



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en Ciencias Mención en
Microbiología.

**Purificación y Caracterización *In Vitro* de Proteína
Anticongelante con Actividad Crioprotectora Proveniente
de la Cepa UDEC-P9.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Mención en
Microbiología.

JONATHAN HUMBERTO LARA VALENZUELA

CONCEPCIÓN-CHILE

2018

Profesor Guía: Dr. Carlos González Correa.

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. José Becerra Allende
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda.
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dedicatoria

Dedico esta tesis a quienes persiguen la verdad con esfuerzo.



AGRADECIMIENTOS.

Han sido varios años dedicados a esta hazaña. Años que, como todo en la vida, requieren de disciplina, esfuerzo y dedicación. Fueron tiempos donde no solo aprendí más sobre ciencia, sino también, sobre las relaciones humanas y lo difícil que son.

En primera instancia, agradecer a Dios por haberme dado la fuerza y la valentía de poder estar en estos momentos escribiendo esta nota. A la vida y su incesable flujo de energía. Al caos, por mostrarme lo bello de las emociones y cómo sostenerse en medio del vacío.

Agradezco también, a mi madre por presionarme día a día, para dar más de lo que soy capaz. A mi padre por estar conmigo y animarme. A mis hermanos por orientar y mostrarme cómo funciona esta sociedad.

A mi profesor tutor, Dr. Carlos González Correa por confiar, enseñarme a pensar y romper los límites de mi conocimiento y solucionar cada problema relacionado a este proceso.

Al Dr. Peter L. Davies por facilitar cordialmente la cepa control *E. coli* BL21-AFP.

A la Dra. Apolinaria García Cancino por facilitarme las dependencias de su laboratorio para la realización de esta tesis y por integrarme a los eventos sociales de su grupo de investigación.

A los profesores del Departamento de Microbiología por entregar su conocimiento y buena disposición a las nuevas generaciones.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, quienes fueron un soporte importante durante mi estadía en el programa.

A mi pareja, por apoyarme en todo momento.

Y a la música, por ser siempre el refugio que renueva día a día mi creatividad.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ambientes Fríos.....	1
1.2. Estrategias de sobrevivencia de bacterias en ambientes fríos.....	2
1.3. Proteínas de unión a hielo.....	3
1.3.1. Proteínas nucleantes de hielo (características, propiedades y modo de acción).....	3
1.3.2. Proteínas anticongelantes.....	5
1.4. Usos tecnológicos de las proteínas anticongelantes.....	8
1.5. Resultados previos en laboratorio.....	10
2. Hipótesis.....	12
3. Objetivo General.....	12
4. Objetivos específicos.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	13
5.2. Preparación de suspensiones bacterianas para detección de proteínas anticongelantes.....	13
5.3. Ruptura celular bacteriana.....	15
5.4. Cuantificación de proteínas.....	15
5.5. SDS-PAGE.....	16
5.6. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa.....	16
5.7. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares.....	17
5.8. Síntesis de nano partículas de oro (AuNP).....	18
5.9. Determinación de la actividad anticongelante utilizando nano partículas de oro (AuNP).....	18
5.10. Purificación de AFP a través de Ice-Shell.....	19

5.11. Búsqueda de AFPs en cepa UDEC-P9 secretadas al medio de cultivo.....	20
5.12. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 concentrada por filtración.....	21
5.13. Efecto de la temperatura sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada.....	21
5.14. Efecto de proteinasa K sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada.....	21
5.15. Análisis estadísticos.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Expresión de la proteína anticongelante tipo III de 8 kDa en la cepa de <i>E. coli</i> BL21.....	22
6.2. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa.....	25
6.3. Ensayo de nano partículas de oro con presencia de extractos citosólicos.....	28
6.4. Estabilidad de extractos citosólicos al congelamiento.....	29
6.5. Equipamiento y Estandarización de la técnica para visualización de cristales de hielo en capilares.....	30
6.6. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares.....	33
6.7. Estabilidad de los componentes proteicos con actividad IR.....	44
6.8. Efecto del frío sobre la producción de proteínas anticongelantes.....	45
6.9. Detección y purificación parcial de AFP UDEC-P9.....	46
6.10. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada por Ice-Shell.....	49
6.11. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada por filtración.....	50
6.12. Efecto de la temperatura sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada.....	51
6.13. Efecto de proteinasa K sobre la actividad de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada de cepa UDEC-P9 y filtrada.....	52
7. DISCUSIÓN.....	54
8. CONCLUSIONES.....	59
9. PROYECCIONES.....	60
10. REFERENCIAS	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de especies bacterianas con presencia de proteínas anticongelantes, modificado de Cid et al. (2016)	8
Tabla 2. Características de resistencia al frío y condiciones de cultivo de las cepas bacterianas usadas en el presente estudio. Fuente: Elaboración propia.....	14



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de purificación por método de Ice-Shell, extraído de Tesis de Carrión, (2017).....	20
Figura 2. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 2A) y su respectiva gráfica de migración vs intensidad (Figura 2B) mostrando la AFP tipo III de pez (8 kDa). La cepa de E. coli BL21-AFP se indujo con 0,6 mM IPTG. Carril 1: Marcador peso molecular 245 – 11 kDa. Carril 2: Extracto citosólico total de cepa de E. coli BL21 con expresión de AFP tipo III (flecha), la cual fue inducida con IPTG (0,6 mM). Carril 3: Extracto citosólico total de cepa de E. coli BL21 sin vector (Control negativo). Fuente: Elaboración propia	23
Figura 3. Detección por SDS-PAGE de AFP tipo III purificada mediante Ice-Shell (Figura 3A) y su respectiva gráfica de migración vs intensidad (Figura 3B). La AFP tipo III se purificó a partir de extracto citosólico de células obtenidas de 2 L de cultivo de la cepa E. coli BL21-AFP (ver Materiales y Métodos). La proteína (flecha) se visualizó en el gel mediante tinción coloidal Coomassie G-250. Carril 1: Estándar de proteínas 245 – 11 kDa, Carril 2: Extracto citosólico total, Carril 3: Extracto citosólico purificado por Ice-Shell. Las flechas indican la posición relativa de la proteína de interés en forma monomérica y dimérica. Fuente: Elaboración propia.....	24
Figura 4. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa (0,3% p/v). La matriz conteniendo 0,095 mg/mL de extractos citosólico soluble total, se sometió a un ciclo de congelamiento (-20°C por 24 h)/descongelamiento (1 h a T° ambiente) (ver Materiales y Métodos). I: Fotografía macroscópica de los cubos - Columna I-A: Matrices congeladas; Columna I-B: Matrices descongeladas - II: Fotografía microscópica de los cubos (40X). Columna II-C: Matrices congeladas. Columna II-D: Matrices descongeladas. Fuente: Elaboración propia	28
Figura 5. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro. Los ECS se mezclaron en concentraciones crecientes (entre 0,1 y 1,32 µg/mL) con una suspensión de nano partículas de oro y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia	29
Figura 6. Efecto del C/D en la inhibición de la agregación de nano partículas de oro. Se procedió en forma similar a lo descrito en la leyenda de la figura 6, excepto que previamente los ECS se sometieron a 5 ciclos de congelamiento (-20°C por 1 h) y descongelamiento (37°C por 10 minutos). Fuente: Elaboración propia.....	30

Figura 7. Dispositivo tipo vaso precipitado de doble pared confeccionado para el C/D de capilares conteniendo extractos citosólicos. Fuente: Elaboración propia	31
Figura 8. Fuente de luz usada para la visualización de cristales de hielo. Fuente: Elaboración propia.....	32
Figura 9. Instrumentos utilizados para la observación y registro fotográfico de cristales de hielo. A: Lente 60X para celular. B: Par de filtros usados para generar polarización cruzada. C: Filtros dispuestos perpendicularmente observándose el efecto de polarización cruzada. D: Celular acoplado con uno de los filtros y el lente 60X. E: Dispositivo tipo vaso precipitado con filtro y set de capilares. Fuente: Elaboración propia.....	32
Figura 10. Visualización de cristales de hielo en capilares. A: Esquema que detalla el proceso de observación de cristales de hielo. B: Resultado de la visualización de cristales de hielo en un capilar. Fuente: Extraído y modificado de Google.....	33
Figura 11. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa <i>Pseudomonas trivialis</i> UDEC-P4 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	34
Figura 12. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa RIO-6P a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia	35
Figura 13. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-A5 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	36
Figura 14. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P11 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	37

Figura 15. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P9 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	38
Figura 16. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-A8 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	39
Figura 17. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P7 a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	40
Figura 18. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa de E. coli BL21 que presenta una AFP tipo III (control positivo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia	41
Figura 19. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con la proteína de suero de albumina bovina (BSA) (control negativo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia.....	42
Figura 20. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa de E. coli BL21 que no presenta una AFP tipo III (control negativo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia..	43
Figura 21. Estabilidad de los componentes proteicos de la cepa UDEC-P9 en capilares, luego de 48 h a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y	

Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia 44

Figura 22. Estabilidad de los componentes proteicos de la cepa UDEC-P9 en capilares, luego de 168 h a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia 45

Figura 23. Perfil de proteínas totales del ECS de la cepa UDEC-P9. A) Gel SDS-PAGE: Carril 1, Estándar de proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, Extracto citosólico total no inducido; Carril 3, Extracto citosólico total inducido. B) Representación gráfica del perfil de proteínas del SDS-PAGE. Las flechas indican las proteínas inducidas por incubación a 4°C . Fuente: Elaboración propia..... 46

Figura 24. Purificación de AFP de la cepa UDEC-P9 por Ice-Shell. El ECS de cultivo de la cepa UDEC-P9 inducida, se sometió a purificación por Ice-Shell (ver Materiales y métodos). A) Gel SDS-PAGE: Carril 1, Estándar proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, ECS sin purificar; Carril 3, Primer ciclo de purificación; Carril 4, Segundo ciclo de purificación; Carril 5, Tercer ciclo de purificación. B) Representación gráfica del perfil de proteínas del gel SDS-PAGE. La flecha indica la AFP parcialmente purificada. Fuente: Elaboración propia..... 47

Figura 25. Purificación por filtración de AFP UDEC-P9. La AFP parcialmente purificada por Ice-Shell (Figura 24A) se sometió a filtración en centrífuga con límite de exclusión 50 kDa. A) SDS-PAGE: Carril 1, Estándar proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, AFP UDEC-P9 filtrada. B) Representación gráfica de perfil de proteínas del gel. Fuente: Elaboración propia 48

Figura 26. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP de cepa UDEC-P9. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP purificada por Ice-Shell (0.15 mg/mL) y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia 49

Figura 27. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP de E. coli BL21-AFP. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP purificada por Ice-Shell (0.15 mg/mL) y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia 50

Figura 28. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP UDEC-P9 concentrada. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP concentrada con centración de 50 kDa (ver Materiales y métodos). El rango de extinción E_{520}/E_{650} se calculó de forma similar a la figura 25 y 26. Fuente: Elaboración propia	51
Figura 29. Estabilidad de AFP UDEC-P9 al calentamiento. Se realizó el mismo ensayo descrito en la Figura 26, pero sometiendo previamente una fracción a calentamiento a ebullición por 15 minutos y se determinó su actividad a través del rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y métodos). Fuente: Elaboración propia.....	52
Figura 30. Estabilidad de AFP UDEC-P9 a degradación por proteinasa K. Se realizó el mismo ensayo descrito en la Figura 26, pero sometiendo previamente una fracción a incubación por 1 h con proteinasa K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Su actividad se determinó a través del rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y métodos). Fuente: Elaboración propia	53
Figura 31. Purificación parcial por Ice-Shell de ECS provenientes de las cepas UDEC-P7 (Carriles 2 y 3) y UDEC-A8 (Carriles 4 y 5). Carril 1: Estándar proteínas 245 – 11 kDa. Carril 2: Extracto citosólico sin purificar de la cepa UDEC-P7. Carril 3: Purificación por Ice-Shell del extracto citosólico de la cepa UDEC-P7. Carril 4: Extracto citosólico sin purificar de la cepa UDEC-A8. Carril 5: Purificación por Ice-Shell del extracto citosólico de la cepa UDEC-A8. Fuente: Carrión, 2017	58

ABREVIATURAS.

α : Alfa

AFP: Antifreeze protein

AFGP: Antifreeze glicoprotein

ATCC: American Type Culture Collection

β : Beta

BSA: Bovine Serum Albumin (Albúmina de suero bovino)

°C: Grados Celsius.

ECS: Extracto citosólico soluble

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

g: Unidades de gravedad (expresión de fuerza centrífuga relativa, RCF)

h: horas

HAuCl₄.3H₂O: ácido cloroáurico tri hidratado

HCl: Ácido Clorhídrico

IR: Inhibición de la recristalización

kDa: kilo Dalton

mL: Mililitros

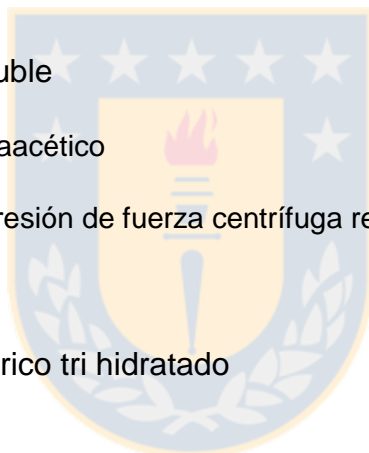
mM: Mili molar

mm: Milímetros

N.D: No determinado

ng: Nano-gramo

nm: Nanómetros



pH: Potencial de Hidrogeniones

PMSF: Phenyl methyl sulfonyl Fluoride (Fluoruro de fenil metil sulfonilo)

p/v: Porcentaje peso/volumen

R₂A: Reasoner's 2A Agar/medio de cultivo

rpm: Revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico).

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

UFC: Unidad formadora de bacteria

µg: Microgramos

µL: Microlitros

V: Voltio



RESUMEN

La síntesis de proteínas anticongelantes (AFPs) en los organismos vivos es una de las estrategias de sobrevivencia al daño que produce el congelamiento y descongelamiento (C/D). Estas proteínas presentan alta diversidad estructural, que se ha relacionado con sus propiedades funcionales, consistentes en la unión al hielo en formación y la inhibición de su crecimiento. Dos propiedades funcionales de importancia de las AFP son la histéresis termal (HT) y la inhibición de la recristalización (IR). La HT consiste en la disminución del punto de congelamiento del agua sin alterar el punto de fusión; en tanto, la IR consiste en la inhibición del proceso de unión de cristales de hielo durante el descongelamiento. El objetivo de esta tesis fue determinar si la purificación de la AFP UDEC-P9, producida por una cepa previamente aislada, altera sus propiedades funcionales (efecto crioprotector e IR) *in vitro*. Inicialmente, se trabajó con 2 cepas patagónicas (UDEC-P4 y UDEC-P9) además de 5 cepas ensayadas en trabajo paralelo (Patagónicas: UDEC-P7, UDEC-P11, RIO-6P; Antárticas: UDEC-A5, UDEC-A8). También, se incluyeron las cepas *Escherichia coli* BL21-AFP (control positivo) y las cepas *E. coli* BL21 y *E. coli* ATCC25922 (controles negativos). Todas las cepas se incubaron a 25°C, se indujeron a 4°C por 72 h y se sometieron a ruptura por ultrasonido. El extracto citosólico soluble (ECS) se obtuvo por centrifugación a 12.000g por 30 minutos.

Los resultados muestran que los ECS de las cepas UDEC-A5 y UDEC-P11 no tienen capacidad crioprotectora; las otras, solo el ECS de la cepa UDEC-P9 dio positivo a todos los ensayos. La AFP purificada presentó peso molecular 67.000 y mantuvo su actividad crioprotectora en nano partículas de oro, pero perdió esta capacidad por tratamiento con proteasa. El calentamiento a ebullición afectó parcialmente su actividad. El análisis global de los resultados permite aceptar la hipótesis planteada y sugiere la presencia de una AFP con potencial uso biotecnológico, por sus peculiares características. Actualmente se han iniciado estudios tendientes a detectar su codificación genética y su clonación para ser sobre-producida *in vitro*.

ABSTRACT

Bacterial strains synthesize antifreeze proteins (AFPs) like other living organisms as a survival strategy to avoid freezing and thawing damage. These proteins have high structural diversity, but the same ice-binding domain, which is related to their functional properties. AFPs bind ice crystals in formation and inhibit their growth. Two important functional properties of AFPs are thermal hysteresis (HT) and inhibition of recrystallization (IR). The HT is the gap of temperature between the melting point of ice and the freezing point, while IR consist in the inhibition of the process of union of ice crystals during the thawing process. The aim of this thesis was to determine if the purification of a specific AFP (AFP UDEC-P9), produced by a previously isolated Patagonian strain, alters its functional properties *in vitro*. Initially, we worked with two strains (UDEC-P4 and UDEC-P9) in addition to five strains tested in a parallel work (Patagonian: UDEC-P7, UDEC-A11, RIO-6P; Antarctic: UDEC-A5, UDEC-A8). The strain *Escherichia coli* BL21-AFP (positive control) and strains *E. coli* BL21 and *E. coli* ATCC25922 (negative controls) were also included. All strains were grow at 25°C, induced at 4°C for 72 h and disrupted by ultrasound. The soluble cytosolic extract (SCE) was collected by centrifugation at 12,000g for 30 min.

The results show that the SCE of strains UDEC-A5 and UDEC-P11 do not have cryo-protective property; while the UDEC-P9's SCE showed positive results for all the tests assayed. This AFP showed a molecular weight of 67,000 and its purification did not affect its cryo-protective activity of gold nanoparticles. This capacity was abolished with protease treatment and it was partially affected by 15 min of boiling.

The results allows the acceptance of the proposed hypothesis and suggests the presence of an AFP with potential biotechnological use, due to its peculiar characteristics. Currently, studies are conducted for detecting its genetic coding and cloning to be over-produced *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ambientes Fríos.

El ser humano es un animal mesófilo, incapaz de soportar grandes variaciones de temperatura, excepto mediante la adopción de medidas especiales que no implican adaptaciones fisiológicas o bioquímicas. No es sorprendente, por lo tanto, considerar estos ambientes fríos como extremos para él, particularmente, aquellos en que la temperatura oscila alrededor de cero grados Celsius (Gounot, 1991). El planeta Tierra presenta numerosos ambientes de este tipo, con bajas temperaturas (Casanueva *et al.* 2015), como por ejemplo la Patagonia Chilena, ubicada en la XI Región de Aysén. La Patagonia, por su relativo aislamiento, presenta ecosistemas acuáticos que pueden ser considerados libres de contaminación, generalmente oligotróficos, con bajas temperaturas, transparentes y con baja productividad primaria (Soto 2002; Aguayo *et al.* 2014), dentro de los cuales es posible encontrar lagos y lagunas prístinos (De Los Ríos & Soto 2009).

En la naturaleza, encontrar bacterias que son capaces de sobrevivir y proliferar en bajas temperaturas no es sorprendente, dado que el 71% de la superficie de la tierra está cubierta de océanos (con un promedio de temperatura de 2°C a 4°C), de los cuales el 15% corresponde a zonas polares, glaciares, montañas alpinas y permafrost (Cid *et al.* 2016). Estos microorganismos adaptados a bajas temperaturas se clasifican en dos grupos: Psicrófilos y psicrotrofos. Los organismos psicrófilos, presentan una temperatura mínima entre -5°C y 5°C, una óptima entre 12°C y 15°C y una máxima entre 15°C y 20°C, y para psicrotrofos, las temperaturas mínimas están entre 0°C y 5°C, un óptimo entre 25°C – 30°C y una máxima entre 30°C – 35°C (Casanueva *et al.* 2015; Gounot, 1991; Kasana, 2010).

1.2. Estrategias de supervivencia de bacterias en ambientes fríos.

La vida en la Tierra exhibe una enorme capacidad adaptativa (Jaenicke & Böhm, 1998). Muchas plantas, insectos y otros organismos han evolucionado con mecanismos adaptativos únicos que les permite sobrevivir en ambientes con extremas temperaturas (Harding & Haymet, 2003), donde una de las desventajas más obvias de la vida a bajas temperaturas es la baja tasa de catálisis. En ecosistemas acuáticos fríos, las bacterias comparten propiedades fisiológicas que les permiten sobrevivir a estas variaciones térmicas impuestas por el ambiente (Priscu & Christner 2003). Así, esta habilidad de los microorganismos para adaptarse a bajas temperaturas, primariamente depende de la presencia de sensores en sus membranas, que detectan los cambios de temperatura (Shivaji & Jogadhenu, 2010), para posteriormente transducir la señal al genoma, lo que desencadena una cascada regulatoria de genes que están relacionados con la adaptación al frío.

