

24.
124



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO ELECTROFORÉTICO COMPARATIVO DE LOS
FENÓMENOS DE ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN DE LA
HEMISFERICINA Y PINGUAINA 2 PROTEASAS
VEGETALES

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

Esteban Mayén Morales



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO.

INTRODUCCION	1.
OBJETIVOS	9.
MATERIALES Y METODOS	10.
RESULTADOS	27.
DISCUSION	43.
CONCLUSIONES	48.
BIBLIOGRAFIA	49.

INTRODUCCION.

Las enzimas son unidades funcionales del metabolismo celular que actuando en secuencias organizadas catalizan los centenares de reacciones escalonadas que van hacia la síntesis y/o degradación de prácticamente todas las biomoléculas. Dentro de la gran variedad de enzimas que participan en el metabolismo de los seres vivos se encuentran las enzimas proteolíticas, que han sido objeto de estudio de muchos investigadores durante los últimos 75 años. Indudablemente la razón de este interés se debe a la gran importancia metabólica que tienen en la degradación total o parcial de las proteínas en casi todas las formas de vida.

Las proteasas son hidrolasas que al actuar sobre los enlaces peptídicos de las proteínas o péptidos hacen posible su degradación. Con base en su mecanismo de acción se clasifican en: Endopeptidasas o Proteinasas, que hidrolizan enlaces en el interior de las cadenas peptídicas de las proteínas y Exopeptidasas o Peptidasas, que actúan sobre el enlace extremo de una cadena polipeptídica bien sea carboxílico (carboxipeptidasas) o amínico (amino-peptidasas) (7).

Dentro de las endopeptidasas encontramos: a) aquellas que poseen un residuo de serina en su sitio activo, son de origen animal y microbiano, como la tripsina, la quimotripsina, la trombina, etc., b) las enzimas con un residuo activo de cisteína, en su mayoría de procedencia vegetal como la papaína, la ficina, la bromelaína etc., c) las que actúan en un medio muy ácido como la pepsina.

Dentro de las exopeptidasas encontramos a la carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa básica, etc. (10).

La mayor parte del conocimiento bioquímico actual sobre endopeptidasas proviene de estudios realizados con enzimas de origen animal y microbiano. Sin embargo, el hecho de que las proteasas vegetales se encuentren en gran proporción en los frutos de ciertas plantas, facilita su extracción y purificación en gran escala, representando una fuente alterna para la obtención de este grupo de enzimas y así, incrementar tanto su conocimiento, como la búsqueda de nuevas aplicaciones.

Se ha reportado la presencia de enzimas dependientes de grupos sulfhidrilos (SH) en fracciones parcialmente purificadas y en extractos crudos de tallos y frutos de diferentes familias de plantas tropicales y subtropicales como son Caricaceae, Bromelaceae, Moraceae, etc. (26, 27).

Las proteasas vegetales denominadas Pinguinafina y Hemisfericina se extraen de los frutos de Bromelia pinguin L. y Bromelia hemisphaerica respectivamente, y fueron descritos primeramente por Asenjo y col. (3), y por Del Castillo y Castañeda (10), estas especies pertenecen a la familia Bromelaceae con una gran variedad de plantas estrictamente americanas (5, 23).

Las plantas del género Bromelia viven en costa arenosa o matorral, son rústicas con estolones subterráneos. Sus hojas son lisas, fibrosas, sésiles, espinosas en los bordes, arrosetadas, miden de 4 a 8 cm de ancho y de 1 a 1.5 m de longitud o poco más. Presentan inflorescencias pedunculadas o sésiles, paniculadas, muy tomentosas y escamosas; los sépalos son libres sobre el ovario y los pétalos dorsalmente unidos por filamentos, libres en los ápices;

estambres fijos en el tubo de la corola, incluso, de anteras angostas agudas; el ovario es infero. Los frutos de Bromelia pinguin son bayas amarillo-anaranjadas, ácidas ovoides de 3 a 5 cm de largo por 2 cm de grosor. Los frutos de Bromelia hemisphaerica son amarillo-violáceos de aproximadamente 8 cm de largo por 2 a 3 cm de grosor, crecen en el centro de la planta (21).

En México, B. pinguin se localiza en los estados de Sinaloa, Veracruz, Jalisco, Yucatán, Oaxaca y Nayarit, y B. hemisphaerica en los estados de Morelos, Guerrero, Michoacán y Chiapas.

