pl (Marcador) | Distancia (cm) |
|---------------|----------------|
| 5,85 | 0,309 |
| 6,85 | 0,487 |
| 7,35 | 0,677 |
| 8,15 | 0,834 |
| 8,45 | 0,916 |
| 8,65 | 0,992 |

| Muestra | Distancia migrada (cm) | pl calculado |
|---------|------------------------|--------------|
| AntA | 0,65 | 7,33 |
| AntA | 0,834 | 8,10 |
| AntB | 0,861 | 8,20 |
| AntB | 0,997 | 8,80 |
| AntC | 1,06 | 9,00 |
| AntC | 1,18 | 9,50 |

APENDICE 4

Estructura y reacción del E64 (Inhibidor irreversible de cisteín peptidasas).



Formación de enlace tioéter entre residuo catalítico (cisteína) del sitio activo de la enzima con el grupo epóxido del E64 (reacción irreversible)

APENDICE 5

Alineamiento de secuencias N-terminal de peptidasas cisteínicas

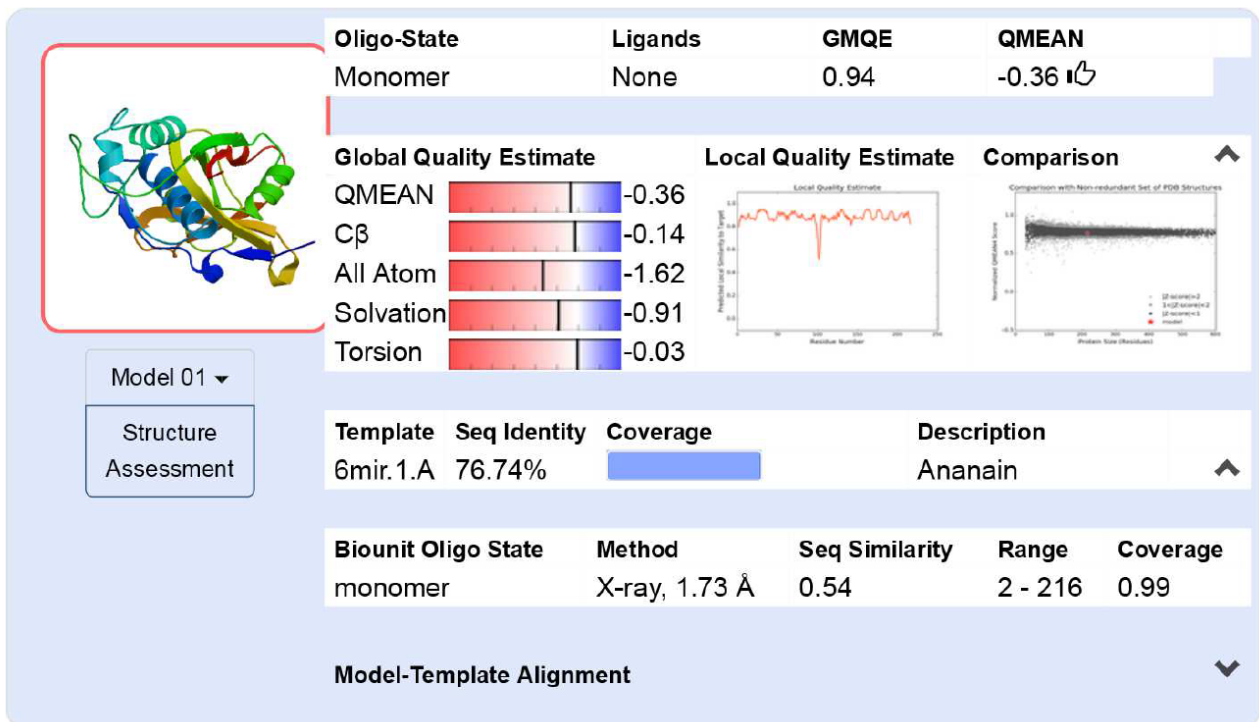
| | Secuencia | Identidad (%) |
|---|------------------|---------------|
| <i>Antiacanthaina A/B</i> | AVPESIDWR-YGAVT | |
| <i>Fastuosain (Bromelia Fastuosa)</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 13/15 (86%) |
| <i>Penduliflorain I</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 13/15 (87%) |
| <i>Pseudananas macrodentes (macrodentaina I)</i> | AVPQSIDWRDYGAVN | 12/15 (80%) |
| <i>Pseudananas macrodentes (macrodentaina II)</i> | AVPQSIDWRDYGAVN | 12/15 (80%) |
| <i>Ananas comosus (bromelaina de fruto)</i> | AVPQSIDWRDYGAVN | 12/15 (80%) |
| <i>Bromelia hieronymi (hieronymaina I)</i> | ALPESIDWRKAGAVT | 12/15 (80%) |
| <i>Bromelia balansae (balansaina I)</i> | AVPESIDWRDYGAVT | 14/15 (93%) |
| <i>Ananas comosus (comosaina)</i> | VPQSIDWRNYGAVT | 12/14 (86%) |
