

# Caracterización de una Tripsina Aislada del Extracto de Visceras de Surubí (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Área del Conocimiento: Ciencias Exactas

Becario/a: VAN DE VELDE, Andrea Carolina

Director/a: LEIVA, Laura Cristina Ana

Facultad: FaCENA

E-mail: andrevdev@hotmail.com

## Objetivos

- Determinar los parámetros cinéticos de una enzima con actividad tripsina, de masa molecular estimada de 30 kDa, purificada desde un extracto alcalino de tejido mesentérico presente en estómago y duodeno de surubí (*Pseudoplatystoma corruscans*).
- Estudiar la Estabilidad de la enzima frente a diferentes pHs y Temperaturas.
- Evaluar su acción sobre cultivos celulares.



## Materiales y Método



La enzima se aisló desde un extracto alcalino de tejido mesentérico presente en estómago y duodeno de surubí por cromatografía de afinidad (Benzamidina Sepharosa)-descrito en trabajos previos-.

A partir de la misma se hicieron los siguientes estudios:

- 1. Actividad tripsina.** Se midió la absorbancia (410 nm-5min-30°C) del sustrato BApNA (Nα-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida) en presencia de enzima. Se determinó la velocidad (UI/L) -coef. de ext. 8800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>-.
- 2 Actividad quimotripsina.** Se midió la absorbancia (256 nm-5min-25°C) del sustrato BTEE (N-benzoil-L-tirosil etil éster) en presencia de metanol 10% y enzima. Se determinó la velocidad (UI/L) -coef. de ext 964 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>-.
- 3. Determinación de Vmax y Km:** A partir del gráfico de Lineweaver-Burk mediante medición de la velocidad a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (BApNA 0-1 mM).
- 4. Estabilidad de la enzima frente al pH.** La tripsina se pre-incubó a distintos pH (2.5, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 13), 120 min. Se midió la actividad BApNA residual comparándola con un control (enzima preincubada con buffer Tris-HCl pH 8.0, 100% de actividad).
- 5. Estabilidad de la enzima frente a la temperatura.** Se incubó la enzima a diferentes T (0, 8, 37,45, 50, 55, 60, 75 y 100°C) 120 min y, se midió la actividad BApNA residual con respecto a un control (a 30°C).
- 6. Tripsinización de células.** Se evaluó la actividad de la tripsina sobre células de la línea tEnd. La solución de tripsina aislada-EDTA 0.25% pH 7 se incubó con la monocapa celular (90% de confluencia) (2 min). Se utilizó tripsina comercial (Gibco®) para su comparación. La acción enzimática se detuvo con suero fetal bovino. Las células despegadas se tiñeron con Tripán blue y se contaron en cámara de Neubauer. Se calculó el % de células despegadas con la tripsina de surubí considerando el 100% a las despegadas con la tripsina comercial.

## Resultados y discusión



- 1. Actividad tripsina y quimotripsina.** La enzima aislada mantuvo una elevada actividad sobre BApNA -específico para tripsina-, similar al extracto alcalino. Por otro lado, la actividad sobre BTEE-específico para quimotripsina-, disminuyó casi en su totalidad (Tabla 1).
- 2. Determinación de los parámetros cinéticos Vmax y Km.** Se obtuvieron de la gráfica L-B (Fig 1). Los valores son 28490 UI/L y 2 mM, respect.
- 3. Estabilidad de la enzima frente a pH y temperatura.** La tripsina presenta su máximo de actividad a pHs alcalinos (8-9) y en un rango de 45-55 °C (Fig 2). Conserva su actividad a pHs 7-10 y se anula a pH inferiores a 2 y superiores a 13 (Fig. 2.A). Cuando el pH se aleja del óptimo, la actividad decrece debido, posiblemente, a que los cambios conformacionales en su estructura, consecuencia de la repulsión de cargas, no le permiten interactuar efectivamente con el sustrato. Por otro lado, la temperatura afectó la estabilidad de la tripsina (Fig 2.B). Se determinó que la enzima conserva su en el rango 0-55°C, y que temperaturas superiores la desnaturalizan, perdiendo la actividad por completo a partir de 75 °C.
- 4. Tripsinización de células.** Previo al ensayo celular, se igualaron las velocidades de las enzimas frente al sustrato BApNA (319 UI/L). La acción de la tripsina purificada fue equivalente al de la tripsina comercial, observándose en ambos casos un 100% de células despegadas y viables. La figura 3 muestra el efecto de la tripsina de surubí sobre una monocapa de células tEnd luego de incubarlas durante 2 min.