La Pinguinafna y la Hemisfericina al poseer en su sitio catalítico un residuo de cisteína, pueden inhibirse con metales pesados como Hg, Fe y Cu ya que estos metales reaccionan facilmente con los grupos SH (35). La inhibición es reversible en presencia de compuestos que contienen grupos SH libres, como cisteína, 2-mercaptoetanol y otros agentes reductores como NaCN, KCN, etc., que activan a estas enzimas (35). Este comportamiento es muy similar al de otras proteasas vegetales como la papaína y bromelaína, por lo que el mecanismo de acción propuesto para explicar la hidrólisis de proteínas por papaína puede tentativamente aplicarse a estas enzimas en la serie de reacciones (Fig. A) que se describen a continuación (14, 15).

En I se encuentran tanto la enzima como el sustrato (E,S) que al unirse dan lugar al complejo de Michaelis (E-S) sin enlaces covalentes (II) y sujeto a la constante de disociación K_s .

El proceso de acilación es el paso de II a III con formación de un

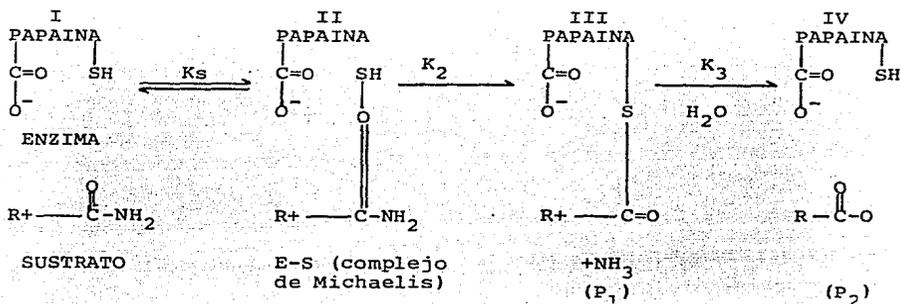


Figura A.

enlace tioéster entre el grupo R⁺-C^O del sustrato y el SH libre del sitio catalítico de la enzima y la liberación de un producto (P₁); el proceso de acilación es regido por la constante K₂.

En el tercer paso de "desacilación" (de la fase III a IV) interviene el agua realizando un ataque nucleofílico, al carbono unido al S formador del tioéster, con la consiguiente liberación del segundo producto (P₂) y de la enzima libre (enzima SH) capaz de seguir la catálisis.

I. HEMISFERICINA.

La Hemisfericina es una protefina con un peso molecular de 24,000 daltones, con un grupo SH libre y 9 formas moleculares todas ellas activas (determinadas por electroenfoque). Cada una de las bandas posee valina como único aminoácido N-terminal y serina como único aminoácido C-terminal; estos resultados se interpretaron como sustituciones internas de aminoácidos que dan lugar a las múltiples formas moleculares (13).

En estudios posteriores, se reportó en Hemisfericina la existencia de una proteasa de bajo peso molecular que se denominó Hemisferi-

cina Dializable (H-D) que por doble inmunodifusión cruza totalmente con Hemisfericina.

Cuando ambas proteasas se someten a electroforesis en gel de poli-acrilamida, libre de agentes reductores y desnaturalizantes, la Hemisfericina Dializable muestra 3 bandas y la Hemisfericina 7 - 8 bandas todas con actividad enzimática sobre gelatina. A su vez, cuando se someten a electroforesis en gel de poli-acrilamida con dodecil sulfato de sodio y 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE), muestran una sola banda de aproximadamente 8,000 daltones de peso molecular (9). Con base en estos resultados, se postuló un modelo (2) que considera la posibilidad de asociación entre monómeros de 8,000 daltones de peso molecular a través de grupos SH libres formando enlaces disulfuro transversales o bien, asociación de los monómeros a través de uniones no covalentes, formándose en consecuencia mediante este tipo de enlaces o una combinación de ellos, dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros, etc., siendo la asociación más frecuente la formada por 3 monómeros, que correspondería a la Hemisfericina reportada de peso molecular cercano a 24,000 daltones. Así, una posible estructura de las formas moleculares que presenta Hemisfericina y que correspondería con el número de bandas encontradas por electroforesis y por electroenfoque se esquematiza en la figura B. El péptido principal se representa por una línea, con valina y serina como aminoácidos terminales y un solo grupo SH libre según los datos reportados (2). Al analizar el esquema, los dímeros pueden presentarse en dos formas: a) con una unión disulfuro S-S y b) con dos grupos SH libres y el mismo peso molecular. Así se explicaría la presencia de tres bandas en la forma dializable con diferente movilidad encontradas al ser sometidas a un campo eléctrico. Este