| <i>Ananas comosus (bromelaina de tallo)</i> | AVPQSIDWRDYGAVT | 12/15 (80%) |
| <i>Ananas comosus (ananaina)</i> | VPQSIDWRDSGAVT | 11/14 (79%) |
| <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> | EVPRSIDWRVKGAVT | 11/15 (73%) |
| <i>Papain (Carica papaya)</i> | IPEYVDWRQKAGAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Carica papaya (quimopapaina)</i> | YPQSIDWRKAGAVT | 10/14 (71%) |
| <i>Pisum sativum</i> | VPSSIDWRKKGAVT | 11/14 (79%) |
| <i>Carica candamarcensis (CC-III)</i> | YPESIDWRKKGAVT | 11/14 (79%) |
| <i>Carica candamarcensis (CC-IV)</i> | YPESIDWRKKGAVT | 11/14 (79%) |
| <i>Vicia sativa</i> | VPSSIDWRNKGAVT | 10/14 (71%) |
| <i>Pseudotsuga mentziesii</i> | DLPESIDWREKAGAVT | 11/15 (73%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | LPESIDWRKKGAVA | 10/14 (71%) |
| <i>Zingiber officinale</i> | VLPDSIDWREKAGAV | 10/15 (67%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | LPEDFDWRDHGAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Zinnia elegans</i> | DLPKSV DWRKKGAVS | 9/15 (60%) |
| <i>Nicotiana tabacum (Clon CYP-7)</i> | DLPADFDWRDHGAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Nicotiana tabacum (Clon CYP-8)</i> | DLPADYDWRDHGAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Zea mays</i> | PDDFDWRDHGAVG | 7/13 (54%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | LPEEFDWRDRGAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | SVPPSV DWRKKGAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Oryza sativa (oryzaina α)</i> | ALPESVDWRTKGAVA | 10/15 (67%) |
| <i>Oryza sativa (oryzaina β)</i> | LPESVDWREKAGAVA | 9/14 (64%) |