El efecto de las temperaturas bajo cero en células de plantas, animales, bacterias y hongos puede ser extremadamente dañino y/o mortal (Cheng & DeVries, 1991; Harding & Haymet, 2003). Ante esto, existen al menos dos estrategias de supervivencia a temperaturas de congelamiento: la primera es evadir el congelamiento mediante la reducción de la temperatura de sobre enfriamiento o la nucleación de hielo, mientras que la segunda consiste en ser tolerantes al congelamiento (Xu *et al.* 1998). El primer mecanismo de supervivencia, involucra la acumulación de compuestos de bajo peso molecular como glicerol, sorbitol u otros compuestos que tengan actividad anticongelante, actuando de manera coligativa, es decir, mientras más concentrado se encuentre dicho compuesto, mayor será el efecto protector (Driedzic *et al.* 2006; Yeh & Feeney, 1996). Otros mecanismos consisten por ejemplo en variar la fluidez de la membrana modificando a fosfolípidos insaturados (Gilbert *et al.* 2004) y sintetizar proteínas anticongelantes (AFPs y AFGPs). Estas últimas, encontradas en peces, insectos, bacterias y plantas (Yeh & Feeney, 1996; Davies, 2014; Nada & Furukawa,

2012), presentan una amplia diversidad estructural y tienen en común, la habilidad de unirse al hielo e inhibir su crecimiento (Nada & Furukawa, 2012; Davies & Sykes, 1997; Davies, 2014). Finalmente, la segunda estrategia de sobrevivencia consiste en secretar proteínas nucleantes de hielo hacia el ambiente extracelular.

A continuación, se describen los tipos de proteínas capaces de regular o mediar la resistencia al hielo en bacterias.

1.3. Proteínas de unión a hielo.

1.3.1. Proteínas nucleantes de hielo (características, propiedades y modo de acción)

Las proteínas nucleantes de hielo fueron descubiertas por Soulage, un meteorólogo francés que identificó por primera vez células bacterianas en un cristal de hielo (Morris *et al.* 2004). Posteriormente, el descubrimiento del gen que controla la actividad nucleante de la bacteria fue un gran avance en el estudio de la función que tienen estas proteínas y cómo la bacteria causa daño, el cual consiste en generar cristales de hielo para atacar los tejidos externos de la planta y así establecerse (Morris *et al.* 2004).

La nucleación del hielo es el proceso que ocurre cuando los cristales de hielo están formados y comienza el crecimiento (Jingkun & Tung-Ching, 1998). Sin embargo, en ausencia de catalizadores de núcleos de hielo, es posible encontrar el agua en estado líquido a temperaturas bajo 0°C, este fenómeno es conocido como súper enfriamiento del agua. El congelamiento espontáneo del agua en este estado ocurre bajo los -39°C y para la formación de hielo en estas condiciones, se necesita aproximadamente de 70 moléculas de agua, mientras que para la formación de hielo a -5°C en estas mismas

condiciones, requiere de 45.000 moléculas aproximadamente (Morris *et al.* 2004), por lo tanto, aquellas bacterias que presentan estos componentes proteicos disminuyen la energía necesaria para congelar el agua.

Cuando los núcleos de hielo aparecen en organismos tolerantes al congelamiento, se cree que las proteínas nucleantes de hielo generalmente juegan un rol controlando y estabilizando el crecimiento y la morfología de los cristales de hielo orientando las moléculas de agua en una estructura similar al hielo a temperaturas levemente inferior a 0°C, permitiendo al organismo evadir el daño a la membrana celular (Morris *et al.* 2004; Vanderveer, 2013). La actividad de nucleación de hielo por bacterias está determinada por una proteína que se encuentra anclada a la membrana externa con un glicosilfosfatidilinositol expuesta al ambiente externo o secretadas al espacio extracelular (ECINS) (Vanderveer, 2013). Así, aquellas que presentan estas proteínas son denominadas Ina⁺, mientras que aquellas que no, son denominadas Ina⁻ (Joly *et al.* 2013).

Se ha descrito que estas proteínas nucleantes de hielo son producidas por ciertas cepas de bacterias asociadas a plantas, particularmente miembros de los géneros *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp. (*Erwinia* sp.) y *Xanthomonas* sp. (Vanderveer *et al.* 2013).

Hasta la fecha, se han descrito tres tipos de proteínas nucleantes de hielo, las cuales son clasificadas de acuerdo a la temperatura a la cual son capaces de iniciar la nucleación del hielo: Las de tipo I son capaces de iniciar la nucleación del cristal de hielo entre 0°C y -3°C; las de tipo II entre -5°C y -7°C y las de tipo III por debajo de -7°C, siendo esta última la más abundante (Hartmann *et al.* 2013).

1.3.2. Proteínas anticongelantes

Por otro lado se encuentran las proteínas anticongelantes (AFPs), las cuales fueron descubiertas en organismos que pueden sobrevivir en ambientes donde las temperaturas bordean los 0°C, incluyendo organismos como peces teleósteos, artrópodos terrestres, hongos, bacterias, plantas vasculares y no vasculares (Ding *et al.* 2015; Cid *et al.* 2016).

Como ambas (AFGPs y AFPs) disminuyen la temperatura de congelamiento de una solución por debajo del punto de fusión, existe una propiedad denominada histéresis termal (HT) que es utilizada para determinar la actividad anticongelante (Yeh & Feeney, 1996; Davies, 2014; Davies & Sykes, 1997; Guo *et al.* 2012; Barret, 2001; Nasser *et al.* 2011). Esta se define como la diferencia de temperatura entre el punto de fusión y el punto de congelamiento de un cristal de hielo causado por una proteína anticongelante a una superficie de hielo. De acuerdo a este valor de histéresis termal,, estas proteínas pueden ser clasificadas, pudiendo ser moderadas o hiperactivas, donde aquellas que son hiperactivas se unen tanto a la cara basal como a la prismática del cristal de hielo, mientras que aquellas que son moderadas se unen solo a la cara prismática del cristal en formación (Cid *et al.* 2016). Proteínas hiperactivas presentan valores más altos de histéresis termal *in vitro* (5°C o mayor) y pueden llegar a ser 10 veces más efectivas a concentraciones basales (Scotter *et al.* 2006; Davies, 2014). En ciertos organismos, incluyendo bacterias, se ha descrito que las AFPs muestran niveles moderados de histéresis termal, pero presentan niveles significativos de Inhibición de la recristalización. Esto indica que la función de las AFPs en bacterias puede deberse más a la disminución del daño celular que prevenir el congelamiento propiamente tal (Wilson & Walker, 2010).

Otra propiedad es la inhibición de la recristalización, el cual es un proceso que ocurre a altas temperaturas bajo cero, en el que crecen grandes cristales de hielo a expensas

de cristales pequeños (Nasser *et al.* 2011). Las AFGPs se encuentran principalmente en la sangre de peces como bacalao y peces de la familia Nototheniidae (Harding & Haymet, 2003). Su estructura primaria se compone de una cadena de tripéptidos repetidos de Alanina-Alanina-Treonina (Ala-Ala-Thr), en los cuales el hidroxilo secundario del residuo de la Treonina se encuentra glicosilado en unión a una unidad de disacárido β -D-galactosil-(1,3)- α -D-N-acetilgalactosamina (Harding & Haymet, 2003; Yeh & Feeney, 1996).

Existen 8 tipos diferentes de AFGPs (1 – 8), catalogadas en relación a la migración relativa en geles de electroforesis, donde el rango de masa molecular varía desde 34.000 Da a 2.600 Da respectivamente, y dentro de las cuales por ejemplo, las AFGPs 7 y 8 presentan una actividad anticongelante débil, concluyendo entonces, que aquellas de mayor peso molecular, tienen una mejor actividad anticongelante (Rubinsky *et al.* 1990).

Por otro lado, las AFPs se han encontrado en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, insectos, animales y plantas (Gilbert *et al.* 2005; Utsun & Turham, 2015). Estas varían en cuanto a su estructura proteica y composición aminoacídica (Jin-Yao & Fu-Chun, 2005) y se clasifican desde AFPs tipo I – IV (Barret, 2001; Utsun & Turham, 2015).

A diferencia de los compuestos químicos crioprotectores, las AFPs y AGFPs no actúan de manera coligativa, por lo que si hay una alta concentración de proteínas, la actividad de éstas no incrementará significativamente (Yeh & Feeney, 1996). La principal característica que presentan las proteínas anticongelantes en microorganismos como diatomeas, algas, hongos, levaduras y bacterias es que son proteínas secretadas al medio extracelular para poder así mantener los canales de agua abiertos, rodeando el hielo, permitiendo que estos microorganismos puedan incorporar nutrientes y crecer

en el nicho en el que se encuentran (Davies, 2014). Actualmente, se ha descubierto que pueden cumplir diferentes roles en los diferentes organismos que la posean, los cuales incluyen: tolerancia al frío, estructuración del hielo y adhesión al hielo, que van más allá de la función original de prevenir el congelamiento del organismo (Davies, 2014).

El sitio de unión al hielo es la región funcional de una AFP. Debido a la baja similitud que existe entre secuencias de AFPs, casi no hay secuencias comunes o pliegues estructurales para ayudar a identificar dicho sitio. Por lo tanto, la forma más directa de determinar el sitio de unión de una AFP al hielo, es usando mutagénesis dirigida por sitio, para estudiar sistemáticamente cómo los cambios en la propiedad y/o el tamaño de los residuos afectan la actividad anticongelante (Wang *et al.* 2017).

Se ha descrito que uno de los mecanismos de adsorción al hielo de estas proteínas se debe a la interacción con puentes de hidrógeno que presentan los residuos aminoácidos con moléculas de agua, los cuales pueden interactuar con los átomos de oxígeno del agua y ordenarlos espacialmente (Cheng & DeVries, 1991). También se menciona, la importancia de residuos aminoácidos hidrofóbicos, particularmente, residuos de prolina, que serían los encargados de generar este sitio de unión al hielo (Wang *et al.* 2017).

Hasta la fecha se han descrito diferentes géneros bacterianos con presencia de proteínas anticongelantes, siendo algunos de estos: *Micrococcus* sp. *Roshococcus* sp. *Pseudomonas* sp. entre otros, los cuales se encuentran descritos en la Tabla 1 con el tipo de proteína encontrada.

Tabla 1. Resumen de especies bacterianas con presencia de proteínas anticongelantes, modificado de Cid *et al.* (2016)

Especie bacteriana	Tipo de proteína	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>Micrococcus cryophilus</i>	No caracterizada	N.D	Duman & Olsen, 1993
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	No caracterizada	N.D	Duman & Olsen, 1993
<i>Pseudomonas putida</i> GR12-2	Glicoproteína	~34	Sun <i>et al.</i> , 1995
<i>Moraxella</i> sp.	Lipoproteína	52	Yamashita <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KUAF-68	No caracterizada	80	Kawahara <i>et al.</i> , 2004
<i>Marinomonas primoryensis</i>	Proteína dependiente de Ca ²⁺	N.D	Gilbert <i>et al.</i> 2005
<i>Colwellia</i> sp. SLW05	Proteína β-hélice	~25	Raymond <i>et al.</i> , 2007
<i>Flavobacterium xanthum</i> IAM12026	Proteína dependiente de malato	59	Kawahara <i>et al.</i> , 2007

1.4. Usos tecnológicos de las proteínas anticongelantes.

Durante un par de décadas, se ha reconocido que los microorganismos adaptados a ambientes fríos poseen un potencial biotecnológico bastante significativo, ofreciendo numerosas ventajas tanto económicas como ecológicas (Kasana, 2010; Cid *et al.* 2016), donde proteínas anticongelantes han sido uno de los focos de atención para su aplicación en diferentes áreas de criopreservación (Feeney & Yeh, 1998; Nasser *et al.* 2011), debido a que los métodos convencionales de criopreservación presentan una

toxicidad que, si bien es baja, afecta económicamente los procesos de criopreservación *in vivo* de material biológico (Davies, 2014).

La criopreservación es el proceso en el cual células, tejidos o alimentos son congelados a temperaturas bajo 0°C, para disminuir las funciones vitales de una célula o un tejido y así mantenerlo en condiciones de vida suspendida o preservado por mucho tiempo (Ávila-Portillo *et al.* 2006).

La criopreservación de alimentos ha sido utilizada por muchos años para mantener la calidad del producto por un período mayor de tiempo (Li & Sun, 2001).

Es por ello, que las proteínas anticongelantes pueden ser útiles en reducir el daño en tejidos no solamente en el proceso de congelamiento de alimentos (Payne *et al.* 1993), sino también en el descongelamiento (Boonsupthip & Lee, 2003), previniendo principalmente el proceso de recristalización que es el que más daño produce cuando se lleva a cabo este último proceso en productos alimenticios como la carne. Los cristales de hielo pueden dañar la membrana de células y otras estructuras, causando denaturación de proteínas, reduciendo la capacidad de retener agua y disminuyendo la calidad nutricional del producto a congelar. Por lo tanto, la prevención de la recristalización en alimentos congelados es de particular importancia (Payne *et al.* 1993).

Dentro de las aplicaciones encontradas en literatura, se destaca el uso de estas proteínas en la producción de helados, mantenimiento de carne congelada (Feeney & Yeh, 1998), en la criopreservación de glóbulos rojos (Chao *et al.* 1996; Kang & James, 2004), preservación de tejido ovárico (Jaewang *et al.* 2015; Jung *et al.* 2015), en embriones de peces (Martínez *et al.* 2008) en plantas ornamentales (Su *et al.* 2015),

entre otros, todos con resultados favorables que incrementan la viabilidad del producto criopreservado.

1.5. Resultados previos en laboratorio

De acuerdo a los resultados encontrados por Rojas (Tesis para optar al grado de Bioquímico, 2013), se obtuvo que a partir de 13 cepas aisladas desde la Patagonia y la Antártica Chilena, las cepas UDEC-P9, UDEC-P10 y UDEC-P11 fueron las que mejor respondieron a los ensayos realizados. Estas presentan una capacidad alta de tolerancia a ciclos de congelamiento/descongelamiento y los extractos citosólicos solubles (ECS) que contenían proteínas totales, demostraron tener actividad crioprotectora sobre matriz polimérica de agarosa y sobre la actividad enzimática en Láctico Deshidrogenasa. En cuanto a la detección mediante la técnica de Ice-Finger (Kuiper *et al.* 2013), fue posible establecer la presencia de fracciones proteicas las cuales sugieren que corresponden a proteínas anticongelantes.

Por otra parte, los resultados obtenidos por Espinoza (Tesis para optar al grado de Bioingeniero, 2014), demuestran que de 26 cepas seleccionadas, solo una cepa (cepa 43) presentó una alta tolerancia al congelamiento. En cuanto al ECS proveniente de esta bacteria, demuestra tener un efecto crioprotector sobre matriz polimérica de agarosa. La detección por Ice-Finger sugiere también la presencia de proteínas anticongelantes.

Finalmente, en estudios realizados por Lara (Unidad de investigación, Magíster en Ciencias mención Microbiología, 2015) se corroboró la tolerancia a 20 ciclos de congelamiento/descongelamiento de la cepa patagónica de *Pseudomonas trivialis* UDEC-P4 y de la cepa UDEC-P9, encontrando en ambas, una tolerancia media al ensayo mencionado anteriormente. Por otro lado, los ECS de estas cepas, demostraron tener una actividad crioprotectora también sobre una matriz polimérica

de agarosa. Finalmente, a través de un SDS-PAGE se estableció la presencia de algunas bandas proteicas, que una vez inducidas por 72 h a 4°C se observó un incremento relativo en la intensidad, sugiriendo la posibilidad de que se trate de proteínas anticongelantes.

Por lo tanto, considerando que:

1. No se dispone en el comercio de proteínas AFP provenientes de origen bacteriano, sólo existe oferta de AFPs de peces y plantas.
2. En el laboratorio no se ha logrado, a la fecha, disponer de una AFP de origen bacteriana purificada.
3. El costo de producción de la proteína comercial es elevado (5000 – 7000 USD por gramo) y debido a que el impacto ambiental por uso de la fuente de origen es significativo, el empleo de bacterias disminuiría este impacto.
4. Y finalmente, que el proceso de purificación de AFPs podría afectar las propiedades funcionales de éstas (Feeney *et al.* 1990; Marshal *et al.* 2005) se postula la siguiente pregunta de investigación:
 - ¿Se afectará la capacidad crioprotectora o anticongelante de la proteína AFP de la cepa UDEC-P9 por efecto de la criopurificación?

2. Hipótesis.

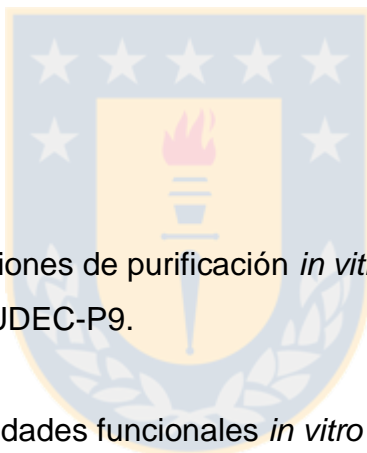
“Las propiedades funcionales (efecto crio-protector e IR) de la proteína anticongelante obtenida de la cepa UDEC-P9 se mantienen inalteradas luego de realizar el proceso de purificación por afinidad al hielo”

3. Objetivo General.

- Determinar si el proceso de purificación por afinidad al hielo de la proteína anticongelante presente en la cepa UDEC-P9 afecta sus propiedades funcionales *in vitro*

4. Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones de purificación *in vitro* de la proteína anticongelante presente en la cepa UDEC-P9.
- Determinar las propiedades funcionales *in vitro* de la proteína anticongelante purificada en presencia de nano partículas de oro.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

En esta tesis se emplearon las siguientes cepas, aisladas desde muestras de origen patagónico, como fuente de potenciales proteínas anticongelantes: *P. trivialis* UDEC-P4, UDEC-P7, UDEC-P9, UDEC-P11, RIO-6P. Además, se utilizaron las cepas antárticas UDEC-A5 y UDEC-A8. Todas las cepas se encontraban disponibles en el Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación, Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción.

Como control negativo de síntesis de AFP en algunos ensayos, se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC25922 y la cepa *E. coli* BL21 (DE3); En tanto, como control positivo se empleó la cepa *E. coli* BL21-AFP gentilmente proporcionada por el Dr. Peter L. Davies (Queen's University, Canada).

A menos que se indique lo contrario, las cepas se cultivaron en caldo Trypticasa (DIFCO) o R₂A (DIFCO) a 25°C, con agitación rotatoria (180 rpm) (ver Tabla 2). La Tabla 2 muestra, además, la resistencia al congelamiento y descongelamiento de las cepas (Rojas, Tesis para optar al grado de Bioquímico, 2010).

5.2. Preparación de suspensiones bacterianas para detección de proteínas anticongelantes.

Las cepas UDEC-P4, UDEC-P9, UDEC-A8, *E. coli* 25922, y *E. coli* BL21 se cultivaron en 1 L de caldo Trypticasa, en tanto las cepas UDEC-P7, UDEC-P11 y UDEC-A5 y RIO-6P en 1 L de caldo R₂A. Todos los cultivos se realizaron a 25°C con agitación rotatoria (180 rpm) hasta obtener fase exponencial tardía (aproximadamente 5x10⁸ UFC/mL). Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a un shock frío a 4°C por 72 h, para inducir la expresión de posibles proteínas con actividad anticongelante (Xu *et*

al. 1998; Muñoz *et al.* 2017) y las células se colectaron por centrifugación a 9000g por 10 minutos (Liou *et al.* 2000).

Tabla 2. Características de resistencia al frío y condiciones de cultivo de las cepas bacterianas usadas en el presente estudio. Fuente: Elaboración propia

Nombre	Resistencia (C/D)*	Condiciones de cultivo
<i>Pseudomonas trivialis</i> UDEEC-P4	Media	Caldo Tripticasa a 25°C
UDEEC-P7	Media	Caldo R ₂ A a 25°C
UDEEC-P9	Alta	Caldo Tripticasa a 25°C
UDEEC-P11	Alta	Caldo R ₂ A a 25°C
RIO-6P	Alta	Caldo R ₂ A a 25°C
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> UDEEC- A5	Alta	Caldo R ₂ A a 25°C
UDEEC-A8	Alta	Caldo Tripticasa a 25°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Baja	Caldo Tripticasa a 30°C
<i>Escherichia coli</i> BL21- AFP	N.D	Caldo LB a 30°C

C/D= congelamiento por 1 h y descongelamiento por 1 h. Datos originales obtenidos de la Tesis de Claudio Rojas González (2010) y María José Schade (2012). N.D = No determinado.

Cada pellet de células se lavó dos veces con suero fisiológico al 0,9% p/v y se suspendió en 5 mL de Buffer Tris-HCl 50 mM, 1 mM EDTA hasta su procesamiento.

La cepa de *E. coli* BL21-AFP se cultivó en 1 L de caldo LB (DIFCO) en agitación (180 rpm) a 30°C hasta obtener una O.D₆₀₀ de 0,65. Luego se indujo la producción de la AFP tipo III con IPTG a una concentración de 0,6 mM. El cultivo se incubó a 25°C durante 16 h para posteriormente centrifugar y proceder bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

5.3. Ruptura celular bacteriana.

Cada suspensión bacteriana fue suplementada con fluoruro de fenil metil sulfonilo (PFMS) (1mM) y sometida a ruptura celular por ultrasonido –7 ciclos de 25 segundos a 60% amplitud con incubación por 30 segundos en hielo entre ciclos (Sonicador Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processors)- de acuerdo al procedimiento utilizado por Lin *et al.* (2011). Finalizada la ruptura, se suplementó nuevamente con PFMS, y se centrifugó a 12.000g por 30 minutos a 4°C (Liou *et al.* 2000). Se recuperó el sobrenadante conteniendo las potenciales AFPs (extracto citosólico) y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

5.4. Cuantificación de proteínas.

Con este propósito, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) y como estándar, albúmina sérica bovina (BSA). Se mezclaron 250 µL de reactivo Bradford con 5 µL de la muestra a ensayar en microplaca de 96 pocillos, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente bajo oscuridad y se procedió a determinar la absorbancia a 595 nm (Espectrofotómetro TECAN NanoQuant Infinite M200 PRO).