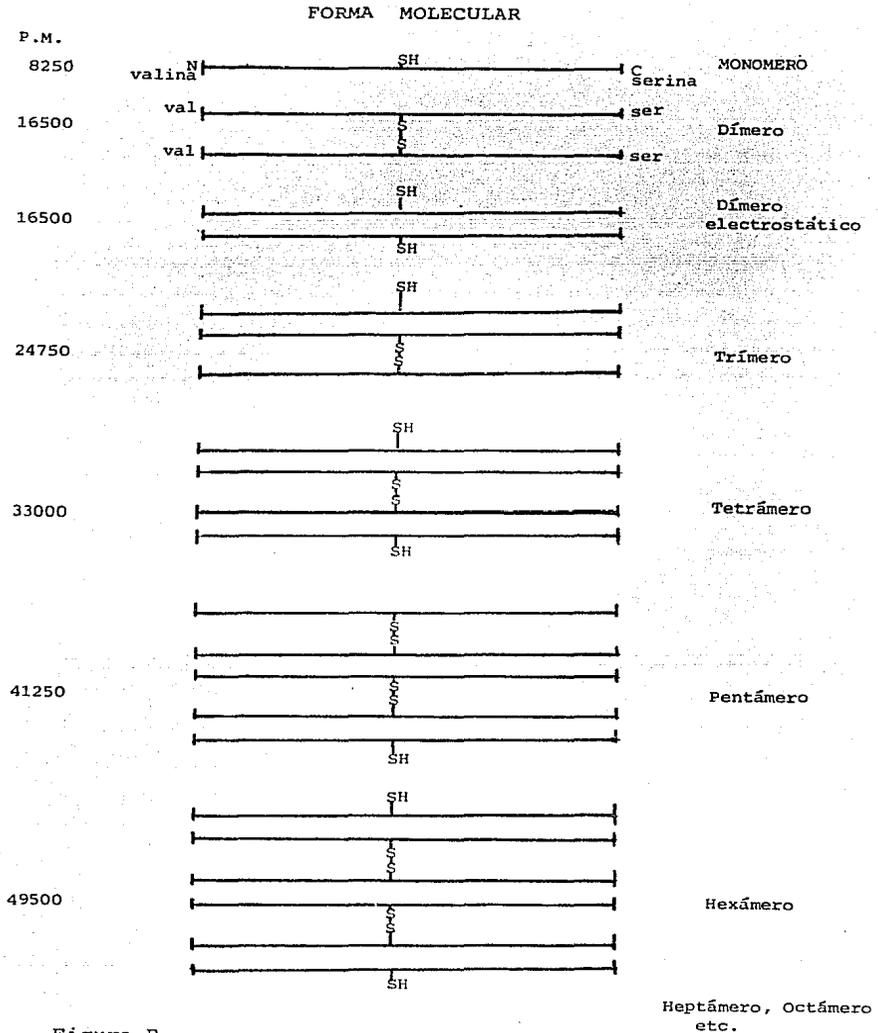


Figura B.

razonamiento es válido para el resto de los polímeros. El porcentaje aproximado de estas formas se considera en un 3% para monómeros y dímeros, un 95% para trímeros y un 2% para polímeros de alto peso molecular.

II. PINGUAINA.

Toro-Goyco y col. (35) reportan la Pinguinaína como una molécula de aproximadamente 25,000 daltones de peso molecular, una composición de aminoácidos muy similar a la de la papaína, con alanina como aminoácido C-terminal y lisina como aminoácido N-terminal, con un solo componente enzimático en la variedad Puerto Rico (4) mientras que Messing, A. R. (25) reporta dos componentes en la variedad Cubana. Recientemente, en la variedad Mexicana se comunicó la presencia de dos componentes con identidad inmunológica, que en electroforesis en gel de poliacrilamida libre de agentes reductores y desnaturalizantes revelan 5 bandas proteicas activas. Estos resultados se interpretaron como debidos a ligeras variaciones en la molécula, suficientes para modificar su movilidad electroforética (20).