| | | |
|--|----------------------------------|-------------|
| <i>Zea mays</i> | DLPDAI DWR QL GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Zea mays</i> | DLPESV DWRAK GAVA | 9/15 (60%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | KVPDSV DWR KK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Alnus glutinosa</i> | AVPSAM DWR MK GAVT | 10/15 (67%) |
| <i>Ricinus communis</i> | VPASV DWR KK GAVT | 10/14 (71%) |
| <i>Solanum melongena</i> | DLPEDF DWREK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Carica papaya</i> (papaina) | IPEYV DWR QK GAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Vigna mungo</i> | NLPKDF DWR DK GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Brassica napus</i> | ALPISV DWR KK GAVT | 10/15 (67%) |
| <i>Lycopersicon pennellii</i> | DMPSNL DWRES GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Brassica napus</i> | ALPVSV DWR KK GAVT | 10/15 (67%) |
| <i>Glycine max</i> | PLPENF DWREK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Dianthus caryophyllus</i> | LPESV DWR KK GAVS | 9/14 (64%) |
| <i>Hordeum vulgare</i> | DLPPSV DWR QK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Pisum sativum</i> | KLPEV DWR KE GAVV | 9/15 (60%) |
| <i>Carica candamarcensis</i> (CC-II) | YPGSV DWR QK GAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Astragalus sinicus</i> | TVPSNV DWR QK GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Phytolacca americana</i> (phytolacaína R) | NLPSYI DWR NNYAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Vigna mungo</i> | VPASV DWR KK GAVT | 10/14 (71%) |
| <i>Vicia faba</i> | NLPEDF DWREK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Vicia sativa</i> | NLPEDF DWREK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Pisum sativum</i> | NLPEDF DWREK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> | YMPSNL DWRES GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Hordeum vulgare</i> (aleuraína) | ALPETK DWRE DGIVS | 8/15 (53%) |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | YMPSNL DWRES GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Oryza sativa</i> | DLPRAV DWR RK GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Oryza sativa</i> | DLPRAV DWR RK GAVT | 8/15 (53%) |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | SLPESI DWR EKGVLV | 8/15 (53%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | ALPETK DWRE DGIVS | 8/15 (53%) |
| <i>Carica papaya</i> (glicilendopeptidasa) | LPESV DWRAK GAVT | 10/14 (71%) |
| <i>Araujia hortorum</i> (araujaína h II) | VPDSI DWR EKDAVL | 9/15 (60%) |
| <i>Carica papaya</i> (caricaína) | NLPENV DWR KK GAVT | 9/15 (60%) |
| <i>Lolium multiflorum</i> | ALPETK DWRE TGIVS | 8/15 (53%) |
| <i>Oryza sativa</i> (oryzaína γ) | LPETK DWR EDGIVS | 7/14 (50%) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | LPENV DWR KK GAVT | 9/14 (64%) |
| <i>Prunus armeniaca</i> | VLPEKKNWREEGIVT | 8/15 (53%) |

X – ANEXOS

ANEXO 1

Parámetros de las estructuras cristalinas de peptidasas utilizadas como moldes para el modelado de secuencia AntP (secuencia madura)










Oligo-State
Monomer

Ligands
None


GMQE
0.78

QMEAN
-0.63 ↩

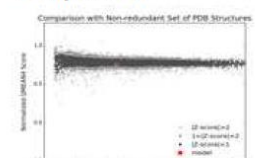
Global Quality Estimate

| | | |
|-----------|---|-------|
| QMEAN |  | -0.63 |
| C β |  | 0.23 |
| All Atom |  | -1.87 |
| Solvation |  | -1.38 |
| Torsion |  | -0.26 |

Local Quality Estimate

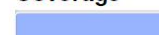


Comparison



Model 05 ▾


Structure Assessment

| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---|-------------|
| 1meg.1.A | 48.36% |  | CARICAIN ↗ |

| Biounit Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 2.00 Å | 0.45 | 2 - 216 | 0.98 |

| Ligand | Added to Model | Description |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|
| E64 | × - Binding site not conserved. | N-[N-[1-HYDROXYCARBOXYETHYL-CA... |
| EOH | × - Not biologically relevant. | ETHANOL |

Model-Template Alignment ▾



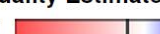
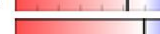

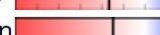

Oligo-State
Monomer

Ligands
None


GMQE
0.80

QMEAN
-0.81 ↩

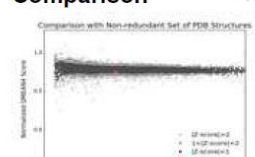
Global Quality Estimate

| | | |
|-----------|---|-------|
| QMEAN |  | -0.81 |
| C β |  | -0.04 |
| All Atom |  | -1.66 |
| Solvation |  | -1.47 |
| Torsion |  | -0.38 |