La concentración de proteínas totales se obtuvo de la curva de calibración (BSA entre 0,2 y 2 mg/mL), utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{Proteína}] = \left[\frac{A-Y}{m} \right] * D, \text{ donde}$$

A: Absorbancia de muestra a 595 nm
m: Pendiente de la curva.

Y: Intercepto de la curva
D: Factor de dilución

5.5. SDS-PAGE.

Cuando se requirió, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE, de acuerdo a lo establecido por Schägger (2006). Para ello, se usó un Gel concentrador al 4% de acrilamida, un gel intermedio al 10% de acrilamida conteniendo urea 6 M y un gel separador al 14% de acrilamida conteniendo urea 6M y glicerol 10%. Las muestras se resolvieron en el gel con voltaje constante (80 V) por 3 h y media. El gel se fijó durante 12 h en una solución que contiene 50% de metanol, 10% de ácido acético, en agitación rotatoria (50 rpm), para posteriormente teñirse con Azul de Coomassie Coloidal G-250 (Blue Silver) durante doce horas (Candiano *et al.* 2004; Schägger, 2006). Luego se procedió a desteñir con ácido acético al 10% durante 2 h y las bandas se visualizaron bajo un transiluminador.

AFPs presentes en los extractos citosólicos solubles totales y aquellos semipurificados por Ice-Shell, se detectaron en base al peso molecular o enriquecimiento relativo.

5.6. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa.

Se utilizó la metodología acuerdo con lo establecido por Iwasaki *et al.* (2009) con modificaciones menores. Brevemente, 6 mL de agarosa 0,3% (p/v) suspendida en agua destilada se fundió y depositó en cubetas plásticas y se mantuvo a temperatura sin dejar solidificarse. Se adicionó 380 µL del extracto citosólico conteniendo las AFPs

y se continuó el enfriamiento a temperatura ambiente hasta solidificación de la agarosa. La agarosa suplementada con el extracto (concentración de proteínas totales final = 0,09 mg/mL) se congeló por 24 h a -20°C y los conos congelados se depositaron sobre una plataforma de vidrio, manteniéndose a temperatura ambiente por una hora (etapa de descongelamiento). Se registró la integridad del cono de agarosa visualmente y la formación de cristales en el cono por microscopía óptica al inicio (Tiempo = 0 h) y a la hora de incubación para su análisis, de acuerdo a las recomendaciones de Espinoza (Tesis para optar al grado de Bioingeniero, 2014). Los controles del ensayo fueron extractos citosólicos obtenidos de *E. coli* BL21 y de *E. coli* BL21-AFP fueron empleados como control negativo y positivo, respectivamente. Agua pura se utilizó como control negativo abiótico.

5.7. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares.

Cuando se requirió realizar ensayos de inhibición de la recrystalización en capilares, se empleó la metodología propuesta por Tomczak *et al.* (2003) y Wilson & Walker (2010) con modificaciones menores. Para esto, se utilizaron capilares de 75 mm de largo x 0,9 mm de diámetro (75 µL) libres de Heparina (Hirschman®), en los cuales se cargaron con 60 µL de extractos citosólicos conteniendo entre 4 o 2 mg/mL de proteínas totales solubles, concentración final, según la cepa a ensayar. Además, se incluyeron capilares conteniendo diluciones seriadas 1/10 del extracto inicial, incluyendo los controles (Buffer Tris-HCl y agua). El ensayo se realizó por duplicado, teniendo un set de 14 capilares dispuestos en un portaobjeto y sellados con plastilina comercial. Se congelaron instantáneamente a -50°C por 15 minutos con metanol 70% v/v en un vaso precipitado de doble pared –similar al descrito por Tomczak *et al.*, (2003)- confeccionado para el ensayo, seguido de incubación a -6°C por 16 h. Se capturaron fotografías durante el proceso de congelamiento (-50°C) y descongelamiento (-6°C) con un celular (Motorola®) con una resolución gráfica de 14 megapíxeles, acoplado a un lente de 60X especialmente diseñado para celulares, y

dos filtros que se emplearon para generar polarización cruzada. Este dispositivo facilitó la determinación de la morfología de los cristales de hielo. Para la incubación a -6°C se utilizó un frigo bar regulado a dicha temperatura (Mabe®).

5.8. Síntesis de nano partículas de oro (AuNP).

Se trabajó con nano partículas de oro disponibles en el laboratorio, las cuales fueron preparadas por Manuel Carrión (Tesis para optar el grado de Bioquímico, 2017). Estas nano partículas se prepararon según el método descrito por Park *et al.* (2012), exceptuando la adición de ácido mercaptosuccínico en la última etapa. Brevemente, 1 g de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se disolvió en 50 mL de agua nanopure en concentración final de 58.86 mM. Se agregó 106 mL de citrato de sodio (2.2 mM) y se llevó a ebullición por 10 minutos. Posteriormente, se agregó rápidamente con agitación magnética vigorosa, 1 mL de solución de HAuCl_4 (24.3 mM). La solución restante fue retirada del calor una vez adquirida una coloración rojo intenso.

5.9. Determinación de la actividad anticongelante utilizando nano partículas de oro (AuNP)

La actividad anticongelante de los extractos citosólicos y la AFP tipo III utilizada como control, se realizó por microensayo en microplaca de 96 pocillos. En forma resumida, a cada pocillo se agregó 100 μL de nano partículas (500 μM final) y 100 μL de extractos proteicos en concentraciones crecientes (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La mezcla se congeló a -20°C por 1 h y se descongeló a 37°C por 10 minutos, determinándose posteriormente la absorbancia a 520 nm y 650 nm. A 520 nm absorben las partículas desagregadas y a 650 nm, las partículas agregadas. El cálculo del rango de extinción se hizo, en consecuencia, por la relación E_{520}/E_{650} .

Se realizó un ensayo con extractos sin ser sometidos a congelamiento/descongelamiento y un ensayo con extractos sometidos a 5 ciclos de congelamiento/descongelamiento, con el propósito de determinar si el congelamiento/descongelamiento, inactiva a la actividad anticongelante de las AFPs. Se utilizó como control positivo, extracto citosólico soluble de la cepa *E. coli* BL21-AFP y como control negativo, extracto citosólico soluble de la cepa *E. coli* ATCC25922 y BSA.

5.10. Purificación de AFP a través de Ice-Shell

Se trabajó con la cepa UDEC-P9, pues demostró alta tolerancia al congelamiento/descongelamiento e inhibición de la recristalización en capilares. Se utilizó el protocolo establecido por Marshall *et al.* (2016). Para ello, se agregó 50 mL de agua estéril en un matraz de fondo redondo de 250 mL y se sumergió con movimientos giratorios en un baño que contenía Metanol a una temperatura de aproximadamente -71°C (1-2 minutos). Una vez formada la capa de hielo al interior del matraz, se removió el líquido restante, se midió para conocer el volumen y la diferencia correspondió al líquido congelado (10 – 12,5 mL aproximadamente por ensayo). El matraz con el hielo formado, se sumergió nuevamente en la solución enfriante para formar grietas en el hielo (ver Figura 1) y se depositó en baño de hielo con Cloruro de Sodio (NaCl) para mantener la temperatura a $-1,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se agregó 50 mL del extracto conteniendo AFP enfriado previamente a 0°C , lentamente (1-2 minutos) y el matraz se fijó a un rotavapor continuándose la incubación a $-1,5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos adicionales, con rotación de 30 rpm, hasta que se obtuvo un 50% de la muestra congelada.

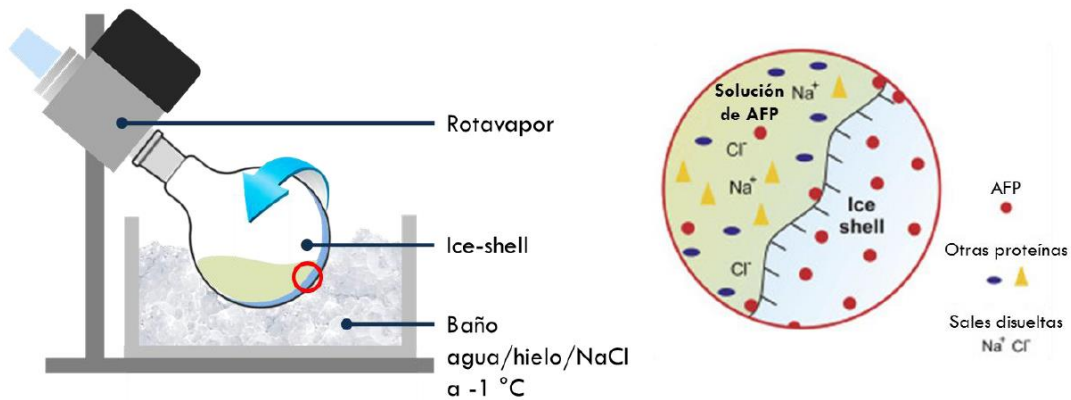


Figura 1. Esquema del proceso de purificación por método de Ice-Shell, extraído de Tesis de Carrión, (2017)

Finalmente, se removió el líquido remanente y se agregó 10 mL de Buffer Tris pre-enfriado, agitando rápidamente el matraz para eliminar proteínas unidas de manera inespecífica al hielo (Fracción líquida). El hielo (Fracción congelada) se incubó a temperatura ambiente hasta su fusión, se extrajo una alícuota de 100 μ L para análisis por SDS-PAGE y se congeló a -20°C para posteriores ensayos.

A la muestra parcialmente purificada, se le determinó su capacidad crioprotectora en nano partículas de oro.

5.11. Búsqueda de AFPs en cepa UDEC-P9 secretadas al medio de cultivo.

Se centrifugó 1 L de medio Trypticase a 9.000g por 10 minutos a 4°C para eliminar las células bacterianas. Se usó 10 mL de medio libre de células y se agregó 1 mL de TCA 100%. La mezcla se incubó por 10 minutos a 4°C y los componentes proteicos se precipitaron a 12.000g por 30 minutos a 4°C, conservando el pellet. La muestra centrifugada se analizó por SDS-PAGE.

5.12. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 concentrada por filtración.

La AFP UDEC-P9 parcialmente purificada, fue filtrada por un centrífugo de 50 kDa para concentrar y eliminar residuos proteicos menores a 50 kDa. Para ello, se agregó 700 μ L de muestra y se centrifugó a 2500g a 4°C hasta que se logró concentrar a 100 μ L. Con la muestra retenida en el filtro, se realizó un SDS-PAGE y un ensayo de inhibición de la agregación sobre nano partículas de oro.

5.13. Efecto de la temperatura sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada

La AFP UDEC-P9 purificada por filtración, se calentó a 100°C por 15 minutos para luego realizar un ensayo de inhibición de la agregación sobre nano partículas de oro.

5.14. Efecto de proteinasa K sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada.

La AFP UDEC-P9 purificada por filtración, se sometió a la acción proteolítica con 100 μ g/mL de proteinasa K. La mezcla se incubó por 50°C por una hora para luego proceder a determinar la actividad anticongelante con un ensayo con nano partículas de oro.

5.15. Análisis estadísticos.

Cuando se indica, se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando el software Infostat 2018, versión estudiantil.

6. RESULTADOS

Inicialmente, se trabajó con la proteína recombinante AFP tipo III de 8 kDa, aislada desde sangre de pez, lo que permitió estandarizar las condiciones de visualización y purificación por Ice-Shell. Esta proteína, como se indica en materiales y métodos, estaba clonada en el plásmido pET-20b y la expresión se indujo con la adición de 0,6 mM de IPTG, final. Esta proteína se utilizó como control positivo en todos los ensayos posteriores.

6.1. Expresión de la proteína anticongelante tipo III de 8 kDa en la cepa de *E. coli* BL21.

La proteína AFP tipo III de pez, se visualizó mediante SDS-PAGE seguido de tinción coloidal con Azul de Coomassie G-250 (Figura 1, carril 2 - flecha). Puede observarse que la proteína, ausente en la muestra sin vector (control negativo), presenta una movilidad relativa equivalente a una proteína de peso molecular aproximado de 8000. Esta proteína se purificó utilizando el método de Ice-Shell, a partir de extractos citosólicos solubles obtenidos de pellet celular de 2 L de cultivo de la cepa *E. coli* BL21-AFP. En la Figura 3, se muestra un gel SDS-PAGE en que se observa el enriquecimiento del extracto purificado en una proteína de aproximadamente 8 kDa (Figura 2, Carril 3 – flecha). Adicionalmente, en la misma muestra se observa una segunda banda, más tenue, con peso molecular aproximado de 15000.

La purificación de extractos citosólicos solubles totales de la cepa *E. coli* BL21-AFP a través de Ice-Shell, arrojó un enriquecimiento de la proteína de 8 kDa observada en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE, la cual es responsable de la actividad anticongelante (Figura 3). Fue posible observar también la aparición de una banda de 15 kDa, la cual correspondería a un dímero de la proteína anticongelante tipo III.

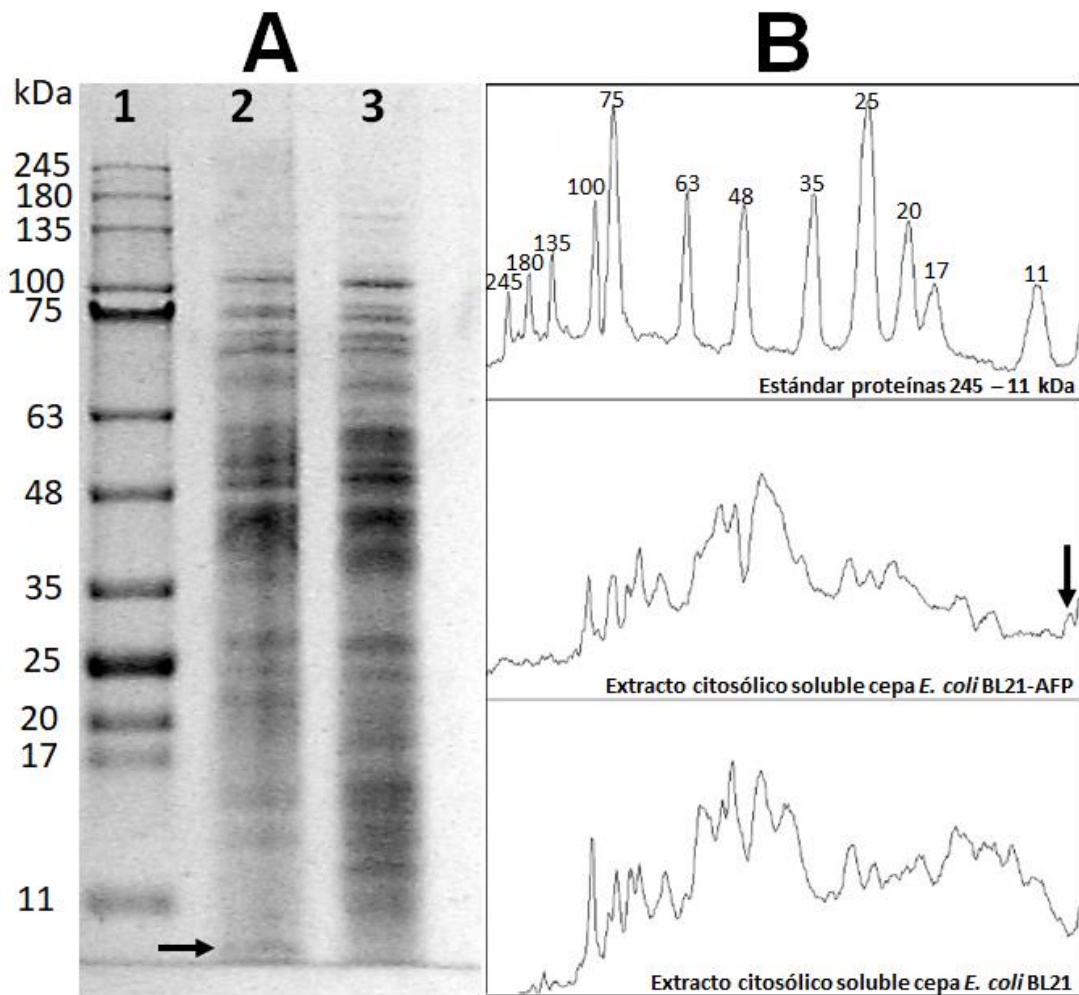


Figura 2. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 2A) y su respectiva gráfica de migración vs intensidad (Figura 2B) mostrando la AFP tipo III de pez (8 kDa). La cepa de *E. coli* BL21-AFP se indujo con 0,6 mM IPTG. Carril 1: Marcador peso molecular 245 – 11 kDa. Carril 2: Extracto citosólico total de cepa de *E. coli* BL21 con expresión de AFP tipo III (flecha), la cual fue inducida con IPTG (0,6 mM). Carril 3: Extracto citosólico total de cepa de *E. coli* BL21 sin vector (Control negativo). Fuente:

Elaboración propia

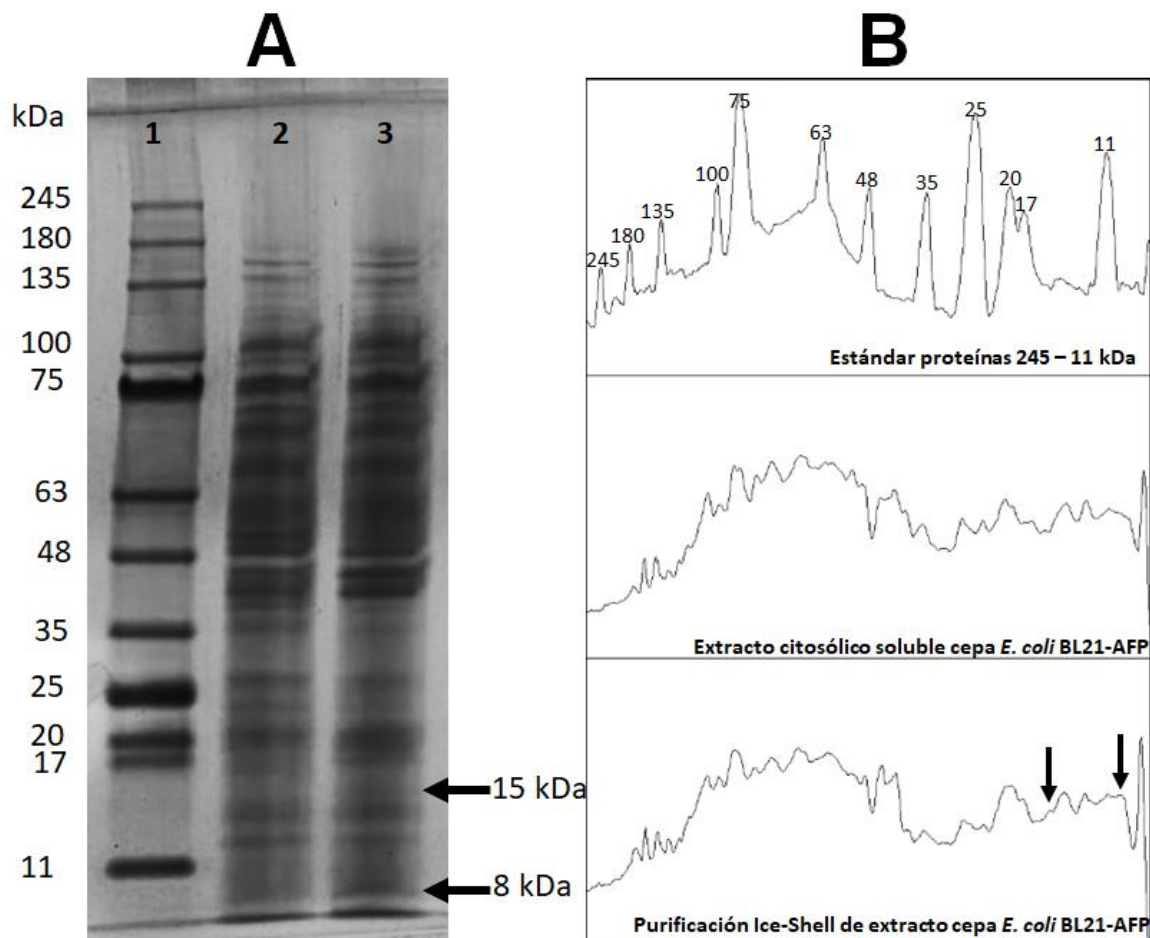


Figura 3. Detección por SDS-PAGE de AFP tipo III purificada mediante Ice-Shell (Figura 3A) y su respectiva gráfica de migración vs intensidad (Figura 3B). La AFP tipo III se purificó a partir de extracto citosólico de células obtenidas de 2 L de cultivo de la cepa *E. coli* BL21-AFP (ver Materiales y Métodos). La proteína (flecha) se visualizó en el gel mediante tinción coloidal Coomassie G-250. Carril 1: Estándar de proteínas 245 – 11 kDa, Carril 2: Extracto citosólico total, Carril 3: Extracto citosólico purificado por Ice-Shell. Las flechas indican la posición relativa de la proteína de interés en forma monomérica y dimérica. Fuente: Elaboración propia

A continuación, se trabajó con las cepas de interés aisladas desde la Patagonia (5 cepas) y antártica chilena (2 cepas). Estas cepas se seleccionaron en base a su

capacidad de resistir 20 ciclos de congelamiento (Datos determinados por Claudio Rojas, Tesis para optar al grado de Bioquímico, 2012).