El hecho de que los componentes enzimáticos de la Pinguinaína presenten identidad inmunológica por doble inmunodifusión con suero antiPinguinaína, y dada su cercanía filogenética con la Hemisfericina con la que guarda una relación antigénica muy cercana (ya que cruzan parcialmente entre sí, pero con gran similitud), así como la presencia en el jugo de B. pinguin de un componente de bajo peso molecular, dializable y con actividad proteolítica (como en Hemisfericina) (36), nos hace suponer que Pinguinaína también presente el fenómeno de asociación-disociación observado en otras proteasas

MATERIALES Y METODOS.

1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS ENZIMAS.

1.1.- Fruto.

Los frutos de B. hemisphaerica y B. pinguin fueron colectados en los estados de Morelos y Nayarit, México, respectivamente, y se almacenaron hasta su uso dentro de bolsas de polietileno en un congelador Revco-Ultra Low a -40°C .

1.2.- Obtención del jugo.

El jugo de los frutos de ambas bromeliáceas se obtuvo por maceración en un mortero y filtración a través de gasa; posteriormente, se centrifugó a 20,000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada International PR-6, con objeto de eliminar el material no soluble. Los precipitados se descartaron, y los sobrenadantes se dializaron contra amortiguador de citratos 0.02 M pH 5.5 con acetato fenil mercuríco $1 \times 10^{-4}\text{M}$ (citratos-mercurial).

1.3.- Cromatografía de exclusión molecular.

En una columna de 22 x 2.5 cm (Pharmacia) empacada con Sephadex G 75-120 (con límite de exclusión de proteínas de 80,000 daltones) y equilibrada con amortiguador de citratos-mercurial, se aplicaron 5.0 ml de jugo dializado de B. hemisphaerica utilizando una bomba peristáltica LKB Varioperpex, con flujo constante de 34 ml/hr. Se colectaron fracciones de 4.0 ml en un colector LKB Redirac, empleando amortiguador de citratos-mercurial como eluyente. Para el jugo dializado de B. pinguin se utilizó una columna de 100 x 2.5 cm con flujo constante de 35 ml/hr, y se colectaron fracciones de 4.0 ml, con citratos-mercurial como eluyente.

A las fracciones colectadas se les midió su absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II, y se determinó la actividad proteolítica sobre caseína para las fracciones obtenidas de B. pinguin, y sobre Hide Powder Azure (colágena a la que se acopló covalentemente en los residuos de hidroxiprolina el colorante azul de remazol brillante) para las de B. hemisphaerica.

2. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LAS ENZIMAS.

2.1.- Actividad enzimática sobre caseína.

Se empleó el método de Kunitz (16), modificado como se describe a continuación: a 20 μ l de cada fracción colectada se le añadió 0.9 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.6 y 0.1 ml de cisteína 0.2 M como activador (concentración óptima determinada previamente). La mezcla anterior se preincubó en un baño a 37 °C durante 30 minutos con el fin de lograr la activación de la enzima; inmediatamente después se añadió 1.0 ml de caseína al 4% (Merk) disuelta en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.6, y se incubó durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 3 ml de ácido tricloroacético al 5% para suspender la actividad proteolítica, y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se filtró el contenido de los tubos y se midió su absorbencia a 280 nm, contra un blanco de reactivos tratado de igual manera, pero sin enzima.

La actividad enzimática se expresa en μ moles de tirosina/min/ml. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que transforma un micromol de sustrato por unidad de tiempo (minuto), medido como tirosina liberada bajo las condiciones del experimento. La actividad específica se expresa en número de unidades por

miligramo de enzima.

2.2.- Actividad enzimática sobre Hide Powder Azure.

Se empleó el método de Rinderknecht (30), modificado como se describe a continuación: a tubos de ensaye (13 x 100 mm) conteniendo 20 μ l de cada una de las fracciones colectadas, se les añadió 4.0 ml de Tris-Cl 0.05 M pH 7.8 y 0.1 ml de cisteína 0.2 M; esta mezcla se preincubó en un baño a 37 °C durante 30 minutos, con la finalidad de lograr la activación de la enzima y eliminar por competencia el efecto inhibitor del compuesto mercurial. Inmediatamente después fue vertida sobre tubos con 10 mg del sustrato azure (Calbiochem, USA), los tubos se mantuvieron a 37 °C hasta la aparición del color azul. La reacción se detuvo colocando los tubos en baño de hielo. El tiempo de reacción se registró desde el momento en que la mezcla que contenía a la enzima activada fue vertida sobre los tubos con el sustrato, hasta la aparición del color, el tiempo máximo fue de 30 minutos. La intensidad del color variará dependiendo de la actividad enzimática.