Local Quality Estimate

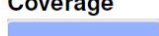


Comparison




Model 03 ▾

Structure Assessment

| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---|-------------|
| 5a24.1.A | 50.23% |  | DIONAIN-1 ↗ |

| Biounit Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 1.50 Å | 0.47 | 2 - 214 | 0.98 |


| Ligand | Added to Model | Description |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|
| E64 | × - Binding site not conserved. | N-[N-[1-HYDROXYCARBOXYETHYL-CA... |








Oligo-State
Monomer

Ligands
None

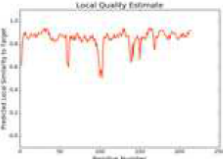
GMQE
0.82

QMEAN
-0.19 

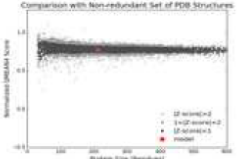
Global Quality Estimate

| | | |
|-----------|---|-------|
| QMEAN |  | -0.19 |
| C β |  | 0.05 |
| All Atom |  | -1.71 |
| Solvation |  | -1.42 |
| Torsion |  | 0.22 |

Local Quality Estimate




Comparison



Model 02 ▾


Structure Assessment

| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---|-------------|
| 4yyr.1.A | 54.76% |  | Ficin B |

| Biounit Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 1.35 Å | 0.48 | 2 - 213 | 0.97 |

| Ligand | Added to Model | Description |
|--------|--------------------------------|-------------|
| SO4 | × - Not in contact with model. | SULFATE ION |
| SO4 | × - Not biologically relevant. | SULFATE ION |


Model-Template Alignment








Oligo-State
Monomer (matching prediction)

Ligands
None

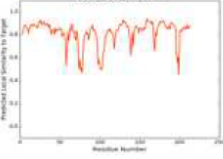
GMQE
0.80

QMEAN
-0.74 

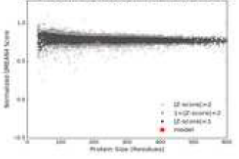
Global Quality Estimate

| | | |
|-----------|---|-------|
| QMEAN |  | -0.74 |
| C β |  | -1.09 |
| All Atom |  | -2.07 |
| Solvation |  | -1.55 |
| Torsion |  | -0.05 |

Local Quality Estimate




Comparison



Model 04 ▾

Structure Assessment

| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---|-------------|
| 1yal.1.A | 55.02% |  | CHYMOPAPAIN |

| Biounit Oligo State | QSQE | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|------|---------------|----------------|---------|----------|
| homo-dimer | 0.04 | X-ray, 1.70 Å | 0.47 | 3 - 213 | 0.96 |

Model-Template Alignment

ANEXO 2


Parámetros de las estructuras cristalinas de peptidasas utilizadas como moldes para el modelado de secuencia de pro-ant.

Pro-antiacanthain Created: today at 20:02

Summary Templates 50 Models 5

Model Results

Order by: GMQE



Model 03
Structure Assessment

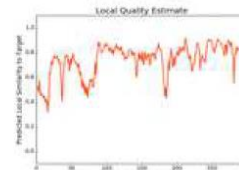
Oligo-State: Monomer
Ligands: None

Global Quality Estimate

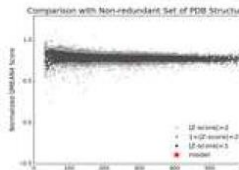
| | |
|-----------|-------|
| QMEAN | -1.81 |
| Cβ | -1.93 |
| All Atom | -1.98 |
| Solvation | -1.51 |
| Torsion | -1.11 |

GMQE: 0.75
QMEAN: -1.81

Local Quality Estimate



Comparison



| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---------------------------------|-------------------|
| 5ef4.2.A | 41.22% | <div style="width: 40%;"></div> | Cysteine protease |

| Blouint Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 2.05 Å | 0.42 | 2 - 299 | 0.96 |