Estos resultados lograron sumar conocimientos sobre la caracterización de la enzima purificada del extracto alcalino de surubí, y abren la posibilidad del potencial uso comercial de estas enzimas ictícolas como alternativa a la comercial de origen porcino, dada la similitud entre sus actividades. Mayores estudios se requieren para evaluar si esta enzima presenta particularidades atractivas para su uso en ensayos de tripsinización.

Tabla 1. Actividad de enzimas básicas sobre sustratos específicos.

	Act. Tripsina (UI/L)	Act. Quimotripsina (UI/L)
Extracto alcalino	8.962,5	40.020
Tripsina purificada	8462	965

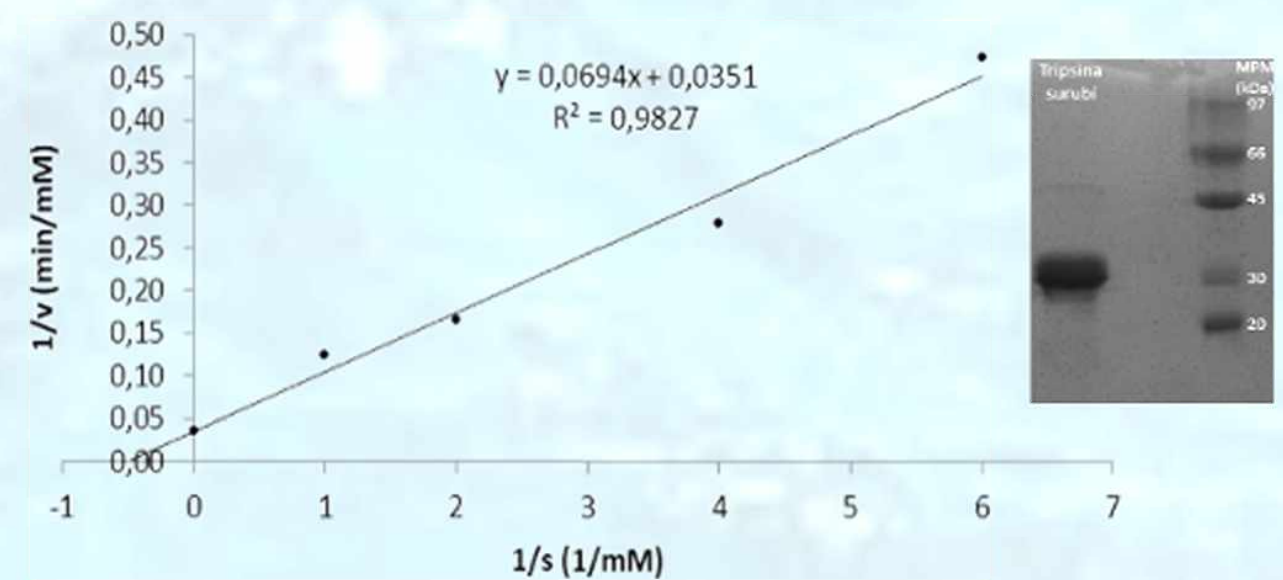


Figura 1. Gráfica de Lineweaver-Burk de la tripsina aislada del extracto alcalino de vísceras de surubí. Inserto: SDS-PAGE tripsina aislada.



Figura 2. Estabilidad de la tripsina aislada frente a distintos A. pHs B. temperaturas.

Figura 3. Efecto de la tripsina aislada del extracto alcalino obtenido de vísceras de surubí sobre una monocapa de células endoteliales tEnd.