El contenido de los tubos se filtro y los filtrados se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos tratado de igual manera pero sin enzima. La absorbencia de las fracciones se dividió entre el tiempo de reacción. La actividad enzimática se expresa como absorbencia/min/ml. Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que origina un incremento de una unidad de D.O. por minuto de reacción bajo las condiciones experimentales. La actividad específica es el número de unidades por miligramo de enzima.

3. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Para la determinación de proteínas tanto de los jugos totales como de las formas filtradas en gel se empleó el método de Lowry (21), el cual es una modificación del método de Folin-Ciocalteu, basado en la determinación de los aminoácidos tirosina y triptofano, presentes en las proteínas. Debido a que la cantidad de estos aminoácidos varía en las diferentes proteínas se requiere una curva de referencia.

Soluciones.

A₁ Tartrato de sodio y potasio al 2%.

A₂ Sulfato de cobre al 1%.

A₃ Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N.

B.- Mezclar 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio, 0.5 ml de sulfato de cobre y 50 ml de carbonato de sodio. Esta solución se prepara momentos antes de utilizarse, ya que es funcional por breve tiempo.

C.- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada 1:1. Preparar momentos antes de su uso.

D.- Referencia de proteínas: albumina sérica bovina a una concentración de 1 mg/ml en solución salina 0.85%.

Procedimiento.

- En tubos de ensaye de 10 x 100 mm se colocaron 20 μ l de la muestra problema y 380 μ l de la solución de NaCl 0.85% (independientemente del volumen de muestra empleado, esta deberá ser llevada a un volumen total de 0.4 ml).

- A continuación se añadió a cada tubo 2.0 ml de la solución B, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.

- Transcurrido este tiempo se añadió a cada tubo 0.2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente en obscuridad, posteriormente se leyeron los tubos en un espectrofotómetro a 500 nm contra un blanco de reactivos tratado de igual manera que las muestras.
- Los valores obtenidos se interpolaron en la curva patrón elaborada previamente, empleando como referencia albúmina sérica bovina en concentraciones crecientes de 0 a 250 µg.

4. DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES.

Se empleó el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois y col. (11), el cual es un método sencillo, rápido y útil tanto para monosacáridos como para sus derivados metilados, así como oligosacáridos y polisacáridos.

Soluciones.

A.- Solución acuosa de fenol al 5%.

B.- Acido sulfúrico concentrado.

C.- Referencia de azúcar: glucosa en una concentración de 1 mg/ml en agua destilada.

Procedimiento.

- En tubos de ensaye (13 x 100 mm) se colocaron 20 µl de la muestra a determinar, y 480 µl de agua destilada para alcanzar un volumen total de 0.5 ml.
- A continuación se les añadió 0.3 ml de fenol al 5%, colocando los tubos en un baño de hielo.
- Se agregó a cada tubo 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado mezclando con un vortex y se midió la absorbencia en un espectrofotómetro a 480 nm contra un blanco de reactivos.

- Las lecturas se interpolaron en la curva patrón previamente elaborada siguiendo el procedimiento anterior con glucosa como referencia, en concentración de 0 a 80 μg .

5. PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

Con el propósito de concentrar las muestras y aumentar su pureza, las enzimas obtenidas por filtración en gel se precipitaron con sulfato de amonio sólido, que se añadió de manera gradual (precipitación fraccionada). A una concentración elevada de la sal se elimina el agua de hidratación de las moléculas proteicas reduciendo su solubilidad, por lo que la proteína precipita de la solución, sin perder su conformación nativa (18).

Procedimiento.

El sulfato de amonio agregado a fin de alcanzar la saturación deseada se calculó de tablas de referencia, considerando que para precipitar una solución de proteínas al 100% de saturación se requieren 767 g/l.

- La precipitación de la proteína se observó hasta alcanzar una saturación del 100%.
- La solución precipitada se mantuvo en reposo toda la noche y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm a 4 °C por 30 minutos.
- Las enzimas precipitadas se resuspendieron en solución salina 0.85% y se dializaron exhaustivamente contra esta misma solución, hasta obtener una prueba de sulfatos negativa. Esta prueba consiste en colocar en un tubo de ensaye volúmenes iguales de cloruro de bario al 1% y de la solución en que se dializaron las enzimas. Si hay presencia de sulfato de amonio éste reacciona con el cloruro de bario y forma sulfato de bario insoluble que precipita y en

turbia la solución, indicando una prueba positiva.