Model-Template Alignment

```

Model_03 EWMAEYGRVYNDNAEKMR---RFQIFKNNVNHIEFTFNRRSGNSITLGINQFTDMTNEFLTRITGA-----SLPLNIEREVPVSPDDVDI 82
5ef4.2.A -FMGNYDRWREQHNIEMRSERFNVFKYVNRRIHE-SNKMDKPKRLXVNEFADMTNLEFVNTYANSKISHFQALRGSAPGSIDTDPNKDFIYANV 127
Model_03 SAVPQSLDWRDYGAVTSVRKNGSCGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNLVLSSEQEVLDCAVS-YGCKGGVYKAYDFIISNNGVTSANLPYKGYK 176
5ef4.2.A TKIPDKVDFREENAVTDVVKGGCGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNLVLSSEQEVLDCAVS-YGCKGGVYKAYDFIISNNGVTSANLPYKGYK 222
Model_03 GPCNNDLPSACITGYKYVSNNERLMMISVANQPIAALDASGDFQYKGGVETGPGCGTSLNHAITVIGYGGQSSSGTLYWLVKNSGSSWGER 270
5ef4.2.A ETCDKAKIKDVKIDGRQVYFGLDEEALREAVAHQPVATGQLSGHGLQPLQESVYVNGDCGTEPNRYSYVSESENEKGIKELVYKNSWSEPTWGR 317
Model_03 RGYLRMRDVSPPGGLCGIAMSTLEPTLDLGANAIEVIKM 309
5ef4.2.A KGYLHLQRRGARKE-GLGQVAMHSSFPFNN----- 345
    
```



Model 01
Structure Assessment

Oligo-State: Monomer
Ligands: None

Global Quality Estimate

| | |
|-----------|-------|
| QMEAN | -2.01 |
| Cβ | -1.01 |
| All Atom | -1.79 |
| Solvation | -1.77 |
| Torsion | -1.48 |

GMQE: 0.74
QMEAN: -2.01

Local Quality Estimate



Comparison



| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---------------------------------|--------------------------|
| 3qj3.1.A | 41.18% | <div style="width: 40%;"></div> | Cathepsin L-like protein |

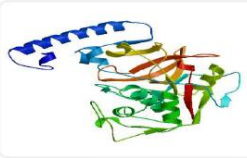
| Blouint Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 1.85 Å | 0.42 | 6 - 298 | 0.94 |

| Ligand | Added to Model | Description |
|--------|--------------------------------|-------------|
| ACT | × - Not biologically relevant. | ACETATE ION |

Model-Template Alignment

```

Model_01 EWMAEYGRVYNDNAEKMRRFQIFKNNVNHIEFTFNRRSGN-----SITLGINQFTDMTNEFLTRITGASLPLNIERE--EVPVSPDDVDISA---VPQ 87
3qj3.1.A -----YARSYVNAKEETFRKQIFQKLETFEEHNEKYRQGLVSPITLQVNLPTDMTPEEMKAYTRGLIMPADLHKNGEPIXTREDLQLNASVRYPA 118
Model_01 SLDWRDYGAVTSVRKNGSCGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNLVLSSEQEVLDCAVS-YGCKGGVYKAYDFIISNNGVTSANLPYKGYKGPC 179
3qj3.1.A SFDNRDQGMVSPVKNGSCGSCWAFSSGTAIESOMKIANRAGYDSSVETQCLYDQVPNALQCSGGWMDAFYVAQNGGLDSEGGAYPYEMADGNC 213
Model_01 NNDLPSACITGYKYVSNNERLMMISVANQPIAALDASGDFQYKGGVETGPGCGTSLNHAITVIGYGGQSSSGTLYWLVKNSGSSWGER 271
3qj3.1.A HYDPNQVARRLSGVYVDSGPDENMLANMYATKGPVAVAFQADDPFSSVSGGVYVNPFTCBTNKPTFAVTLVGYGNRNGQYVWLVKNSGSDGNGWGLD 307
Model_01 RGYLRMRDVSPPGGLCGIAMSTLEPTLDLGANAIEVIKM 309
3qj3.1.A GYFIRKRNANN---HGGIAGVASVPTL----- 331
    
```