6.2. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa.

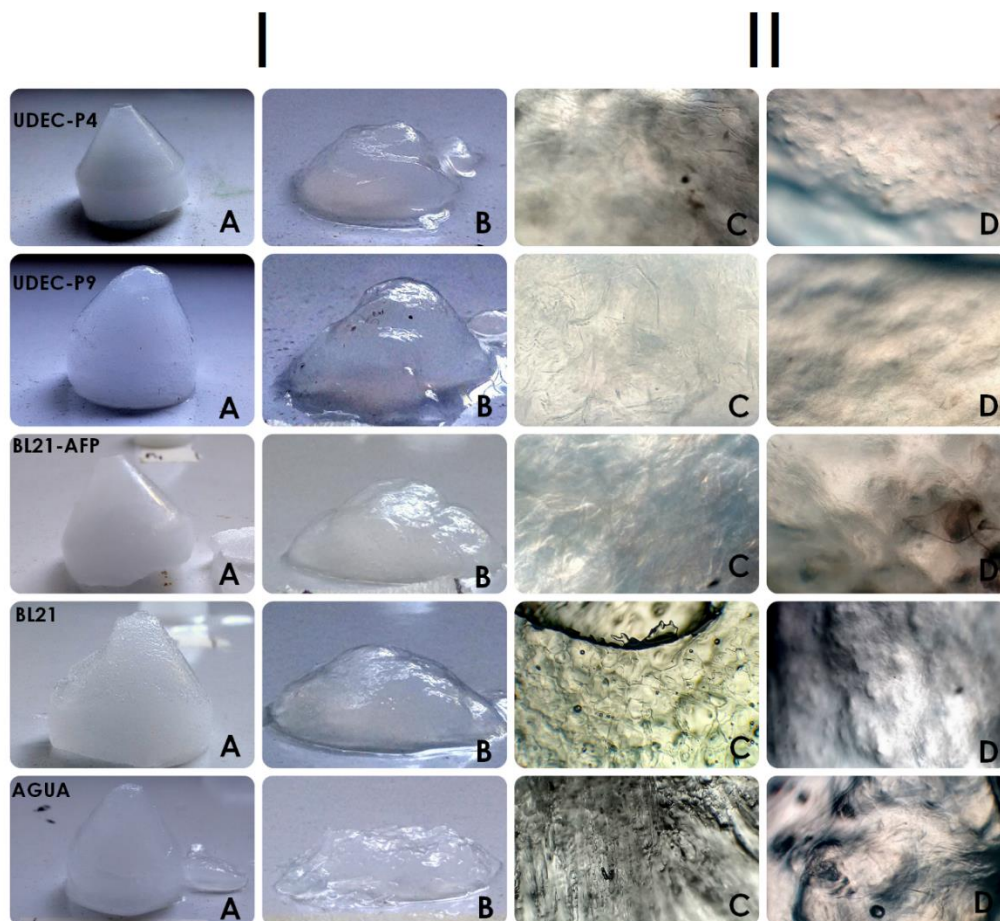
Los ensayos de crioprotección en matriz de agarosa de extractos citosólicos sin purificar obtenidos de 7 cepas (UDEC-P4, UDEC-P9, RIO-6P, UDEC-A5, UDEC-A8, UDEC-P7 y UDEC-P11), mostraron que con excepción de las cepas UDEC-A5 y UDEC-P11, ejercen crioprotección de la matriz de agarosa a un ciclo de congelamiento/descongelamiento de 24 h a -20°C y 1 h a temperatura ambiente (Figura 4, columna B), pues los cubos de agarosa mantienen su forma aunque no su tamaño. En este ensayo, los extractos de las cepas UDEC-P9 y RIO-6P y UDEC-A8 mostraron mayor efecto crioprotector de la matriz de agarosa, en comparación a lo observado con los controles y los otros extractos. Por otro lado, la cepa UDEC-P4 mostró menor grado de crioprotección de la matriz.

La observación por microscopía óptica (4x) de los cubos de agarosa congelados (Figura 4, columna C), reveló la presencia de cristales de hielo de mayor tamaño y heterogéneos en la estructura sólo en los extractos de las cepas UDEC-A5 y UDEC-P11. De igual forma, pudo apreciarse el mismo fenómeno en el control abiótico (agua) y con extracto de la cepa *E. coli* BL21 (control negativo). El resto de los extractos citosólicos de las cepas analizadas (UDEC-P4, UDEC-P9, RIO-6P, UDEC-A8 y UDEC-P7), mostraron la formación de hielo vítreo y homogéneo al igual que el control positivo.

El análisis por microscopía óptica de los cubos de agarosa posterior al descongelamiento (Figura 4, columna D), no mostró deformaciones de la estructura de la matriz de agarosa, con excepción de los cubos conteniendo extractos de las cepas

UDEC-P11 y UDEC-A5. Estos últimos mostraron alteración de la matriz estructural de la agarosa.

Por otro lado, La presencia de burbujas en la estructura indicó indirectamente el tamaño de los cristales de hielo formado luego de su descongelamiento. Nuevamente los cubos con extractos citosólicos de las cepas UDEC-A5 y UDEC-P11 mostraron presencia de burbujas de mayor tamaño que los cubos conteniendo extractos de las otras cepas. Estos últimos presentaron gran cantidad de burbujas pequeñas, indicando que el tamaño de los cristales durante el congelamiento fue de menor tamaño. El control positivo, por su parte, mostró estabilidad en su estructura luego del descongelamiento, observándose una superficie libre de hendiduras y burbujas pequeñas. Ambos controles negativos evidenciaron deformidad de la estructura en diferente grado y presencia de burbujas de gran tamaño.



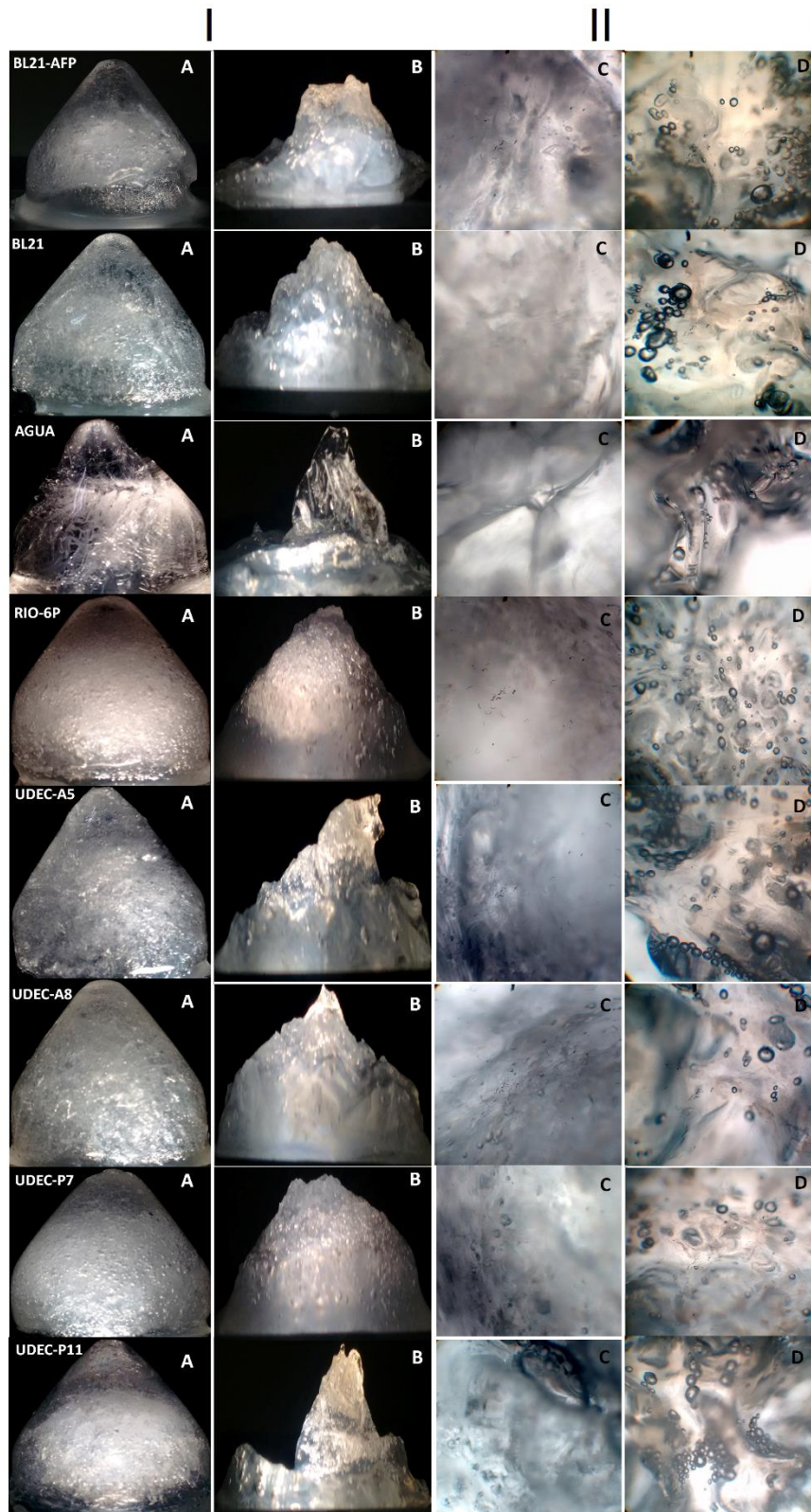


Figura 4. Ensayo de crioprotección en matriz de agarosa (0,3% p/v). La matriz conteniendo 0,095 mg/mL de extractos citosólico soluble total, se sometió a un ciclo de congelamiento (-20°C por 24 h)/descongelamiento (1 h a T° ambiente) (ver Materiales y Métodos). I: Fotografía macroscópica de los cubos - Columna I-A: Matrices congeladas; Columna I-B: Matrices descongeladas - II: Fotografía microscópica de los cubos (40X). Columna II-C: Matrices congeladas. Columna II-D: Matrices descongeladas. Fuente: Elaboración propia

6.3. Ensayo de nano partículas de oro con presencia de extractos citosólicos.

El ensayo de nano partículas de oro permitió establecer que los extractos citosólicos de las cepas UDEC-P9 y UDEC-P4 mostraban capacidad anticongelante, posiblemente mediada por AFP (Figura 5). Sin embargo, el comportamiento de los extractos citosólicos de ambas cepas fue diferente, pues a las concentraciones ensayadas se observó que entre 0,1 y 0,6 µg/mL de proteínas totales en el ensayo, la cepa UDEC-P4 inhibía la agregación de las nano partículas de oro, en tanto, el extracto de la cepa UDEC-P9 no fue capaz de impedir la agregación de las nano partículas de oro por efecto del congelamiento (Figura 5). Por otra parte, cuando el ensayo se realizó a concentración 1,32 µg/mL, sorprendentemente la cepa UDEC-P9 demostró la máxima actividad inhibitoria de agregación. Así mismo, el análisis realizado con el extracto de la cepa *E. coli* BL21-AFP a concentración entre 0,1 y 0,6 µg/mL de extracto, produjo la mayor inhibición de la agregación (excepto a 0,2 µg/mL), indicativo de la presencia de AFP. Así mismo, cuando el ensayo se realizó a una concentración de 1,32 µg/mL, se observó un resultado paradójico, pues, la inhibición de la agregación disminuyó a niveles similares del control con la proteína BSA (control negativo). El extracto de la cepa UDEC-P9, por el contrario, a esta misma concentración demostró actividad inhibitoria de la agregación en niveles similares a lo observado por el extracto de la cepa *E. coli* BL21-AFP a una concentración de 0,6 µg/mL (2,1 versus 2,4 de

rango de extinción E_{520}/E_{620} , respectivamente), sugiriendo la presencia de AFP en el extracto.

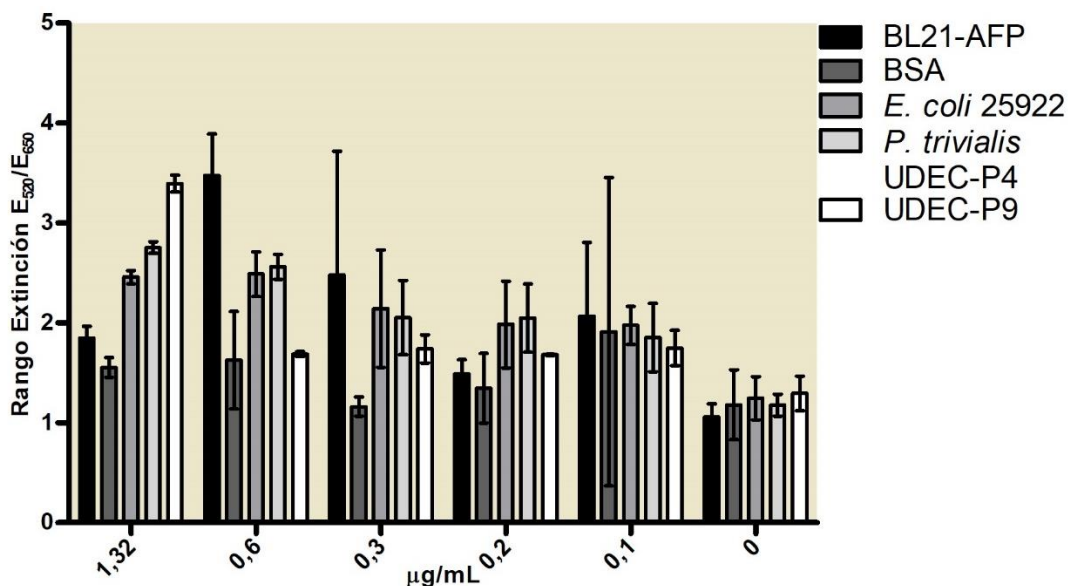


Figura 5. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro. Los ECS se mezclaron en concentraciones crecientes (entre 0,1 y 1,32 $\mu\text{g/mL}$) con una suspensión de nano partículas de oro y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia

6.4. Estabilidad de extractos citosólicos al congelamiento.

Los extractos citosólicos sometidos a 5 ciclos de congelamiento/descongelamiento (Figura 6) mantuvieron el comportamiento demostrado en los ensayos sin el tratamiento C/D, excepto el extracto de la cepa UDEC-P9. Este extracto, a diferencia de lo observado, siempre produjo mayor inhibición de la agregación que el resto de las muestras en todas las concentraciones ensayadas, menos a concentración 0,6 $\mu\text{g/mL}$ en que se observó consistentemente menor actividad crioprotectora. Estos resultados en su conjunto, demuestran que el C/D no parece afectar la actividad de las proteínas anticongelantes de la cepa UDEC-P9.

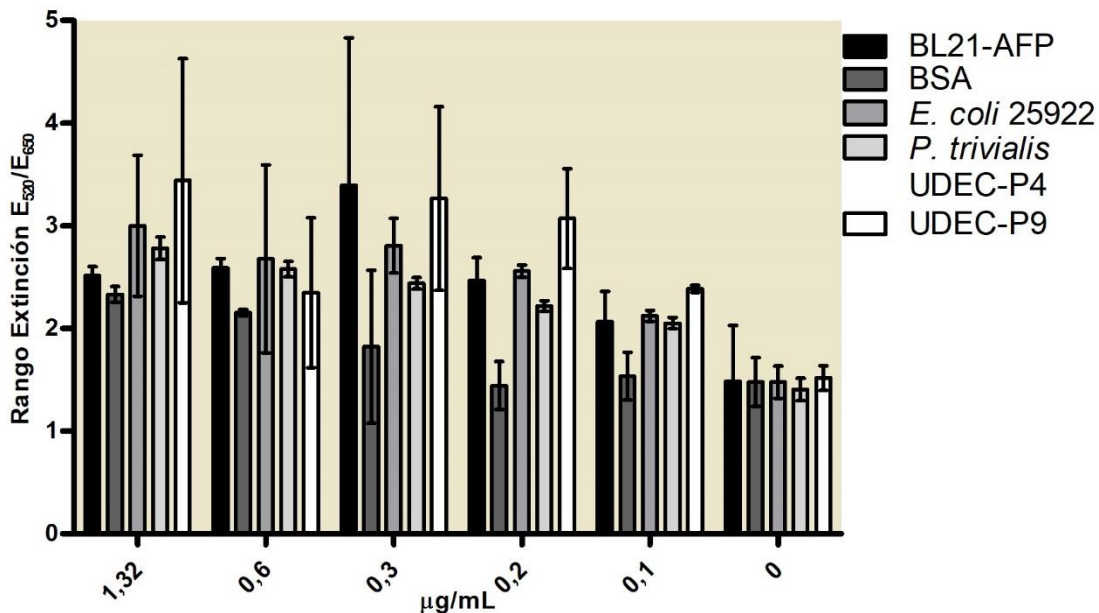


Figura 6. Efecto del C/D en la inhibición de la agregación de nano partículas de oro. Se procedió en forma similar a lo descrito en la leyenda de la figura 6, excepto que previamente los ECS se sometieron a 5 ciclos de congelamiento (-20°C por 1 h) y descongelamiento (37°C por 10 minutos). Fuente: Elaboración propia

6.5. Equipamiento y Estandarización de la técnica para visualización de cristales de hielo en capilares.

El dispositivo empleado para la visualización de los cristales de hielo en los experimentos de C/D, fue construido siguiendo el modelo propuesto por Tomczak *et al.* (2003). El receptáculo se construyó manteniendo la estructura de los compartimentos tipo vaso precipitado de doble pared, conservando las dos aberturas y el compartimento interno (Figura 7). Las aberturas, permitieron incorporar 2,4,4-trimetilpentano en la capa interna para mantener controlada la temperatura bajo 0°C

por más tiempo. Este dispositivo, tuvo capacidad para alojar hasta 2 sets de preparaciones y la facilidad de acceso a la muestra con los dispositivos de registro óptico.



Figura 7. Dispositivo tipo vaso precipitado de doble pared confeccionado para el C/D de capilares conteniendo extractos citosólicos. Fuente: Elaboración propia

Luego del congelamiento y/o descongelamiento, el dispositivo conteniendo los capilares se ubicó sobre una fuente de luz (Figura 8) y los capilares fueron visualizados y fotografiados con una cámara de celular con una resolución gráfica de 14 megapíxeles. La cámara del celular se ancló a un lente auxiliar con aumento 60X (Figura 9A), para proceder a tomar la fotografía. Este dispositivo permitió eliminar el uso de microscopios acoplados a cámaras, con sus respectivos adaptadores; a su vez, permitió observar los capilares uno por uno.

La polarización cruzada permitió mayor definición del tamaño y forma de los cristales de hielo. Esto se obtuvo utilizando un par de filtros polarizadores (Figura 9B) dispuestos en forma perpendicular uno respecto del otro (Figura 9C), pero ubicando el primer filtro entre el lente de la cámara y el lente auxiliar de 60X (Figura 9D); en tanto,

el segundo filtro se dispuso de manera perpendicular al primer filtro y por debajo del set de capilares (Figura 9E). La Figura 10 (extraída de Google) resume el esquema completo de observación de la muestra, para visualizar los cristales de hielo.