Las enzimas purificadas y concentradas mediante el procedimiento anterior se emplearon para realizar el estudio electrofo_urético en gel de poliacrilamida.

6. OBTENCION DE HEMISFERICINA DIALIZABLE (H-D) Y PINGUINAINA DIALIZABLE (P-D).

Las soluciones de las enzimas precipitadas con sulfato de amonio se dializaron contra amortiguador de citratos-mercurial 0.02 M pH 5.5, de la siguiente manera:

- Bolsas de diálisis conteniendo 15 ml de solución de las enzimas (3mg/ml) se sumergieron en 10 ml de amortiguador, sacándose inmediatamente, se considera este tiempo como tiempo cero.
- A continuación se sumergieron nuevamente los sacos de diálisis en el mismo volumen de amortiguador, realizando cambios a las 12, 24 y 48 hrs.
- Posteriormente a cada cambio de amortiguador se le determinaron proteínas y actividad proteolítica.

7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

El gel de poliacrilamida es un soporte con gran estabilidad química y mecánica, y gran transparencia, que proporciona una alta pureza analítica y permite el análisis y la separación de mezclas de proteínas. En la electroforesis convencional (PAGE) la separación depende de la carga, tamaño y forma de las moléculas. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE) permite la separación de subunidades proteicas y la determinación de sus pesos moleculares.

Es especialmente útil en el análisis de muestras con componentes múltiples así como en sistemas de subunidades de proteínas virales, membranas, ácidos nucleicos y enzimas difíciles de disociar por otros medios.

Las proteínas en solución en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol adquieren una carga negativa al ser recubiertas por moléculas del detergente aniónico SDS y simultáneamente sus puentes disulfuro se rompen, lo que permite la disociación de sus subunidades al desplegarse cada una de las cadenas polipéptidicas que las constituyen. Así, cuando una proteína tratada de esta forma es sometida a SDS-PAGE, su velocidad de migración dependerá básicamente de la masa de la partícula SDS-polipéptido, proporcionando el campo eléctrico la fuerza impulsora necesaria para el desplazamiento de la proteína o de sus subunidades.

El efecto tamizador de los geles es un factor importante en la separación ya que la densidad de la malla o red del gel (tamaño del poro) puede variarse al variar la concentración de acrilamida y metilenobisacrilamida en un amplio rango, permitiendo la separación de proteínas de muy diferentes tamaños.

El cálculo del peso molecular se realiza al comparar la movilidad electroforética de una proteína con la de proteínas de referencia de peso molecular conocido (marcadores) (12, 17, 18, 38).

Soluciones.

A.- Acrilamida-bis 30%:0.8.

Disolver 30 g de acrilamida y 0.8 g de N,N'metilenobisacrilamida en agua destilada y aforar a 100 ml. Filtrar con papel Whatman #1 y mantener a 4 °C en frasco ámbar.

B.- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8.

Disolver 18.15 g de tris base en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N y aforar a 100 ml.

C.- Tris-HCl 0.5 M pH 6.8.

Disolver 3.0 g de tris base en 25 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl 2 N y aforar a 50 ml.

D.- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.

E.- Persulfato de amonio (PSA) al 10%.

F.- N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

G.- Amortiguador de muestra.

Mezclar 10 ml de tris-HCl pH 6.8, 10 ml de glicerol, 2 ml de azul de bromofenol al 0.1% y 18 ml de agua destilada. Para SDS-PAGE agregar 10 ml de SDS 10% y 1.0 ml de 2-mercaptoetanol.

H.- Amortiguador de corrimiento.

Disolver 15 g de tris base y 72 g de glicina en agua destilada. Aforar a 5 litros, verificar que el pH sea 8.3. Para ser utilizado en SDS-PAGE agregar 5 g de SDS.

I.- Solución fijadora para proteínas.

Mezclar 400 ml de metanol con 70 ml de ácido acético y aforar a 1 litro con agua destilada. Guardar en frasco ámbar.

J.- Solución fijadora para glicoproteínas.

70 ml de ácido acético se aforan a 1 litro con agua destilada.

K.- Solución para tinción de proteínas.