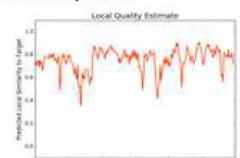


Model 05
Structure Assessment

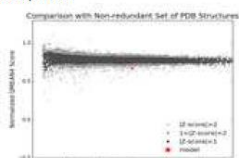
| | | | | | | | |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|
| Oligo-State | Monomer | Ligands | None | GMOE | 0.75 | OMEAN | -2.61 ↕ |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|

| Global Quality Estimate | |
|-------------------------|-------|
| OMEAN | -2.61 |
| Cβ | -1.37 |
| All Atom | -2.28 |
| Solvation | -1.03 |
| Torsion | -2.11 |

Local Quality Estimate



Comparison



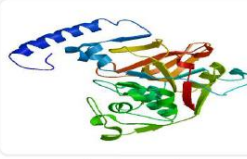
| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---------------------------------|-------------|
| 1pci.1.A | 44.75% | <div style="width: 80%;"></div> | PROCARICAIN |

| Blounit Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 3.20 Å | 0.44 | 1 - 298 | 0.95 |

Model-Template Alignment

```

Model_05 EWMAEYGRVYNDNAEKMRRFQIFKNNVNHIEFTFNRSNGNSYTLGINSQFTDMTNEFLTRYTGASLPLNIEREPVYSFDDVDISAVPQSIDWRDYG 95
1pci.1.A SWMLNHNKPYENVDEKLYRFEIFEDNLHYIDETNKK-NNSYTLGELNEPADLSNDEFNEEYVGSLELDATIEQSYDEEYINEDIVNLPENVLDRKKG 117
Model_05 AVTSVKVQSGCGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNLVLSLSEQVELDCAV-SYGCCKGWNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDL-PNSA 188
1pci.1.A AVTPVVRQSGCGSCWAFSAVATVEGINRIRDELKVELSEQELVDCERRSHQCKGKPYALEYVAENGLHRSKYPYRAKQGTCTRAKQVGGGPIV 211
Model_05 CITCYKYPVQSNRERLMMISVANQPIAALDASGDFQYKGGVETGPGGTSLNHAIIVIGYGGSSGTYIWLKNSWSSWGERGYRMRARDVSS 282
1pci.1.A KTSGLYGRVQPNMEGNLLNARQPNYSYVYVSKGRPEQLYKGGIETGPGGTVKVDGAYTAVGZGKRGGLGYILLKNSWSTAWGZRGYIEIKRAPGN 305
Model_05 PGGLCGIAMSTLFPFLDLGANAEVIRM 309
1pci.1.A SPGVCGLYESLYVYFK----- 321
    
```

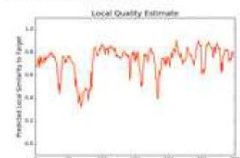


Model 04
Structure Assessment

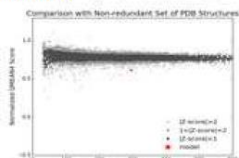
| | | | | | | | |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|
| Oligo-State | Monomer | Ligands | None | GMOE | 0.73 | OMEAN | -4.04 ↕ |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|

| Global Quality Estimate | |
|-------------------------|-------|
| OMEAN | -4.04 |
| Cβ | -2.99 |
| All Atom | -2.88 |
| Solvation | -2.41 |
| Torsion | -3.02 |

Local Quality Estimate



Comparison



| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---------------------------------|-------------|
| 4qr.2.A | 45.45% | <div style="width: 80%;"></div> | pro-papain |

Model-Template Alignment



Model 02
Structure Assessment

| | | | | | | | |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|
| Oligo-State | Monomer | Ligands | None | GMOE | 0.72 | OMEAN | -3.12 ↕ |
|-------------|---------|---------|------|------|------|-------|---------|

| Global Quality Estimate | |
|-------------------------|-------|
| OMEAN | -3.12 |
| Cβ | -1.10 |
| All Atom | -2.16 |
| Solvation | -2.06 |
| Torsion | -2.51 |