Figura 8. Fuente de luz usada para la visualización de cristales de hielo. Fuente: Elaboración propia

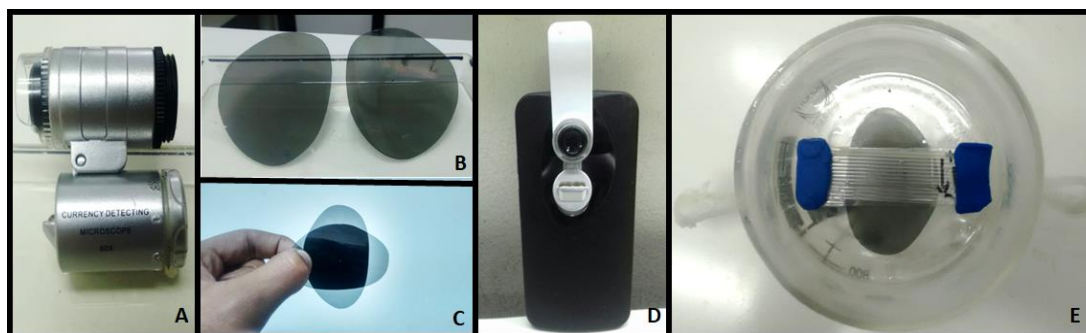


Figura 9. Instrumentos utilizados para la observación y registro fotográfico de cristales de hielo. A: Lente 60X para celular. B: Par de filtros usados para generar polarización cruzada. C: Filtros dispuestos perpendicularmente observándose el efecto de polarización cruzada. D: Celular acoplado con uno de los filtros y el lente

60X. E: Dispositivo tipo vaso precipitado con filtro y set de capilares. Fuente:
Elaboración propia

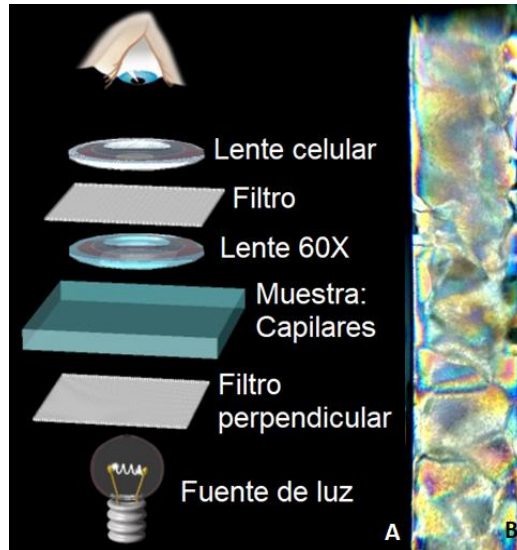


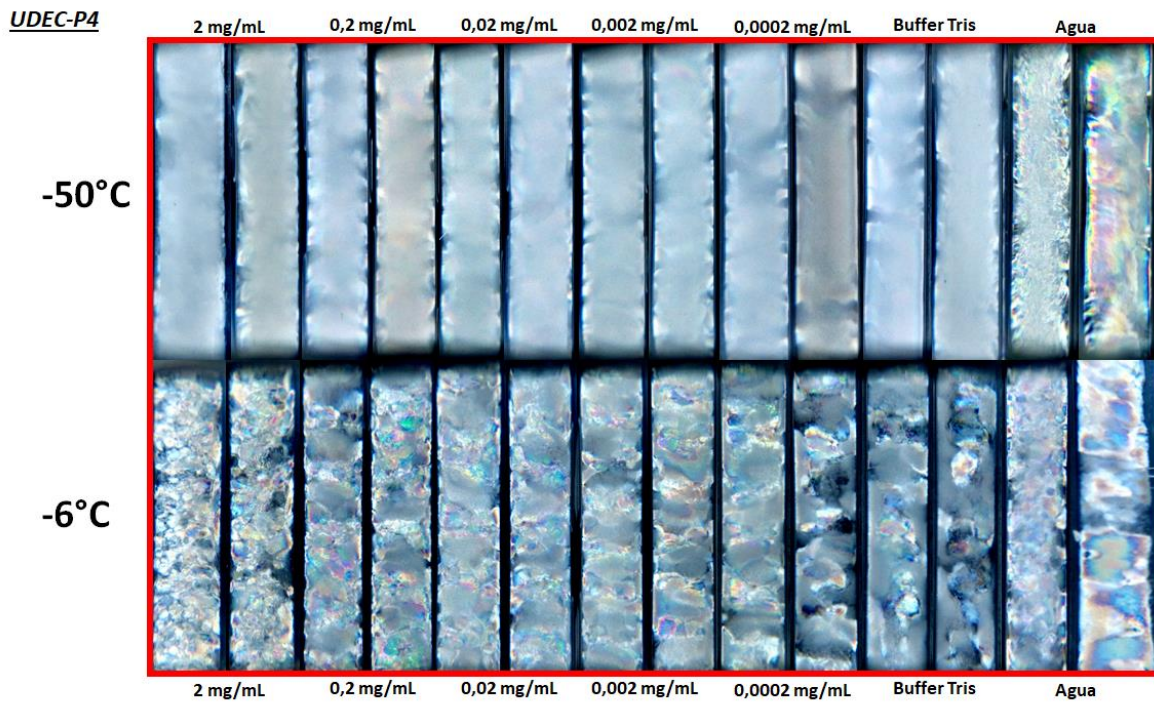
Figura 10. Visualización de cristales de hielo en capilares. A: Esquema que detalla el proceso de observación de cristales de hielo. B: Resultado de la visualización de cristales de hielo en un capilar. Fuente: Extraído y modificado de Google.

A continuación, se trabajó con los extractos citosólicos de las 7 cepas para determinar su efecto inhibitorio de recristalización.

6.6. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares.

Sólo los extractos sin purificar de las cepas UDEC-P9, UDEC-A8 y UDEC-P7, fueron capaces de inhibir la recristalización. Los otros cuatro extractos (cepas UDEC-P4, RIO-6P UDEC-A5, UDEC-P11) slo mostraron baja o nula actividad inhibitoria de recristalización (Figuras 11 a 14). Los extractos totales de las cepas UDEC-P9 y UDEC-A8 (Figura 15 y 16, respectivamente), inhibieron el proceso de recristalización a una concentración igual o superior a 2 mg/mL. En estas muestras, la morfología de

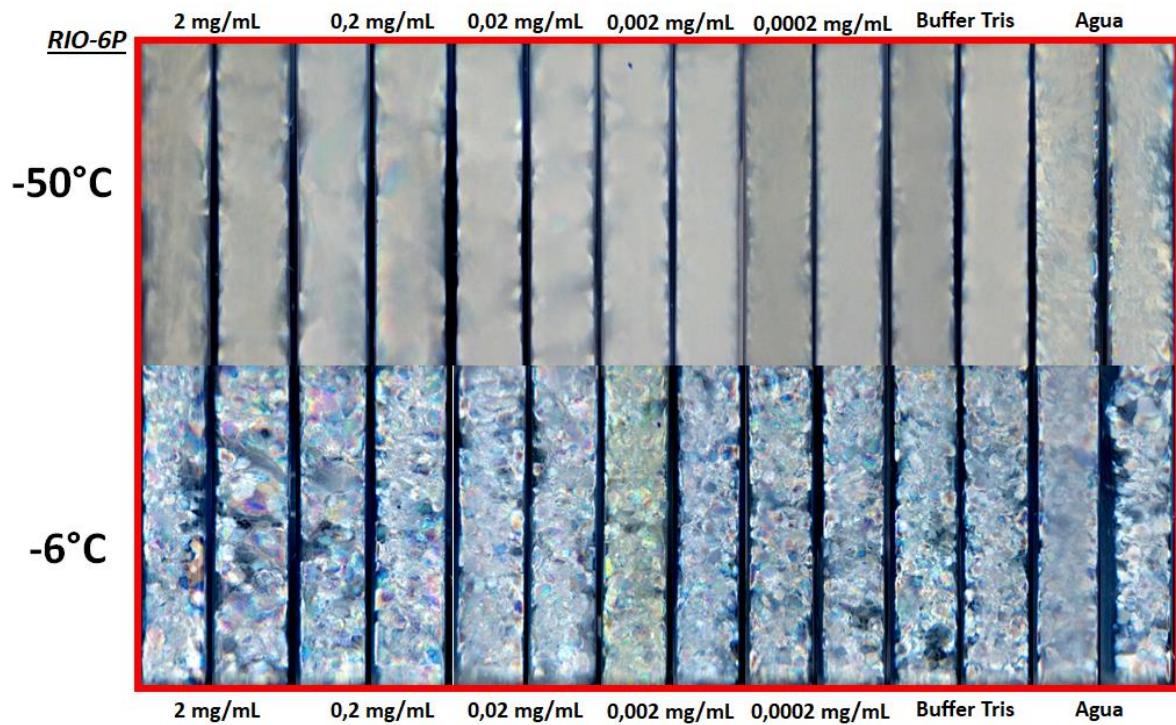
los cristales de hielo fue homogéneo luego del proceso de descongelamiento (-6°C por 16 h), similar a la morfología observada al momento del congelamiento rápido a -50°C.



IR-

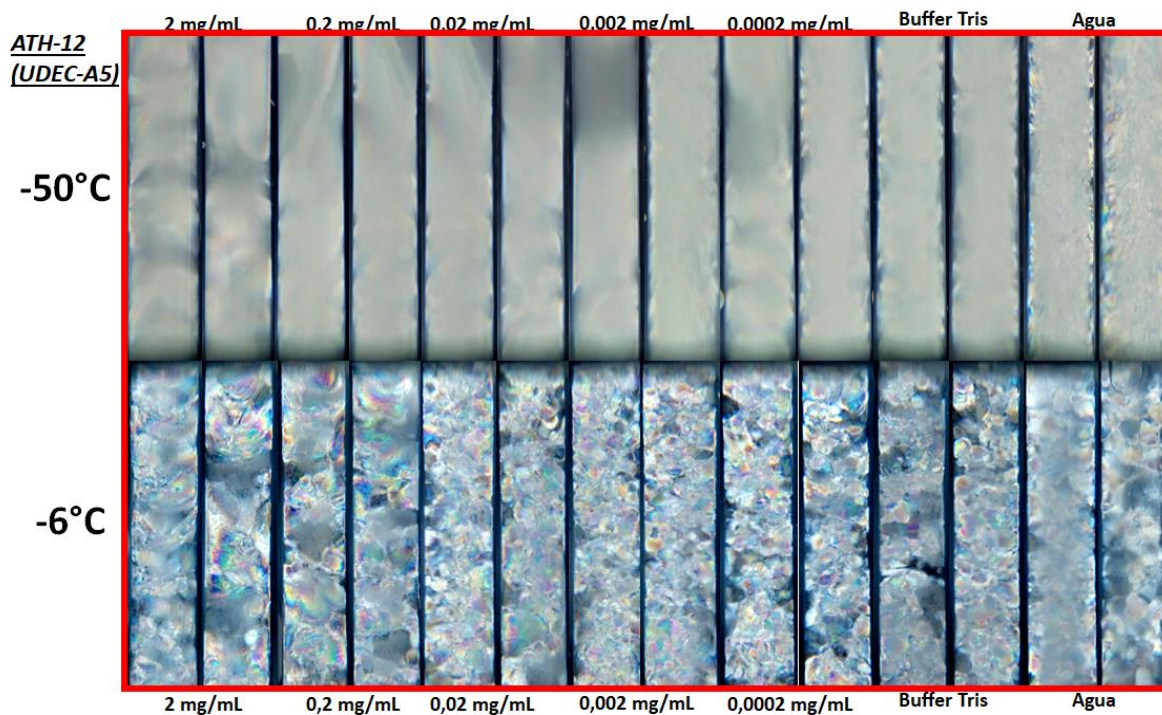
Figura 11. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa *Pseudomonas trivialis* UDEC-P4 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente:

Elaboración propia



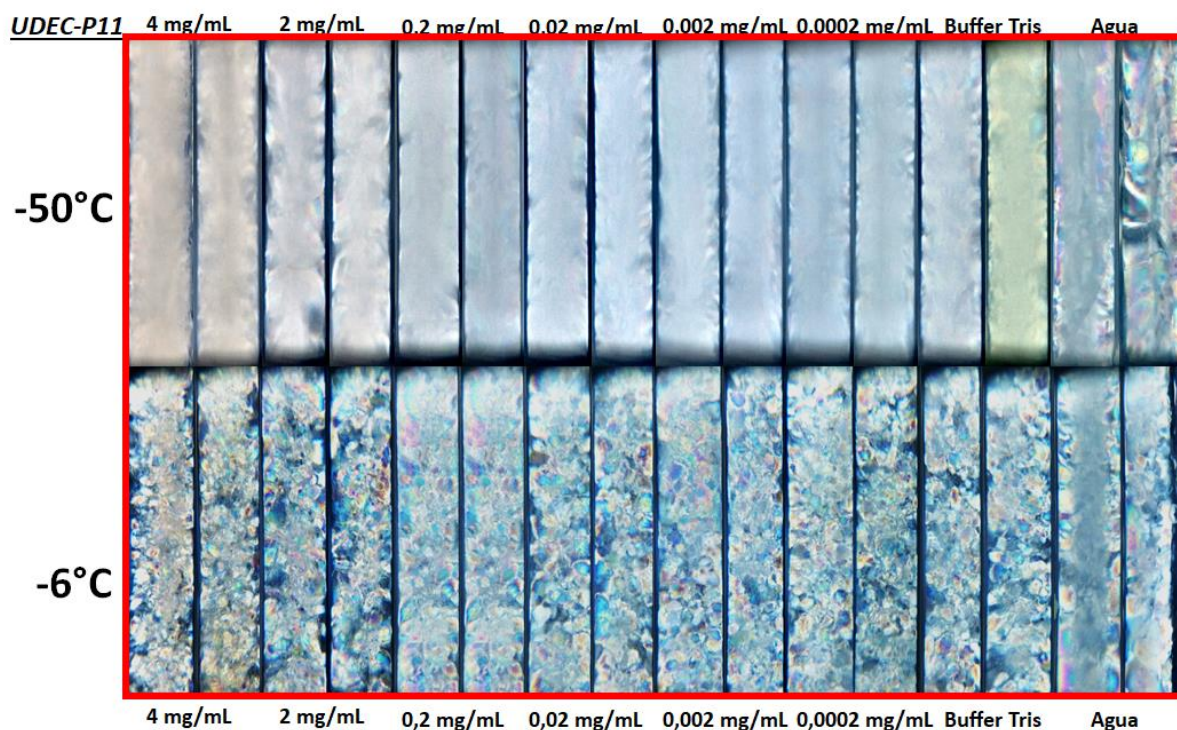
IR-

Figura 12. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa RIO-6P a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia



IR-

Figura 13. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-A5 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia



IR-

Figura 14. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P11 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

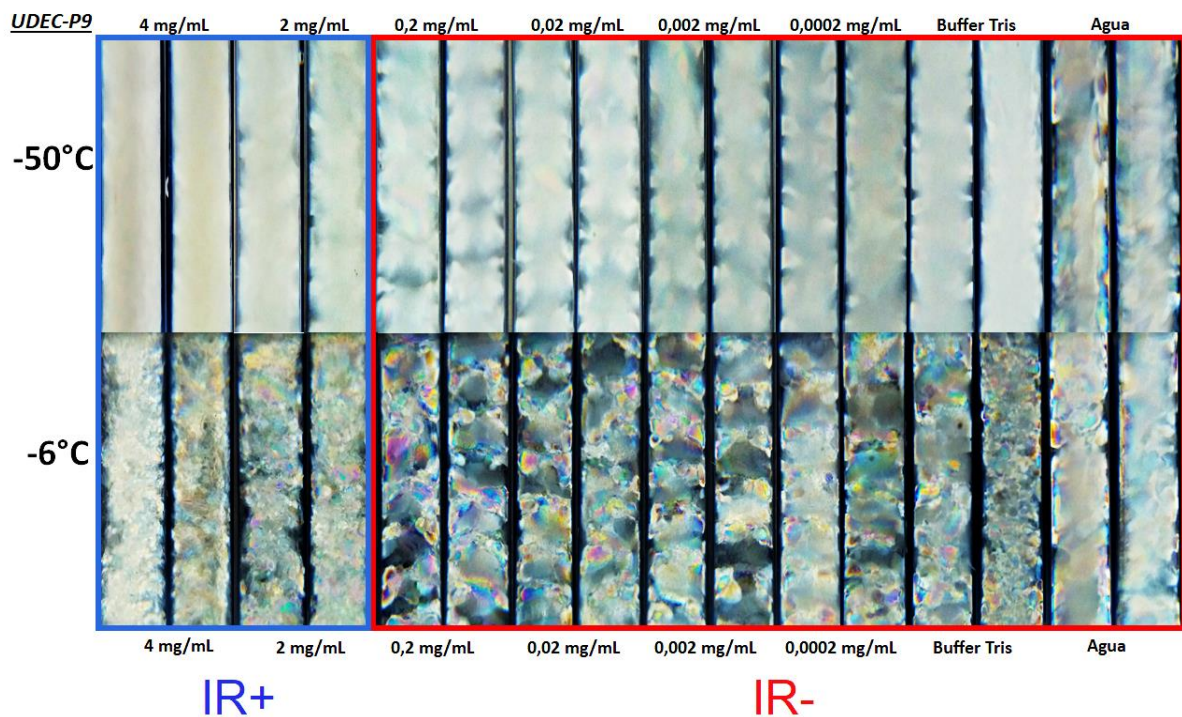


Figura 15. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P9 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

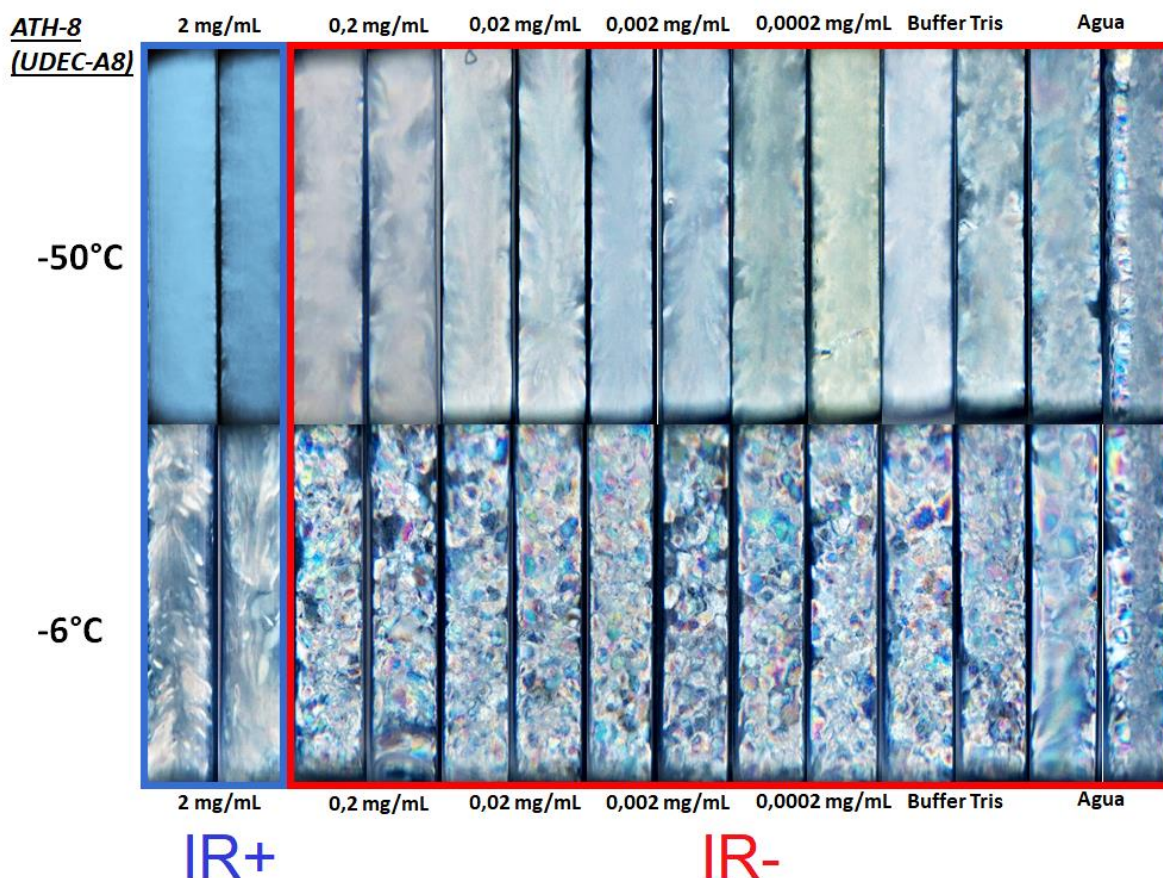


Figura 16. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-A8 a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

A concentraciones menores a 2 mg/mL de proteínas totales, ambos extractos perdieron la capacidad inhibitoria del proceso de recrystalización, observándose presencia de cristales de hielo heterogéneos y una morfología de cristales diferente a la inicial. Por otro lado, el extracto citosólico de la cepa UDEC-P7 no mostró inhibición de la recrystalización, excepto a concentraciones de 4 mg/mL (Figura 17).

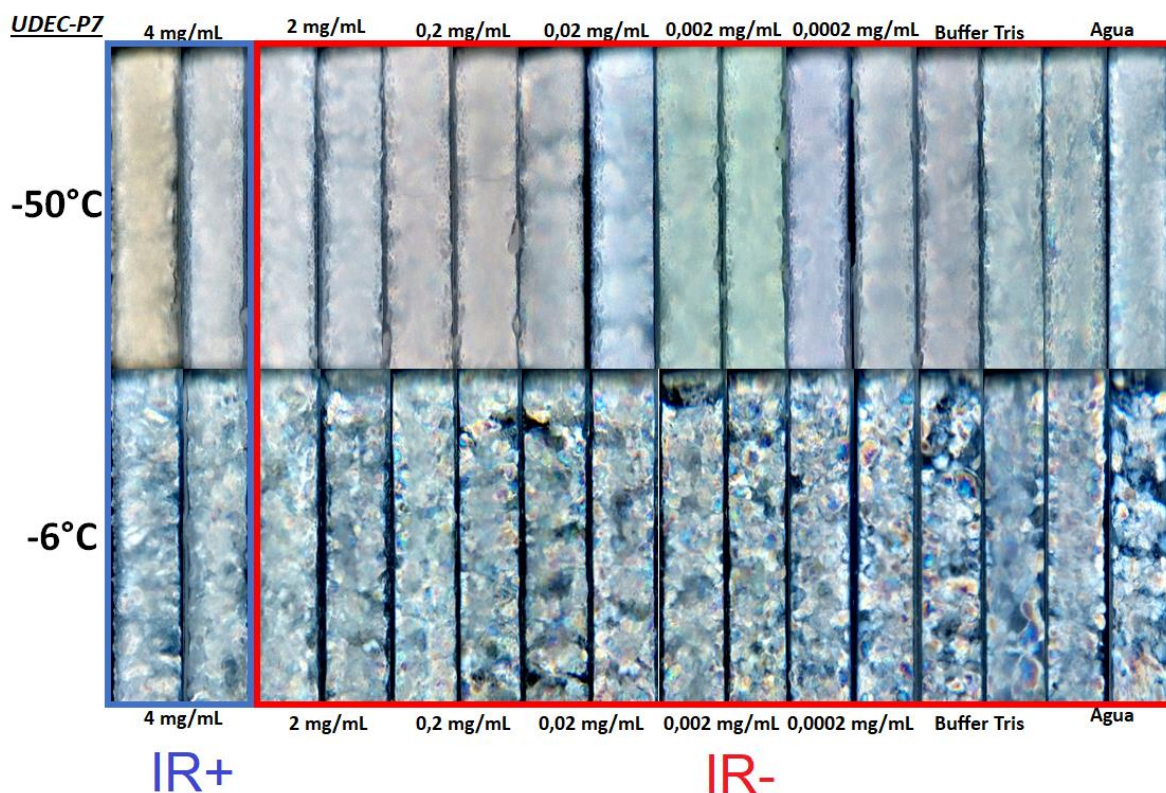


Figura 17. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa UDEC-P7 a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

En cuanto al extracto citosólico de la cepa de *E. coli* BL21-AFP (control positivo), este fue capaz de inhibir la recrystalización a una concentración mayor o igual a 0,02 mg/mL. A concentraciones menores a ésta, no se observó este efecto crioprotector (Figura 18).

