

MPI, UN NUEVO INHIBIDOR PEPTÍDICO DE TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA DE ORIGEN VEGETAL

Cristian M. Lazza, Néstor O. Caffini y Laura M.I. López. Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE) Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Imilopez@biol.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Una regulación precisa de la actividad proteolítica tanto espacial como temporalmente es esencial para la fisiología humana, razón por la cual muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas. Los inhibidores de proteasas (IPs) de plantas son estructuras peptídicas pequeñas, que generalmente se encuentran en alta concentración en tejidos de almacenamiento, pero también son detectables en hojas en respuesta al ataque de insectos y microorganismos patógenos. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos.

La actividad de los inhibidores obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima y representan una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Los inhibidores de proteasas tienen promisorios usos farmacológicos en el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones parasitarias, fúngicas y virales (esquistosomiasis, malaria, candidiasis, SIDA, hepatitis, herpes), afecciones inflamatorias y respiratorias, cardiovasculares, coagulopatías y la enfermedad de Alzheimer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon semillas de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae). Los extractos crudos (EC) fueron obtenidos por trituración de las semillas (20 g se-

millas/100 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 7,2 conteniendo NaCl 0,5 M) y eliminando mediante centrifugación en frío gomas y restos de material insoluble. Estas preparaciones crudas fueron parcialmente purificadas por precipitación acetónica (5 vol.). El precipitado acetónico redisoluto fue denominado PAR.

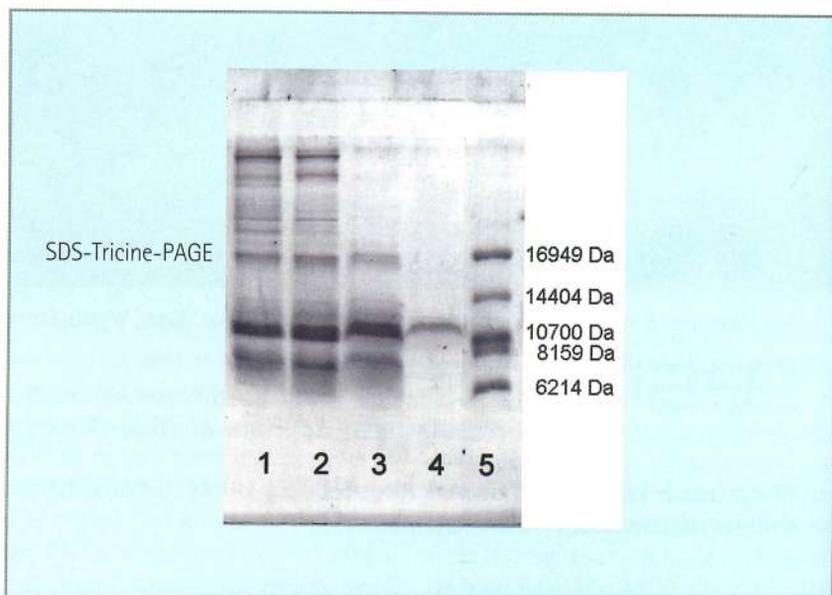
La actividad inhibitoria de tripsina bovina fue ensayada empleando el sustrato cromogénico sintético BAPNA según Erlanger et al. [1] y la actividad inhibitoria de quimotripsina bovina empleando el sustrato cromogénico sintético BTPNA según Tasneem et al. [2]. Se evaluaron las actividades enzimáticas de las proteasas en ausencia y presencia del EC y del PAR. En cada caso se determinaron las actividades específicas, se realizaron las curvas dosis-efecto y se obtuvieron las IC50.

Para la purificación se emplearon dos técnicas cromatográficas sucesivas: cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G50, buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,2) y cromatografía de intercambio iónico (HiTrap Q HP de 5 ml, buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,2 y un gradiente lineal de NaCl 0,0-0,15M). La pureza del inhibidor fue evaluada por SDS-Tricina-PAGE e isoelectroenfoque (IEF).

RESULTADOS

Se obtuvo un EC con actividad inhibitoria de tripsina y quimotripsina a partir de semillas de *M. pomifera* que fue parcialmente purificado (1,4 veces) por precipitación acetónica.

Los resultados del análisis por isoelectroenfoque (IEF) y SDS-PAGE del PAR permitieron definir la estrategia



de purificación a adoptar. Empleando cromatografía de exclusión molecular seguida de intercambio iónico se logró purificar un péptido con actividad inhibitoria de tripsina y quimotripsina; los factores de purificación fueron muy elevados: 112 y 109, respectivamente, para las enzimas antes mencionadas. Este nuevo inhibidor, denominado Mpl, resultó ser homogéneo por SDS-Tricine PAGE (11 kDa) y por IEF (pI = 5.2). Se determinó la IC50 para tripsina (0,17 µg/ml) y para quimotripsina (0,7 µg/ml). El rendimiento en proteínas fue de 0,09 mg/g semillas.

En la figura puede observarse el seguimiento por SDS-PAGE del proceso de purificación: carril 1: EC; carril 2: PAR; carril 3: cromatografía de exclusión molecular; carril 4: cromatografía de intercambio iónico (Mpl); carril 5: patrones peptídicos.

CONCLUSIONES

Se ha purificado y caracterizado un nuevo inhibidor peptídico de origen vegetal que es capaz de inhibir tripsina y quimotripsina. Es el primer inhibidor de este tipo obtenido a partir de especies pertenecientes a la familia Moraceae y resulta promisorio como potencial agente terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

Hopkins, A. L. & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1: 727-30

Brzin, J. & Kidric, M. (1995). Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 420-67

Ryan, CA. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu.Rev.Phytopath.* 28: 425-49.

Valueva, T.A. & V.V. Mosolov (1999). Protein inhibitors of proteinases in seeds: I. Classification, distribution, structure, and properties. *Russian J. Plant Physiol.* 46: 362-78.

Fear, G. Komarnytsky, S. & Raskin, I. (2007). Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 113: 354-368

CON PREGUNTAR NO SE PIERDE NADA.

¿Sabía que realizamos más de 170 auditorías?

Disponemos de los conocimientos, experiencia y un programa integral para hacerlo.

PROGRAMA DE ARMONIZACIÓN LABORATORIOS - PROVEEDORES

EL PROGRAMA SE BASA EN DOS ACTIVIDADES:

- **Auditorías** a proveedores conducidas por un Auditor Líder del IPACE, con opción de participación de profesionales de los laboratorios, armonizadas a través de guías de inspección específicas, consensuadas y probadas.

- **Capacitación** a proveedores focalizada en Buenas Prácticas de Fabricación, Gestión de Calidad, necesidades de la Industria Farmacéutica y herramientas para la Mejora Continua.

LOS OBJETIVOS:

- **Mejorar** en forma sustentable el nivel de calidad de los proveedores.

- **Racionalizar** los procedimientos de auditorías.

- **Economizar** recursos humanos y económicos por parte de los laboratorios en la realización de auditorías a sus proveedores.



FPNC FUNDECE IPACE
Excelencia Competitiva



Programa de Armonización
Laboratorios - Proveedores
de la Industria Farmacéutica



Leandro N. Alem 693, C1001AAB, Ciudad de Buenos Aires, 4311-2055 / 4313-8335 Fax: 4315-3492
proyecto.proveedores.if@ipace.org.ar www.ipace.org.ar