Local Quality Estimate



Comparison



| Template | Seq Identity | Coverage | Description |
|----------|--------------|---------------------------------|-------------|
| 4qr.1.A | 43.55% | <div style="width: 80%;"></div> | Papain |

| Blounit Oligo State | Method | Seq Similarity | Range | Coverage |
|---------------------|---------------|----------------|---------|----------|
| monomer | X-ray, 1.96 Å | 0.43 | 1 - 296 | 0.93 |

| Ligand | Added to Model | Description |
|--------|--------------------------------|--------------|
| CL | × - Not biologically relevant. | CHLORIDE ION |
| NA | × - Not biologically relevant. | SODIUM ION |

Model-Template Alignment

```

Model_02 EWMAEYGRVYNDNAEKMRRFQIFKNNVNHIEFTFNRSNGNSYTLGINSQFTDMTNEFLTRYTGASLPLNIEREPVYSFDDVD-----ISAVPQSID 90
4qr.1.A SWMLEHNKIKYKIDKIKYRFEIFEDNLKRYIDETNKK-NNSYTLGELNVFADMSNDEFKEXYTGSPAGNYT----PELSYEEDVLDNDGVNIDET 157
Model_02 WRDYGAVTSVKVQSGCGSCWAFSAIATVEGIYKIKAGNLVLSLSEQVELDCAV-SYGCCKGWNKAYDFIISNNGVTSFANLPYKGYKGPCNHNDL 184
4qr.1.A WRQKGAVTPVKNQSGCGSCWAFSAVSTIESIIKIRTGNLNEVSEQELLDCCRYSYGNSEYNSALOLVADY-GLRHENTYPPYEGYQRYCRERK 251
Model_02 -PNSACITGTAIVVQSNRERLMMISVANQPIAALDASGDFQYKGGVETGPGGTSLNHAIIVIGYGGSSGTYIWLKNSWSSWGERGYRMRARDVSS 277
4qr.1.A GPFYARTDGVRRQVQFPYNEGALLYSIANQPNYSYVYVLEAAGKDEQLYKGGIETGPGGTVKVDGAYTAVGZGKRGGLGYILLKNSWSTAWGZRGYIEIKRAPGN 341
Model_02 RDVSSPGGLCGIAMSTLFPFLDLGANAEVIRM 309
4qr.1.A RGTGNSYGVCCOLYTSSEYVYFK----- 362
    
```

ANEXO 3

Portada de publicaciones científicas

International Journal of Biological Macromolecules 113 (2018) 916–923



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <https://www.journals.elsevier.com/ijbiomac>

Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae)

Diego Vallés^{a,*}, Ana M.B. Cantera^{a,b}^a Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay^b Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2017

Received in revised form 3 March 2018

Accepted 5 March 2018

Available online 06 March 2018

Keywords:

Plant protease

Cysteine peptidase

Bromeliaceae

ABSTRACT

Crude extract (CE) from pulp of *Bromelia antiacantha* Bertol. mature fruit, contains at least 3 cysteine proteases with proteolytic activity. By single step cation exchange chromatography (Hi-trap SP-HP) of partially purified CE, the protease with the lowest pI, Antiacanthain A (AntA), was isolated. It showed maximum activity at pH 9, and 75% of remaining activity was maintained over a wide pH range (pH 6–10). The AntA activity exhibits a constant increase up to 70 °C. Maintains almost 100% of its activity at 45 at pH 6 and 9. A 60% of AntA was active by titration with specific inhibitor, E64. Amidasic activity was studied with pyroglutamyl-phenyl-leucyl-paranitroaniline (PFLNA) substrate having higher AntA catalytic efficiency of ($k_{cat}/K_m = 470 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) relative to stem bromelain ($k_{cat}/K_m = 305 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Esterase activity using *p*-nitrophenyl esters of N- α -CBZ-L-Lysine (*z*-L-LysONp) showed a 10-fold higher catalytic efficiency for AntA ($k_{cat}/K_m = 6376 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) relative to stem bromelain ($k_{cat}/K_m = 688 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Incubation with 8 M Urea did not affect AntA activity and remained unchanged for 18 h, with 6 M GndHCl resulted in a 41% decrease in activity after 30 min incubation, maintained this activity 18 h. AntA exhibits high sequence identity with proteases of the Bromeliaceae family.