Disolver 1.25 g de azul brillante de Coomassie en 454 ml de metanol al 50%, agregar 46 ml de ácido acético. Agitar durante 30 minutos y filtrar.

L.- Solución para tinción de glicoproteínas (Reactivo de Schiff).

Disolver 1 g de fuscina básica en 200 ml de agua destilada en ebullición, agitar por 5 minutos. Cuando esta solución se encuentre a 50 °C filtrar y añadir al filtrado 20 ml de HCl 1 N. Enfriar a 25 °C y añadir 1 g de metabisulfito de sodio o potasio, dejar en reposo durante 12 a 24 hr en la obscuridad.

Agregar 2 g de carbón activado y agitar por un minuto. Filtrar y guardar en frasco ámbar.

M.- Solución desteñidora para protefinas.

Mezclar 300 ml de etanol con 200 ml de ácido acético y aforar a 2 litros con agua destilada.

N.- Solución desteñidora para glicoprotefinas.

100 ml de ácido acético se aforan a un litro con agua destilada.

N.- Gel de separación, concentración de 11.5%.

En un matraz kitazato se mezclan 11.5 ml de acrilamida-bis 30%:0.8, 7.5 ml de tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y 10.55 ml de agua destilada. Desgasificar con vacfo por 3 a 5 minutos. Agregar 0.05 ml de PSA al 10% y 10 μ l de TEMED, mezclar suavemente y aplicar de inmediato a las placas de vidrio. Para ser utilizado en SDS-PAGE agregar 0.6 ml de SDS al 10%.

O.- Gel de concentración.

Mezclar 2.5 ml de acrilamida-bis 30%:0.8, 3.75 ml de tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y 8.55 ml de agua destilada. Desgasificar con vacfo por 3 a 5 minutos y agregar 0.05 ml de PSA 10% y 7.5 μ l de TEMED, mezclar suavemente y aplicar inmediatamente a las placas. Para SDS-PAGE agregar 0.15 ml de SDS 10%.

Procedimiento.

Se utilizó el equipo de electroforesis vertical LKB 2001.

- Todos los artefactos y materiales se lavaron con detergente, agua corriente y agua destilada. Las placas de vidrio y los separadores se lavan además con metanol u otro solvente orgánico para eliminar los residuos de grasa.
- Se sobrepusieron dos placas de vidrio (180 x 160 x 3 mm) colocando entre ellas en los extremos laterales dos separadores (1.5 mm de grosor), montándose sobre su base y verificando que los bordes inferiores estuvieran perfectamente sellados para evitar fugas al momento de colocar la solución del gel separador. Se nivela la base sobre una superficie plana.
- Entre ambos vidrios queda un espacio de 1.5 mm donde se deposita la solución del gel separador, que se prepara momentos antes de su aplicación.
- En la parte superior se estratifica agua destilada para evitar que se deshidrate el gel y facilitar su polimerización horizontal. Dejar polimerizar durante dos horas.
- Se elimina por decantación el agua y se seca con papel filtro.
- Se coloca un peine de diez pozos (los espacios ocupados por los pies del peine serán los sitios de aplicación de las muestras).
- A continuación se prepara el gel concentrador y se aplica en el espacio libre entre el gel de separación y el peine, hasta el borde superior de las placas. Dejar polimerizar durante una hora.
- Transcurrido este tiempo, se retira el peine y los sitios de aplicación se enjuagan varias veces con agua destilada.

Preparación de las muestras.

SDS-PAGE. Las muestras (enzimas) se mezclaron con un volumen igual de amortiguador de muestra y se incubaron siguiendo un pa-

trón de variaciones de temperatura y tiempo de incubación.

- Marcadores para SDS-PAGE. Las muestras de las proteínas de pesos moleculares conocidos, y que sirven como marcadores se disolvieron en amortiguador de muestra para SDS-PAGE y se incubaron a 100 °C durante un minuto.

PAGE convencional. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de amortiguador de muestra, que permite que corran a través del gel y el colorante que contiene nos facilita la observación visual del desplazamiento del frente durante el corrimiento.

Electroforesis.