El control negativo de BSA, a su vez, no presentó inhibición de la recrystalización, excepto a una concentración de 2 mg/mL, donde la proteína sí tiene efecto inhibitorio (Figura 19). Finalmente, el extracto citosólico de la cepa *E. coli* BL21 silvestre (también

control negativo), no mostró inhibición de la recristalización a ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 20).

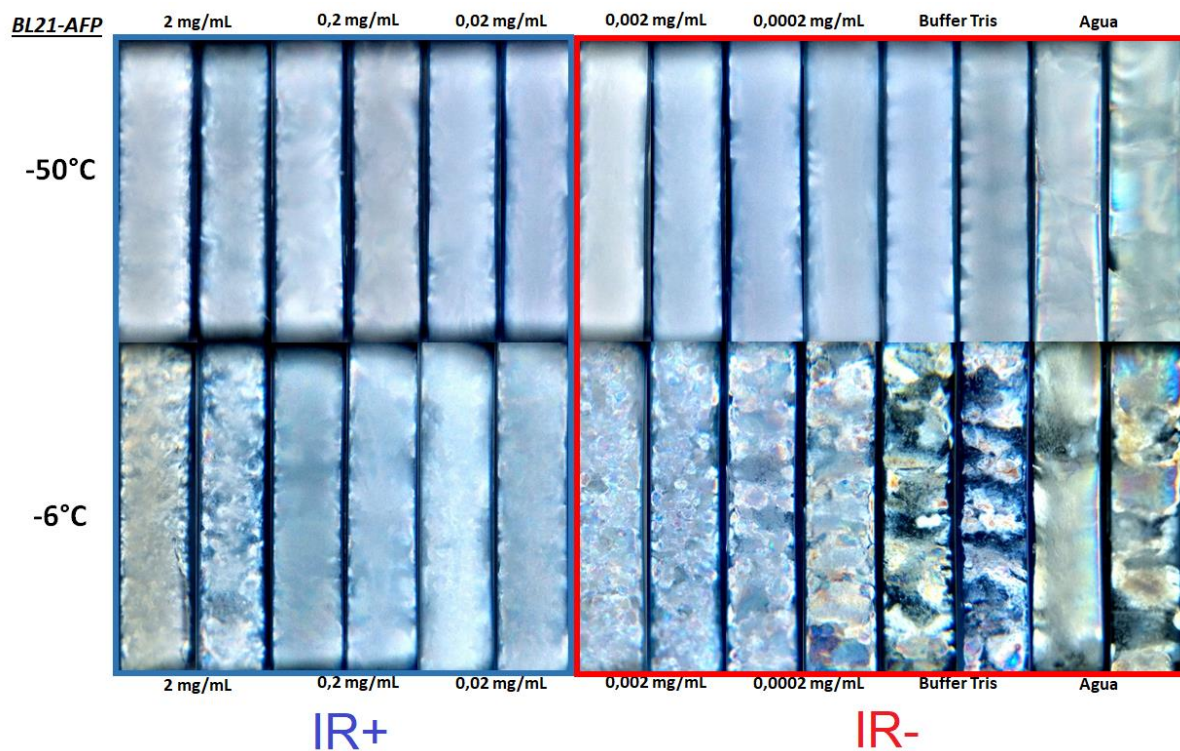
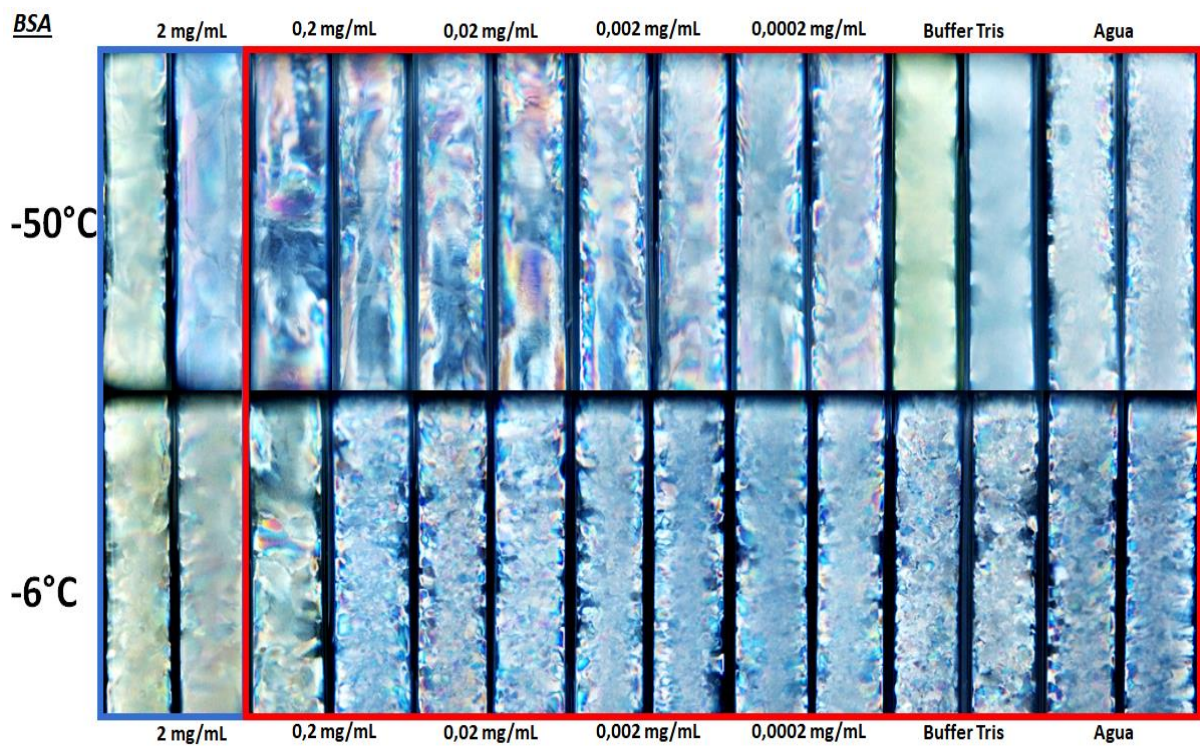


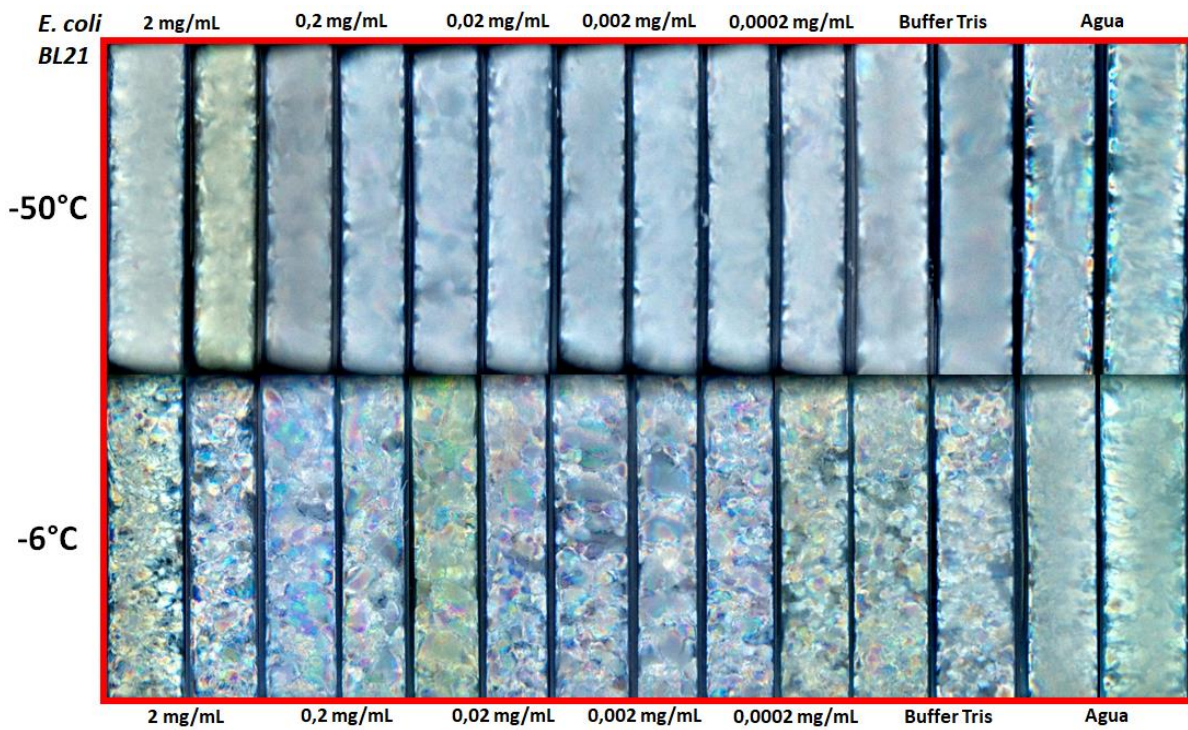
Figura 18. Ensayo de inhibición de la recristalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa de *E. coli* BL21 que presenta una AFP tipo III (control positivo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia



IR+

IR-

Figura 19. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con la proteína de suero de albumina bovina (BSA) (control negativo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia



IR-

Figura 20. Ensayo de inhibición de la recrystalización en capilares con extracto citosólico total de la cepa de *E. coli* BL21 que no presenta una AFP tipo III (control negativo) a concentraciones decrecientes (2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

Los resultados que se presentan a continuación fueron todos desarrollados con extracto citosólico soluble obtenido de la cepa UDEC-P9, por presentar la mayor actividad IR en los ensayos realizados.

6.7. Estabilidad de los componentes proteicos con actividad IR.

La estabilidad de la actividad de inhibición de la recristalización en capilares se ensayó con el extracto sin purificar de la cepa más activa (cepa UDEC-P9), con el propósito de determinar la estabilidad de los componentes proteicos responsables de la actividad IR en el tiempo. Las figuras 20 y 21, muestran que la actividad IR se mantuvo hasta por 168 h, indicando que dicha actividad no es sensible al frío.

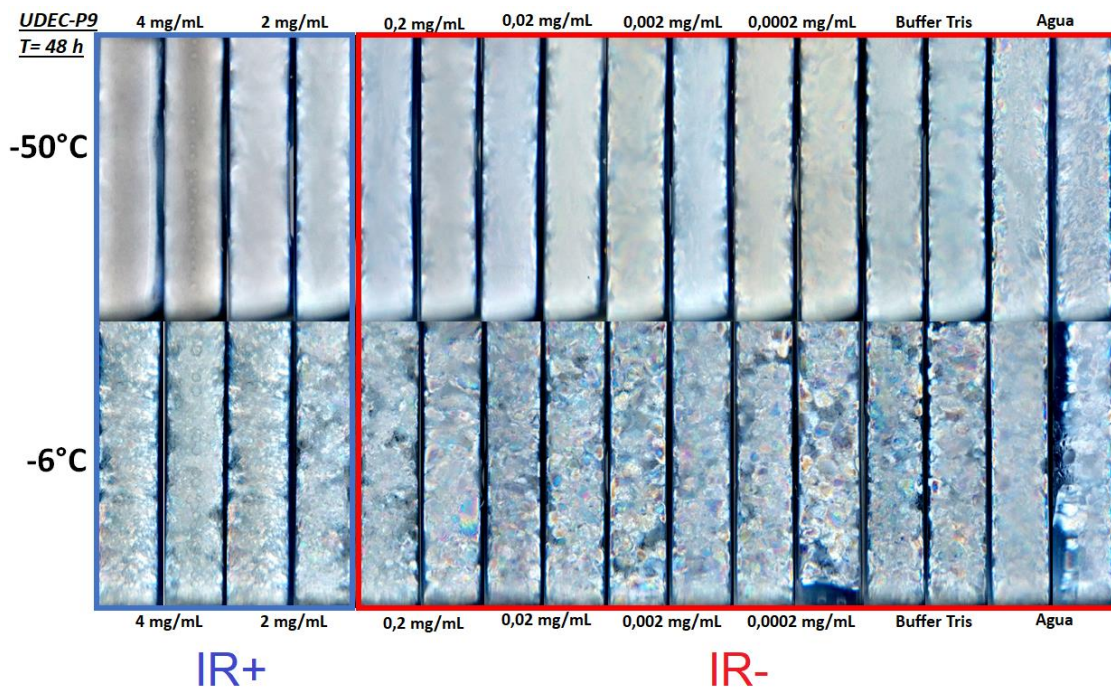


Figura 21. Estabilidad de los componentes proteicos de la cepa UDEC-P9 en capilares, luego de 48 h a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

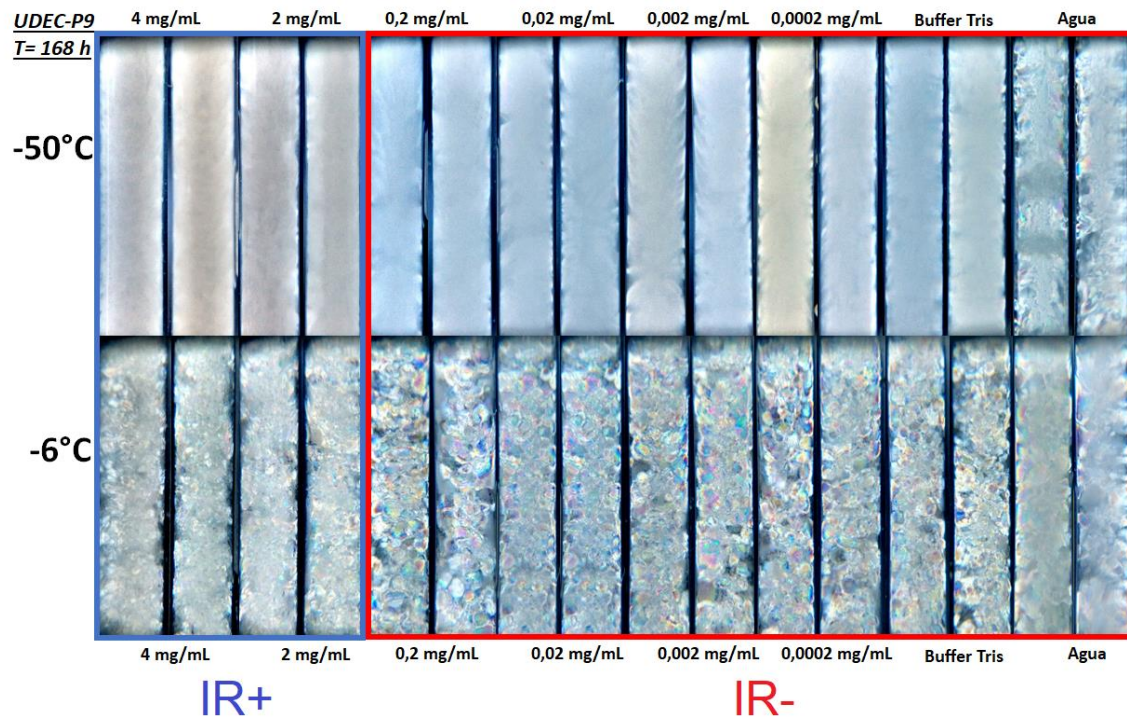


Figura 22. Estabilidad de los componentes proteicos de la cepa UDEC-P9 en capilares, luego de 168 h a concentraciones decrecientes (4; 2; 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 mg/mL, Buffer Tris y Agua). Las fotos superiores corresponden al congelamiento instantáneo a -50°C por 15 minutos. Las fotos inferiores corresponden al descongelamiento a -6°C por 16 h. Fuente: Elaboración propia

6.8. Efecto del frío sobre la producción de proteínas anticongelantes.

Previo a la etapa de purificación de la o las proteínas tipo AFP producidas por la cepa UDEC-P9, se comparó el perfil de proteínas de extractos obtenidos de cultivos expuestos por 72 h a 4°C y sin exponer. El análisis por SDS-PAGE (Figura 22A), y su correspondiente gráfica de intensidad de banda (Figura 22B) muestran la presencia de al menos 4 proteínas inducidas por frío (Figura 22 - Flechas), las cuales tienen un

peso mayor a 63 kDa (Figura flechas). Con esto, se procedió a purificar el extracto citosólico inducido por 72 h a 4°C por medio de la técnica de Ice-Shell.

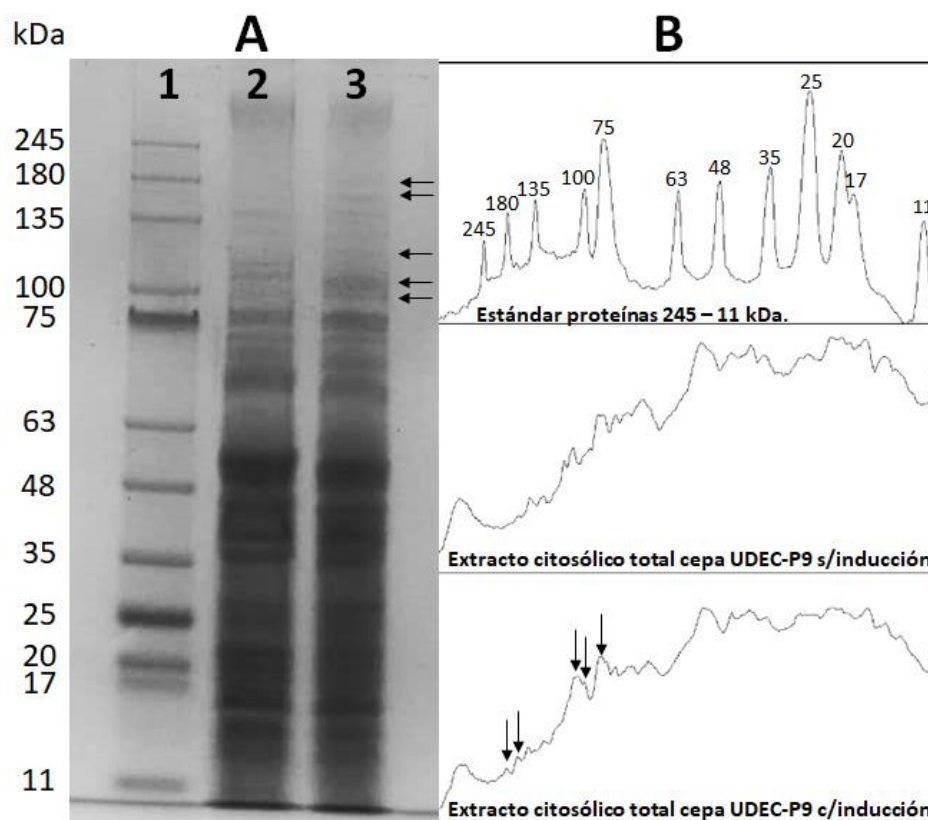


Figura 23. Perfil de proteínas totales del ECS de la cepa UDEC-P9. A) Gel SDS-PAGE: Carril 1, Estándar de proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, Extracto citosólico total no inducido; Carril 3, Extracto citosólico total inducido. B) Representación gráfica del perfil de proteínas del SDS-PAGE. Las flechas indican las proteínas inducidas por incubación a 4°C. Fuente: Elaboración propia

6.9. Detección y purificación parcial de AFP UDEC-P9.

La purificación parcial por Ice-Shell del extracto citosólico de la cepa UDEC-P9 inducido por 72 h a 4°C, mostró el enriquecimiento de una banda de ~67 kDa

visualizada a través de SDS-PAGE (Figura 23A), que podría ser responsable de la actividad crioprotectora encontrada en los ensayos de nano partículas de oro sometidas a congelamiento (Figura 5), la inhibición de la recristalización en capilares (Figura 15) y la crioprotección de matriz de agarosa (Figura 4), lo que es característico de una proteína anticongelante.