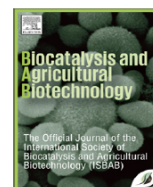
© 2018 Published by Elsevier B.V.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 18 (2019) 101099



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/babValorization of fruit by-products of *Bromelia antiacantha* Bertol.: Protease obtaining and its potential as additive for laundry detergentsGrisel Bersi^{a,b}, Diego Vallés^c, Fabricio Penna^d, Ana María Cantera^c, Sonia Barberis^{a,b,*}^a Laboratorio de Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera, San Luis, 5700, San Luis, Argentina^b Instituto de Física Aplicada (INFAP) – CCT - San Luis - CONICET. Avenida Ejército de Los Andes N° 950, Bloque II, 2° Piso, San Luis, 5700, San Luis, Argentina^c Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Facultad de Ciencias, Universidad de La República. Iguá N° 4225, 11200 Montevideo, Uruguay^d Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Nacional de San Luis, Avenida Ejército de Los Andes N° 950, Bloque IV, San Luis, 5700, San Luis, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Fruit by-product valorization
Bromelia antiacantha Bertol.
Cystein phytoprotease
Laundry detergent

ABSTRACT

The aim of this work is to isolate and study the performance of an alkaline protease from fruit by-products of *Bromelia antiacantha* Bertol. for its potential application as an additive of laundry detergent formulations. Its behavior is compared with Pura Felt 4000 (Genencor Argentina). *Antiacanthain*, a cysteine protease from fruit by-products of *B. antiacantha*, showed a remarkable stability ($50 \pm 0.82\%$ to $177 \pm 0.82\%$ residual activity) in buffer with non-ionic and cationic surfactants (0.1, 0.4 and 1.0%), metal chelation (1, 5 and 10 mM EDTA), antiredeposant (100 mM Na_2CO_3) and bleaching (5% H_2O_2) agents. In commercial detergents, *antiacanthain* retained $100 \pm 1.25\%$ to $120 \pm 0.82\%$ of its maximum activity at 60 °C and removed stains from cloths in a short time period. *Antiacanthain* fulfilled all the requirements as detergent additive: high activity and stability in a broad temperature range (25–60 °C) and alkaline pH (5–9), and very good compatibility with commercial detergents.

Macció et al. *SpringerPlus* 2013, **2**:307
<http://www.springerplus.com/content/2/1/307>

 SpringerPlus
a SpringerOpen Journal

METHODOLOGY**Open Access**

Proteolytic enzymes from *Bromelia antiacantha* as tools for controlled tissue hydrolysis in entomology

Laura Macció^{1,3}, Diego Vallés^{1,3} and Ana Maria Cantera^{1,2,4*}

Abstract

A crude extract with high proteolytic activity (78.1 EU/mL), prepared from ripe fruit of *Bromelia antiacantha* was used to hydrolyze and remove soft tissues from the epigyne of *Apopyllus iheringi*. This enzymatic extract presented four active isoforms which have a broad substrate specificity action. Enzyme action on samples was optimized after evaluation under different conditions of pH, enzyme-substrate ratio and time (parameters selected based on previous studies) of treatment (pH 4.0, 6.0 and 8.0 at 42°C with different amount of enzyme). Scanning electron microscopy was used to evaluate conditions resulting in complete digestion of epigyne soft tissues. Optimal conditions for soft tissue removal were 15.6 total enzyme units, pH 6.0 for 18 h at 42°C.

Keywords: Hydrolysis tissue, Epigyne, *Bromelia antiacantha*