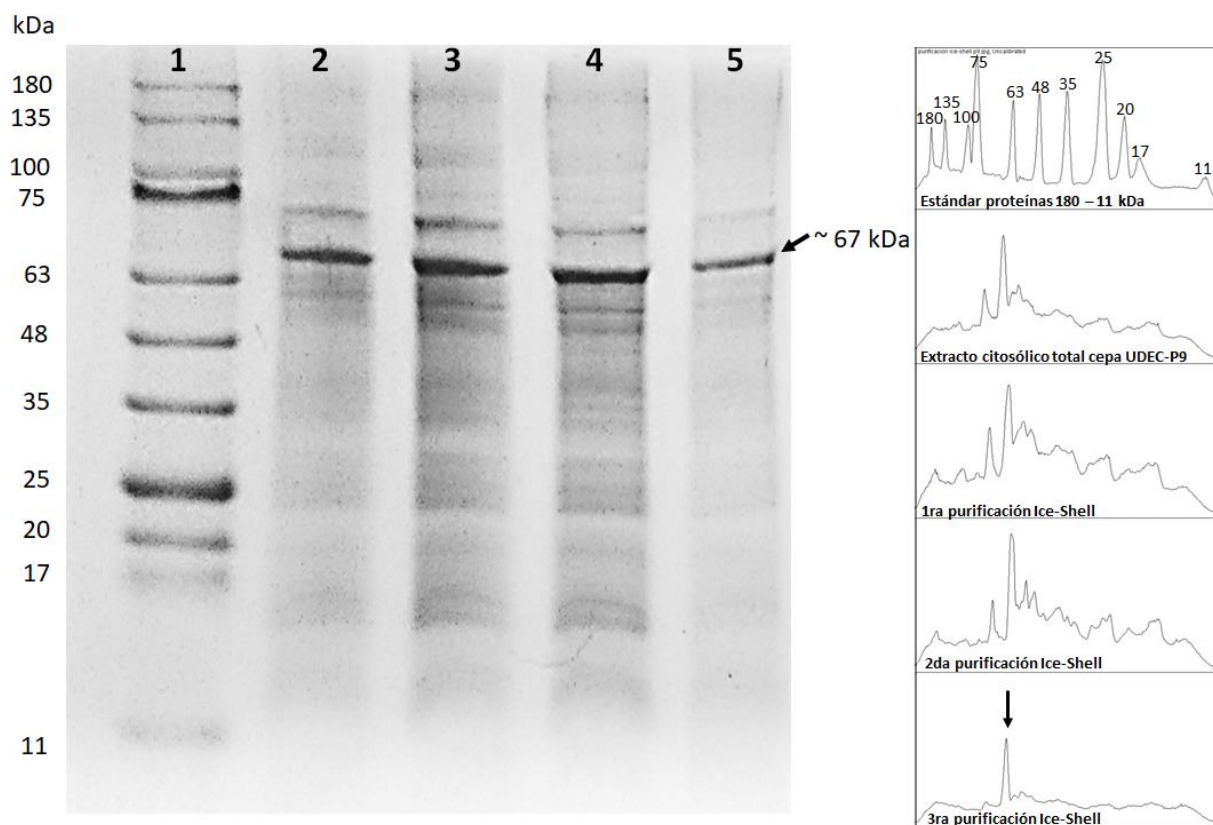


Figura 24. Purificación de AFP de la cepa UDEC-P9 por Ice-Shell. El ECS de cultivo de la cepa UDEC-P9 inducida, se sometió a purificación por Ice-Shell (ver Materiales y métodos). A) Gel SDS-PAGE: Carril 1, Estándar proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, ECS sin purificar; Carril 3, Primer ciclo de purificación; Carril 4, Segundo ciclo de purificación; Carril 5, Tercer ciclo de purificación. B) Representación gráfica del perfil de proteínas del gel SDS-PAGE. La flecha indica la AFP parcialmente purificada.

Fuente: Elaboración propia

La filtración con centrífón de 50 kDa de exclusión no permitió purificar mayormente la AFP UDEC-P9 (Figura 25), manteniéndose las bandas de proteínas de menor peso molecular (Figura 24, carril 2).

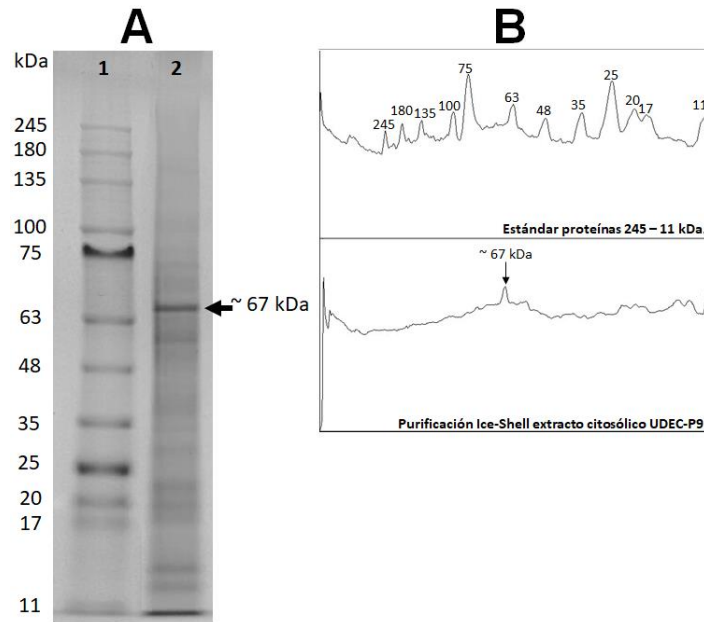


Figura 25. Purificación por filtración de AFP UDEC-P9. La AFP parcialmente purificada por Ice-Shell (Figura 24A) se sometió a filtración en centrífón con límite de exclusión 50 kDa. A) SDS-PAGE: Carril 1, Estándar proteínas 245 – 11 kDa; Carril 2, AFP UDEC-P9 filtrada. B) Representación gráfica de perfil de proteínas del gel.

Fuente: Elaboración propia

Se buscó también la presencia de proteínas anticongelantes secretadas al medio de cultivo. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo presencia de componentes proteicos tipo AFP en el medio de cultivo, descartando la presencia de proteínas anticongelantes secretadas al exterior de la bacteria (Datos no mostrados).

6.10. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada por Ice-Shell.

La AFP parcialmente purificada de la cepa UDEC-P9, mostró capacidad crioprotectora sobre nano partículas de oro frente al C/D a una concentración de 0,15 mg/mL, final (Figura 26). El extracto de AFP parcialmente purificado de la cepa control (*E. coli* BL21-AFP), también mostró capacidad crioprotectora en nano partículas de oro, pero a concentración mayor (0,3 mg/mL). Los valores del rango de extinción E_{520}/E_{620} determinados fueron 1.20 (Figura 26) y 1.27 (Figura 27), respectivamente.

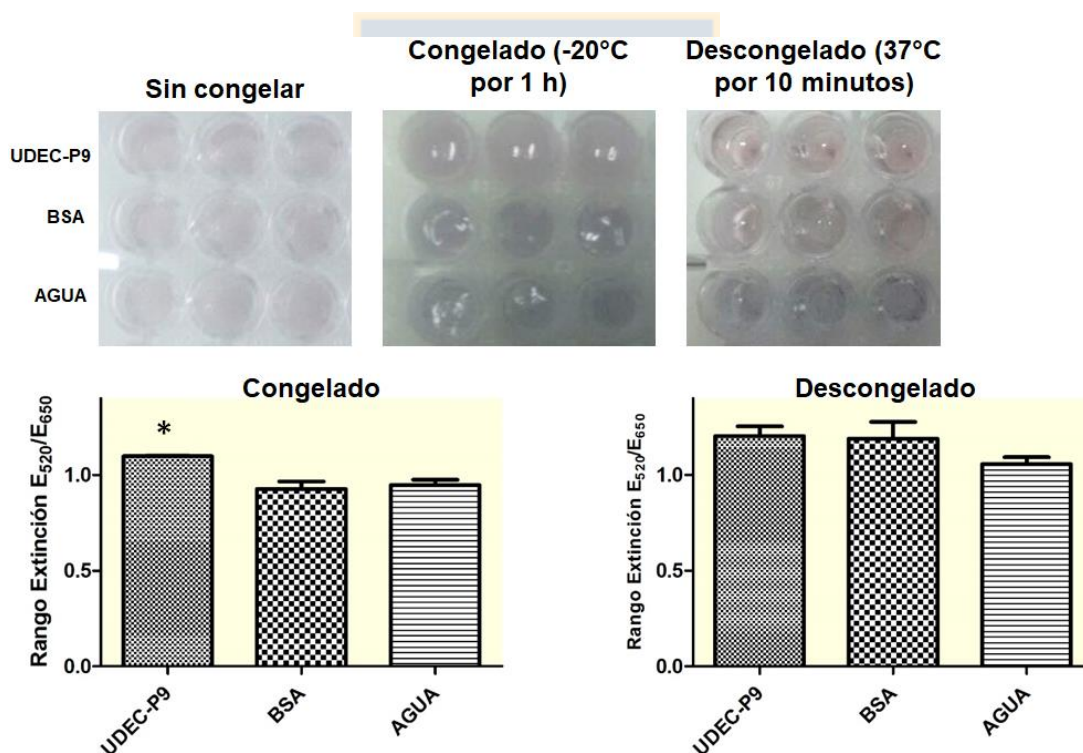


Figura 26. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP de cepa UDEC-P9. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP purificada por Ice-Shell (0.15 mg/mL) y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia

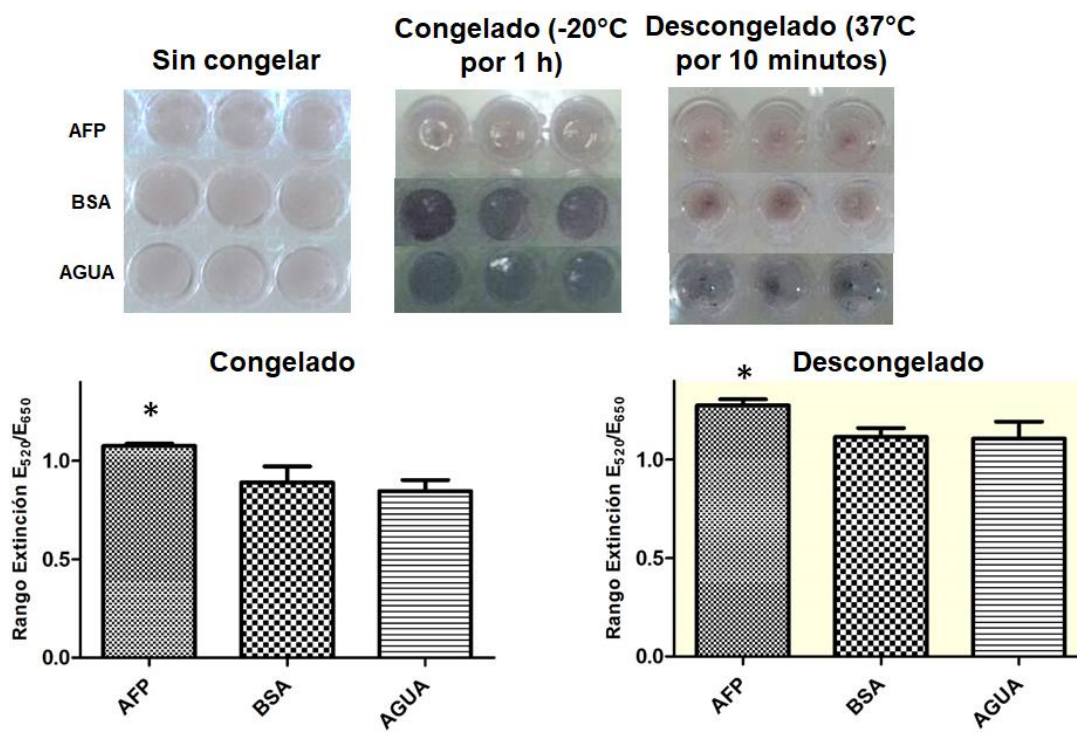


Figura 27. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP de *E. coli* BL21-AFP. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP purificada por Ice-Shell (0.15 mg/mL) y se determinó el rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y Métodos). Fuente: Elaboración propia

6.11. Actividad anticongelante de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada por filtración.

La muestra parcialmente purificada de la cepa UDEC-P9 y posteriormente concentrada por centrífuga de 50 kDa (límite de exclusión), mostró un aumento en su capacidad crioprotectora en comparación a la muestra sin filtrar (Figura 28). Así mismo, los valores de rango de extinción E_{520}/E_{650} obtenidos fueron 1.78 vs 1.20, respectivamente.

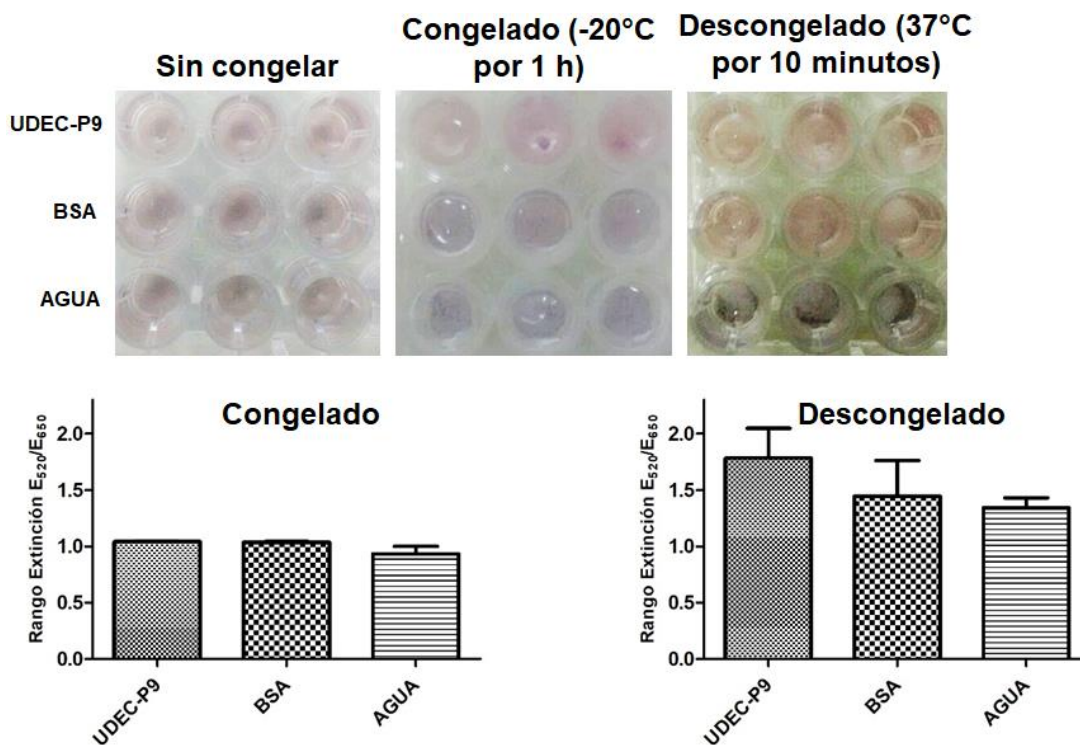


Figura 28. Inhibición de la agregación de nano partículas de oro por AFP UDEC-P9 concentrada. La suspensión de nano partículas de oro se sometió a un ciclo de C/D en ausencia y presencia de AFP concentrada con centricón de 50 kDa (ver Materiales y métodos). El rango de extinción E_{520}/E_{650} se calculó de forma similar a la figura 25 y 26. Fuente: Elaboración propia

6.12. Efecto de la temperatura sobre AFP UDEC-P9 parcialmente purificada.

Los ensayos de estabilidad frente al calentamiento por ebullición por 15 minutos, mostraron valores de rango de extinción E_{520}/E_{650} menores a la muestra sin calentar (Figura 29). Los valores de rango de extinción disminuyeron desde 1,78 a 1,28.

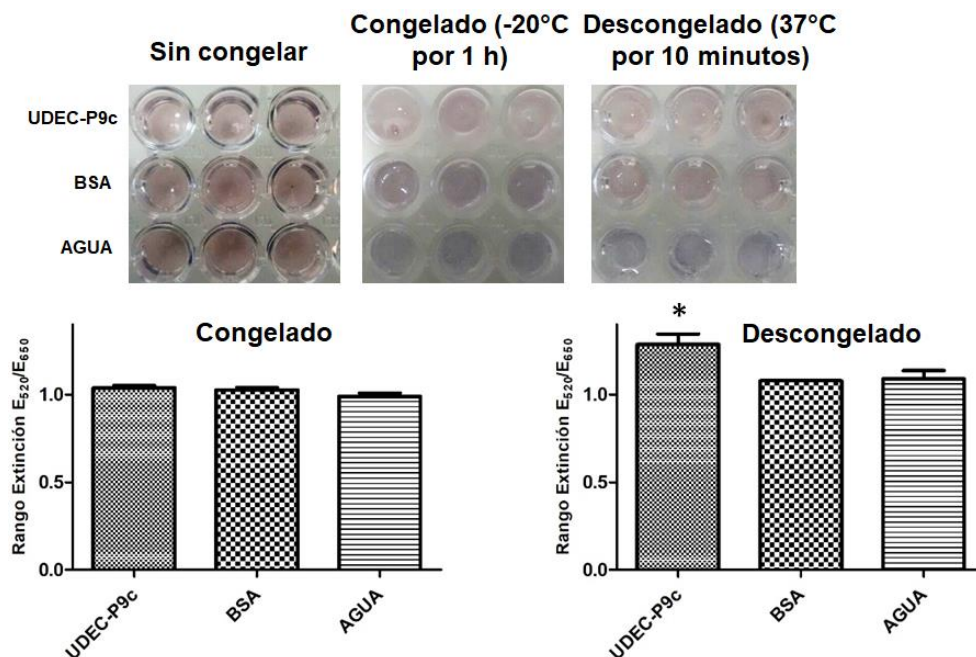


Figura 29. Estabilidad de AFP UDEC-P9 al calentamiento. Se realizó el mismo ensayo descrito en la Figura 26, pero sometiendo previamente una fracción a calentamiento a ebullición por 15 minutos y se determinó su actividad a través del rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y métodos). Fuente: Elaboración propia

6.13. Efecto de proteinasa K sobre la actividad de AFP UDEC-P9 parcialmente purificada de cepa UDEC-P9 y filtrada.

Los resultados obtenidos (Figura 30), mostraron una disminución en la inhibición de la agregación en nano partículas de oro, en comparación a la muestra filtrada (Figura 28). Los valores de rango de extinción E_{520}/E_{650} obtenidos, fueron 1.31 vs 1.78, respectivamente.

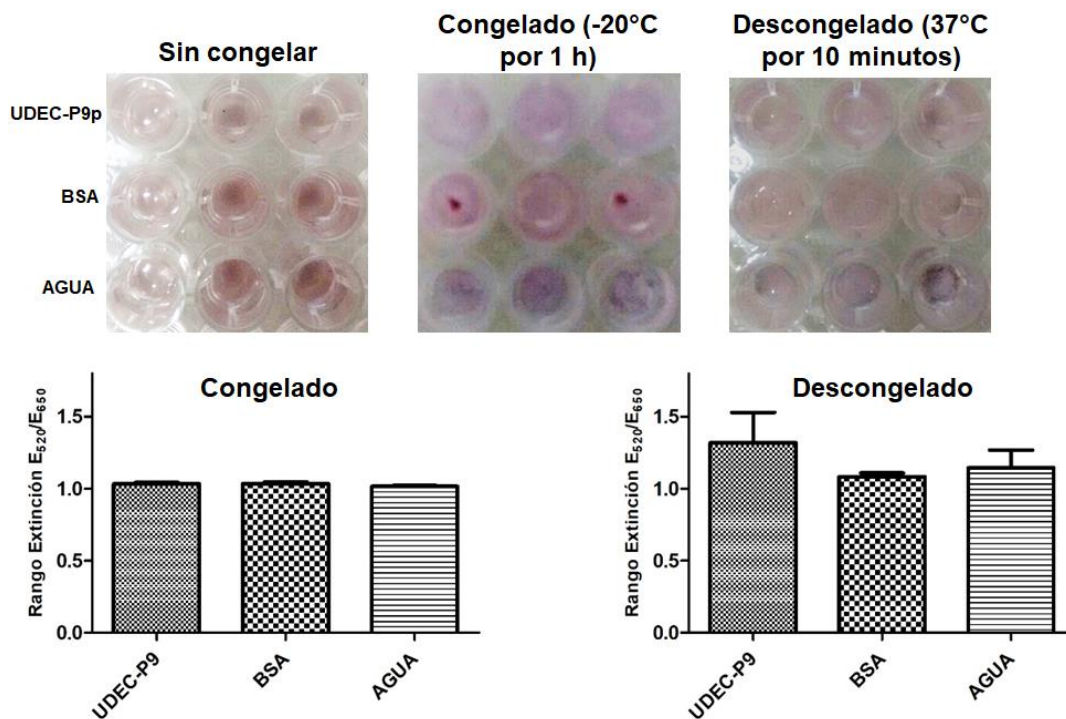


Figura 30. Estabilidad de AFP UDEC-P9 a degradación por proteinasa K. Se realizó el mismo ensayo descrito en la Figura 26, pero sometiendo previamente una fracción a incubación por 1 h con proteinasa K (100 µg/mL). Su actividad se determinó a través del rango de extinción E_{520}/E_{650} (ver Materiales y métodos). Fuente:

Elaboración propia

7. DISCUSIÓN.

La AFP tipo III clonada y expresada en *E. coli* BL21-AFP, gentilmente proporcionada por el Dr. Peter L. Davies, permitió la estandarización de los métodos empleados en esta tesis. En los experimentos de expresión de la AFP tipo III, se observaron proteínas purificadas por Ice-Shell, adicionales a las observadas en los geles SDS-PAGE del control de *E. coli*, sin plásmido recombinante. Esto podría ser consecuencia de la expresión de proteínas distintas de AFP tipo III codificadas por el plásmido químérico pET-20b o bien, a la interferencia de eventuales proteínas codificadas en el plásmido y que interfieran con la expresión de proteínas endógenas de la cepa *E. coli* BL21-AFP. Cabe señalar que, contrariamente a lo esperado, estas proteínas también se observaron en la fracción parcialmente purificada por Ice-Shell (Figura 2). Una posible explicación está dada por la potencial capacidad de unión inespecífica de los componentes proteicos y la capa de hielo que se emplea en el proceso de purificación por Ice-Shell (Marshall *et al.* 2016).

Por otra parte, llamó la atención la presencia de una banda de proteína de 15 kDa, que puede corresponder a un dímero de la AFP tipo III, pues su peso molecular es aproximadamente el doble del tamaño de la proteína de interés en esta tesis (Masa molecular = 7 kDa), la cual no se observó en el extracto citosólico sin purificar. Según resultados publicados por Stevens *et al.* (2015) la AFP tipo III es capaz de formar dímeros, incrementando su estabilidad y actividad anticongelante.

Un aspecto que llamó la atención, es que en un trabajo previo a esta tesis se observó que las cepas UDEC-P4 y UDEC-P9, presentaban tolerancia media a 20 ciclos C/D (Jonathan Lara, 2015, Unidad de investigación, Magíster en Ciencias mención Microbiología). Así mismo, en tesis paralelas se observó alta tolerancia a 5 ciclos C/D en las cepas patagónicas UDEC-P7, UDEC-P11, RIO-6P (María Jesús Schade, Tesis para optar al grado de Bioingeniero, 2018) y en las cepas antárticas UDEC-A5 y UDEC-

A8 (Andrea Tapia y María Jesús Schade, Tesis para optar al grado de Bioingeniero, 2018, respectivamente). Sin embargo, los ensayos con ECS utilizando un ciclo de C/D mostraron resultados variables, con ausencia de efecto crioprotector de los ECS obtenidos de las cepas UDEC-P11 y UDEC-A5. Por otra parte, las cepas RIO-6P, UDEC-P4 y UDEC-A5 presentaron actividad crioprotectora o anticongelante sólo en uno de los ensayos y levemente en un segundo ensayo para la cepa UDEC-P4. Estas diferencias, no esperadas, podrían ser consecuencia de una clasificación errónea de dichas cepas como altamente resistentes en los ensayos de C/D por el bajo número de ciclos inicialmente empleados (5 ciclos).

También llamó la atención que en el ensayo de crioprotección de matriz de agarosa se observaron burbujas de pequeño tamaño en la matriz descongelada de aquellos ensayos en que se utilizó ECS de UDEC-P7, RIO-6P y UDEC-A8. Esto sería sugerente de la formación de cristales pequeños en la matriz de agarosa durante el congelamiento, pues el empleo de ECS de cepas no tolerantes al C/D (UDEC-A5 y UDEC-P11, por ejemplo) se acompañó siempre con la formación de cristales de mayor tamaño y de burbujas grandes luego del descongelamiento. Este último parámetro, parece ser una indicación indirecta de la ausencia de AFPs mientras que las burbujas pequeñas podrían ser indicativas de presencia de AFPs (formación de cristales pequeños).

Del ensayo con nano partículas de oro, se puede colegir dos cosas: 1) Los componentes proteicos de la cepa UDEC-P9 con actividad anticongelante no fueron inactivados como se ha informado para algunas AFP. Por ejemplo, la AFP de diatomea que se inactiva luego de someterse a 5 ciclos de C/D (Park *et al.* 2012), y, 2) La concentración de ECS en el ensayo (donde estaría la AFP) es fundamental para la obtención de resultados consistentes, dado que, si bien el efecto de las AFPs no es coligativo, se requiere alcanzar una concentración crítica para tener el efecto

anticongelante. En este ensayo con nano partículas de oro se observó un resultado paradójico con el ECS del control positivo de *E. coli* BL21-AFP, dado que a concentración de 0,6 µg/mL presentó la mayor actividad crioprotectora, la que disminuyó cuando se utilizó ECS a concentración de 1,32 µg/mL. Una posible explicación puede deberse a la interacción de otras proteínas con la AFP, específicamente con el sitio de unión al hielo, pues si se bloquea dicho sitio, la actividad anticongelante disminuye.

Otro hallazgo encontrado en el ensayo con nano partículas de oro y ECS de la cepa *E. coli* 25922 o con el control negativo BSA, fue la existencia de inhibición parcial del agregamiento de las nano partículas de oro. No obstante, este fenómeno había sido observado también por Park *et al.* (2012) y Sharma & Deswal (2014), quienes demostraron que las nano partículas sintetizadas en ausencia de Ácido Mercaptosuccínico (MSA) permitían la unión de BSA a las nano partículas, a través de residuos aminoacídicos de cisteína presentes en la proteína, generando inhibición de la agregación de las nano partículas por efecto del congelamiento. Resultados similares fueron observados por Mitchell *et al.* (2015), quienes también establecieron la capacidad de la proteína BSA para unirse a las nano partículas y crio-protegerlas del congelamiento. Los autores sugieren un mecanismo inespecífico de unión de BSA con las nano partículas para impedir su agregación con el hielo.

En los ensayos de inhibición de la recristalización utilizando capilares se ratificó también el efecto crio-protector bajo de BSA, pues se requirieron 2 mg/mL (concentración máxima empleada en este ensayo) para verificar su capacidad crioprotectora.

En el ensayo de inhibición de la recristalización del hielo en capilares está el concepto de punto de corte, el cual se refiere a la máxima concentración donde no se produce inhibición de la recristalización (Tomczak *et al.* 2013). Llamó la atención que el ECS

de la cepa UDEC-P9, presentó la misma concentración máxima como punto de término hasta 168 h de almacenamiento en estado congelado (7 días después), sugiriendo la estabilidad de la potencial AFP presente en el ECS. Sin embargo, a las 48 h de congelamiento, se observó actividad IR con punto de término de 0,002 mg/mL; resultado que podría ser consecuencia de una baja homogeneidad del ECS luego del descongelamiento. Se requiere repetir esta experiencia para ratificar la validez de lo observado.

La purificación de AFP de la cepa UDEC-P9 por Ice-Shell también mostró unión inespecífica de otras proteínas, pero en menor grado. Cuando se realizaron ensayos para determinar su actividad anticongelante en nano partículas de oro, estos resultaron positivos. Estos resultados permitieron comprobar nuestra hipótesis de trabajo, puesto que se postuló que la purificación de AFPs a través del método de ice-shell mantiene inalterada las propiedades anticongelantes de la misma.

Se comprobó además que la AFP parcialmente purificada, fue sensible a temperatura (Figura 28) y a la acción de proteasas (Figura 29). Esto último, corroboró que la actividad encontrada en los ensayos es dependiente de la presencia de componente proteico, tipo AFP. En trabajo paralelo en el laboratorio, Manuel Carrión (Tesis para optar al grado de Bioquímico, 2017) detectó proteínas con comportamiento de AFP de menor peso molecular (12.000 kDa) (Figura 31) en ECS de las cepas UDEC-P7 y UDEC-A8. Las AFPs purificadas parcialmente por Ice-shell a partir de estos extractos, habían demostrado capacidad crio-protectora en matriz de agarosa y en ensayo de nano partículas de oro (datos no mostrados). En esta tesis, además, se demostró su capacidad de inhibición de la recristalización en capilares.

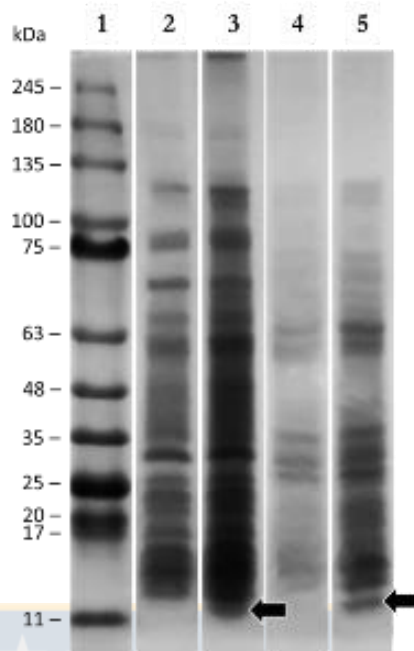


Figura 31. Purificación parcial por Ice-Shell de ECS provenientes de las cepas UDEC-P7 (Carriles 2 y 3) y UDEC-A8 (Carriles 4 y 5). Carril 1: Estándar proteínas 245 – 11 kDa. Carril 2: Extracto citosólico sin purificar de la cepa UDEC-P7. Carril 3: Purificación por Ice-Shell del extracto citosólico de la cepa UDEC-P7. Carril 4: Extracto citosólico sin purificar de la cepa UDEC-A8. Carril 5: Purificación por Ice-Shell del extracto citosólico de la cepa UDEC-A8. Fuente: Carrión, 2017

Los resultados presentados en esta tesis, en su totalidad, sugieren que la AFP UDEC-P9, parcialmente purificada por Ice-Shell a partir de ECS, mantiene su actividad crioprotectora determinada ECS sin purificar. Esta actividad crioprotectora es consistente con la tolerancia a 20 ciclos C/D demostrada por la cepa UDEC-P9.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, permiten aceptar la hipótesis que señala que las propiedades funcionales (efecto crio-protector e IR) de la proteína anticongelante obtenida de la cepa UDEC-P9 se mantienen inalteradas luego de realizar el proceso de purificación por afinidad al hielo .

1. Las cepas ensayadas (UDECC-P4 y UDEC-P9) tienen tolerancia media a 20 ciclos C/D.
2. Solo el ECS de la cepa UDEC-P9 resultó positivo a todos los ensayos realizados, fenómeno característico de una AFP.
3. La Tolerancia al C/D de la cepa UDEC-P4 no estaría mediada por AFP
4. La AFP de la cepa UDEC-P9 purificada por Ice-Shell conserva la propiedad inhibitoria de agregación de nano partículas de oro inducidas por congelamiento.
5. El tratamiento con proteasa de la AFP UDEC-P9 suprime la actividad anticongelante.
6. La AFP UDEC – P9 presenta un peso molecular de 67 kDa.

9. PROYECCIONES.

Los resultados presentados son los primeros del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana que muestran la obtención de una proteína anticongelante de origen bacteriano purificada por Ice-Shell.

Estos resultados abren camino a estudios con la proteína purificada, tendientes a conocer su secuencia aminoacídica y la pesquisa del gen que la codifica, su clonación y expresión *in vitro*. Actualmente está en curso el proceso de secuenciación.

Además, se tiene planificado identificar la cepa productora de AFP para establecer si corresponde a una especie ya identificada o una nueva especie bacteriana.



10. REFERENCIAS

1. Aguayo P., González C., Barra R., Becerra J., Martínez M. (2014). Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30:1101–1110.
2. Ávila-Portillo L., Madero J., López C., León M., Acosta L., Gómez C., Delgado L., Gómez C., Lozano J. & Reguero M. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57:291-300.
3. Barret B (2001) Thermal hysteresis proteins. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 33:105-117.
4. Boonsupthip W. & Lee T. (2003). Application of antifreeze protein for food preservation: Effect of type III antifreeze protein for preservation of gel-forming of frozen and chilled actomyosin. *Journal of food science*. 68:1-6.
5. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248–254.
6. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L. & Righetti P. (2004). Blue Silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 25:1327-1333.
7. Carrión M. (2017). Purificación y caracterización funcional de proteínas anticongelantes hiperactivas en bacterias aisladas de zonas Antárticas y Patagónicas Chilenas. Tesis para optar al grado de Bioquímico. Universidad de Concepción. 62 pp.
8. Casanueva A, Tuffin M, Cary C & Cowan D (2015) Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends in microbiology*. 1:1-9.
9. Chao H., Davies P. & Carpenter J. (1996). Effects on antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation. *The Journal of Experimental Biology*. 199:2071-2076.
10. Cheng, C & DeVries, A (1991) The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of coldwater fish. In *Life Under Extreme Conditions*. Editorial DiPrisco. pp. 1–14.
11. Cid F., Rilling J., Graether S., Bravo L., Mora M & Jorquera M. (2016). Properties and biotechnological applications of ice binding proteins in bacteria. *FEMS Microbiology Letters Advance*. 41 pp.
12. Davies P & Sykes B (1997) Antifreeze proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 7:828-834.
13. Davies P (2014) Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in Biochemical Sciences*. 39:548-555.
14. De los Ríos P. & D. Soto (2009). Estudios Limnológicos En Lagos Y Lagunas Del Parque Nacional Torres Del Paine (51° S, Chile). *Anales Instituto Patagonia (Chile)*. 37:63-71.

15. Ding X., Zhang H., Chen H., Wang L., Qian H. & Qi X. (2015). Extraction, purification and identification of antifreeze proteins from cold acclimated malting barley (*Hordeum vulgare* L.) Food Chemistry. 175:74-81.
16. Driedzic W, Clow K, Short C & Ewart K (2006) Glycerol production in rainbow smelt (*Osmerus mordax*) may be triggered by low temperature alone and is associated with the activation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol-3-phosphatase. Journal of Experimental Biology. 209:1016–1023.
17. Duman J & Olsen T (1993) Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology* 30: 322–328.
18. Espinoza C. (2014). Caracterización de proteínas anticongelantes producidas por bacterias patagónicas con potencial uso en crioprotección. Tesis para optar al grado de Bioingeniero. Universidad de Concepción, Chile. 68 pp.
19. Feeney R, Osuga D & Yeh Y. (1990). Effect of Boronic Acids on Antifreeze Proteins. Journal of Protein Chemistry. 10:1-4.
20. Gilbert J, Hill P, Dodd C, Laybourn-Parry C (2004) Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology* 150:171-180.
21. Gilbert J, Davies P & Laybourn-Parry J (2005) A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 245:67-72.
22. Gounot A. (1991). Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *Journal Of Applied Bacteriology*. 71:386-397.
23. Guo S, Garnham C, Whitney J, Graham L & Davies P (2012) Re-evaluation of a bacterial antifreeze protein as an adhesion with ice-binding activity. *PLOS ONE*. 7:1-10.
24. Harding M, Anderberg P & Haymet A (2003) Antifreeze glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem*. 270:1381-1392.
25. Hartmann S., Agustin S., Clauss T., Wex H., Santl-Temkiv T., Voigtländer J., Niedermeier D. & Stratmann F. (2013). Immersion freezing of ice nucleation active protein complexes. *Atmos. Chem. Phys*. 13:5751-5766.
26. Iwasaki, K., Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H. y Tsuda, S. (2009). Enhancement of the activity of antifreeze protein by addition of a water soluble polymer. *Cryobiology*. 54:89-92.
27. Jaenicke R & Böhm G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology*. 8:738-748.
28. Jaewang L., Kim S., Youm H., Kim H., Lee J., Suh C. & Kim S. (2015). Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *PLOS ONE*. 10:1-16.

29. Ji In Park, Hyuck Lee J., Gwak Y., Jun Kim H., Jin E., Kim Y. (2013). Frozen assembly of gold nanoparticles for rapid analysis of antifreeze protein activity. *Biosensors and Bioelectronics*. 41: 752–757 pp.
30. Jingkun & Tung-Ching (1998). Bacterial extracellular ice nucleator effects on freezing of foods. *Journal of food science*. 63:375-381.
31. Jin-Yao L, Ji M, Fu-Chun Z (2005) Recent advances in research of antifreeze proteins. *Chinese Journal of biochemistry and molecular biology*. 21:717-722.
32. Joly M., Attard E., Sancelme M., Deguillaume L., Guilbaud C., Morris C., Amato P. & Delort A. (2013). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. *Atmospheric environment*. 70: 392-400.
33. Jung L., Youm H., Lee H., Jee B., Suh C. & Kim S. (2015). Effect of antifreeze protein on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Yonsei Medical Journal*. 56:778-784.
34. Kang J. & James R. (2004). Reduction of freeze-thaw-induced hemolysis of red blood cells by an algal ice-binding protein. *CryoLetters*. 25:307-310.
35. Kasana R (2010) Proteases from psychrotrophs: An overview. *Critical Reviews in Microbiology*. 36(2):134-145.
36. Kawahara H, Nakano Y, Omiya K, Muryoi N, Nishikawa J & Obata H (2004) Production of two types of ice crystal-controlling proteins in Antarctic bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98: 220–223.
37. Kawahara H, Iwanaka Y, Higa S, Muryoi N, Sato M, Honda M, Omura H & Obata H (2007) A novel, intracellular antifreeze protein in an antarctic bacterium, *Flavobacterium xanthum*. *Cryo Letters* 28: 39–49.
38. Kuiper M., C. Lankin, S. Gauthier, V. Walker, and P. Davies. 2003. Purification of antifreeze proteins by adsorption to ice. *Biochemical and biophysical research communications*. 300: 645–8.
39. Lara J. (2015). Tolerancia al congelamiento y caracterización preliminar de proteínas con actividad anticongelante en la cepa de *Pseudomonas trivialis* UDEC-P4. Unidad de Investigación. Programa de Magíster en Cs. Mn. Microbiología. Universidad de Concepción, Chile. 16 pp.
40. Li B. & Sun D. (2002). Novel methods for rapid freezing and thawing of foods – a review. *Journal of food engineering*. 54:175-182.
41. Lin F., Davies P. & Graham L. (2011). The Thr- and Ala-Rich hyperactive antifreeze protein from inchworm folds as a flat silk-like β -Helix. *Biochemistry*. 50:4467-4478.
42. Liou Y, Daley M, Graham L, Kay C, Walker V, Sykes D & Davies P. (2000). Folding and structural characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. *Protein Expression and purification*. 19:148-157.

43. Marshall C., Chakrabarty A. & Davies P. (2005). Hyperactive Antifreeze Protein From Winter Flounder Is a Very Long Rod-Like Dimer of α -Helices. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:17920-17929 pp.
44. Marshall C., Basu K. & Davies P. (2016). Ice-Shell purification of ice-binding proteins. *Cryobiology*. 1-6 pp.
45. Martínez S., Barbosa V., Pérez S. Robles V. & Herráez. (2009). Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*. 58:128:133.
46. Morris C., Georgakopoulos D. & Sands D. (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV France*. 121:87-103.
47. Nada H & Furukawa Y (2012) Antifreeze proteins: computer simulation studies on the mechanism of ice growth inhibition. *Polymer journal*. 44:690-698.
48. Nasser I., Shaaban H. & Krell A. (2011). Studies on new antifreeze protein from the psychrophilic diatom, *Fragilariopsis cylindrus*. *African Journal of Biotechnology*. 10:10607-10611.
49. Payne S., Sandford D., Harris A. & Young A. (1994). The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat Science*. 37:429-438.
50. Priscu J. & B. Christner (2003). Earth's Icy biosphere. *Editorial Bull AT Microbial Diversity And Bioprospecting*. 130–145.
51. Raymond J, Fritsen C & Shen K (2007) An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* 61:214–221.
52. Rojas C. (2013). Determinación de la capacidad crioprotectora y caracterización preliminar de proteínas estructurales de hielo sintetizadas por bacterias antárticas y patagónicas chilenas. Tesis para optar al grado de Bioquímico. Universidad de Concepción, Chile. 59 pp.
53. Rubinsky B, Arav A, Mattioli M & Devries A (1990) The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 173:1-6.
54. Schägger H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Protocols*. 1:16-23.
55. Scotter A, Marshall C, Graham L, Gilbert J, Graham C & Davies P (2006) The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiology*. 53:229-239.
56. Shivaji S. & Prakash J. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of Microbiology*. 192:85-95.
57. Soto D. (2002). Oligotrophic Patterns in Southern Chilean Lakes: The Relevance of Nutrients And Mixing Depth. *Revista Chilena de Historia Natural*. pp. 377–393.
58. Su J., Naing A. Park K. & Kim C. (2015). The effect of antifreeze protein on the cryopreservation of chrysanthemums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 123:1-7 pp.

59. Sun X, Griffith M, Pasternak J & Glick B (1995) Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 776–784.
60. Tomczak M., Marshall C., Gilbert J. & Davies P. (2003). A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311:1041-1046.
61. Utsun N & Turhan S (2015) Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. *Journal of food processing and preservation*. 39:1-9.
62. Vanderveer T., Choi J., Miao D. & Walker V. (2014). Expression and localization of an ice nucleating protein from a soil bacterium, *Pseudomonas borealis*. *Cryobiology*. 69:110-118.
63. Wang C., Pakhomova S., Newcomer M., Christner B., Luo BH. (2017). Structural basis of antifreeze activity of a bacterial multi-domain antifreeze protein. *PLOS ONE* 12:1-19.
64. Wilson S. & Walker V. (2010). Selection of low-temperature resistance in bacteria and potential applications. *Environmental technology*. 31:943-956.
65. Xu H., Griffith M., Patten C. & Glick B. (1998). Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 44: 64-73.
66. Yamashita Y, Nakamura N, Omiya K, Nishikawa J, Kawahara H & Obata H (2002) Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66: 239–247.
67. Yeh Y & Feeney R (1996) Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function. *Chemical reviews*. 96:1-18.