- Colocar la cámara superior sobre las placas de vidrio que contienen los geles, verificando que esté bien sellada.
- Colocar 750 ml de amortiguador de corrimiento en la cámara.
- Depositar las muestras en los pozos, utilizando para ello microjeringas Hamilton de 100 µl.
- La cantidad de muestra aplicada en los corrimientos efectuados fue de 20 µl para Hemisfericina (2.5 mg/ml) y de 10 µl para Pingüinaína (5 mg/ml); de los marcadores (SDS-PAGE) se aplicó en cada caso 20 µl (1 mg/ml).
- Colocar en la cámara inferior el refrigerante y conectarlo a un recirculador de agua, ajustado a temperatura constante de 10 °C.
- Depositar aproximadamente 3.5 litros de amortiguador de corrimiento dentro de la cámara inferior.
- Retirar de la base la cámara superior con los geles y colocarla dentro de la cámara inferior, verificando que no existan burbujas de aire en la base de los geles, que alterarían el flujo de la corriente.

- Colocar la tapa de cámara y conectar el sistema a una fuente de poder (Bio-rad 500).
- Se utilizó una corriente constante de 30 mA por placa, con un tiempo de corrimiento de 4 hr; el corrimiento se detuvo cuando el frente llegó aproximadamente un cm por arriba del límite inferior de los geles.
- Una vez finalizado el corrimiento se desconecta el sistema y se separan las placas de vidrio para obtener los geles.

Fijación y tinción para proteínas.

- Los geles se depositaron en un recipiente con solución fijadora manteniéndose así durante toda la noche.
- Se transfieren los geles a otro recipiente con colorante para su tinción durante 2 hr.
- Se elimina el colorante, destiñendo con cambios frecuentes de solución desteñidora, hasta que las bandas de proteína se observen perfectamente definidas y el resto del gel este transparente.

Fijación y tinción para glicoproteínas.

- Los geles se depositan en un recipiente con solución fijadora y se dejan durante una hora a temperatura ambiente.
- La solución fijadora se elimina sustituyéndola con una solución acuosa de ácido peryódico al 0.2%, en donde permanecen durante 45 minutos a 4 °C.
- Inmediatamente después los geles se transfieren al reactivo de Schiff y se mantienen en refrigeración durante 45 minutos.
- Se elimina el colorante y se destiñen los geles con cambios frecuentes de solución desteñidora.
- Para la retención de las bandas coloreadas se recomienda mante-

ner los geles en refrigeración.

Determinación del peso molecular.

Al observar las bandas claramente definidas en los geles, se midió la distancia de migración de las bandas desde el inicio del gel separador hasta el centro de la banda, la distancia de migración se expresa en cm, este valor se divide entre la distancia total de migración del azul de bromofenol del frente obteniendo así la movilidad relativa (R_f) de las bandas de las muestras problema. Estos valores se interpolan en una curva patrón previamente elaborada graficando los valores de R_f de los marcadores en el eje de las abscisas y los logaritmos de sus pesos moleculares en el eje de las ordenadas.

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de la banda de proteína}}{\text{distancia de migración del frente}}$$

El estudio electroforético de ambas enzimas se realizó con las siguientes variables:

A. Electroforesis convencional (PAGE).

B. En presencia de SDS y 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE).

a) con diferentes temperaturas de incubación 40, 60, 85 y 100 °C, y tiempo de incubación de 10 minutos en todos los casos.

b) con diferentes tiempos de incubación de 0 a 30 minutos (variaciones de 5 minutos), a una temperatura de 85 °C.

c) diferente temperatura de incubación de 65 a 85 °C (variaciones de 5 °C), y tiempo de incubación de 10 minutos.

d) con incubación de las muestras durante 60 minutos a 100 °C.

C. En presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol.

a) con diferentes temperaturas de incubación 40, 60, 85 y 100 °C, y un tiempo de incubación de 10 minutos en todos los casos.

b) con diferente tiempo de incubación de 0 a 30 minutos (variaciones de 5 minutos) y una temperatura de 85 °C.

Determinación de actividad proteolítica de las muestras separadas por electroforesis.

Para esta prueba se corrieron ambas enzimas en PAGE convencional, una vez terminada la corrida se cortaron tiras del gel, contenido cada una un solo tipo de banda proteica. Cada tira, sin fijar ni teñir, se colocó en 4 ml de amortiguador tris-Cl 0.05 M pH 7.8 durante 30 minutos a fin de extraer toda la enzima, y posteriormente se determinó la actividad enzimática del extracto sobre Azure.

8. PRUEBAS INMUNOQUIMICAS.

8.1. Obtención de antisueros.

Las enzimas obtenidas por filtración molecular en gel se mezclaron con adyuvante completo de Freund, y se inmunizaron en conejos de la cepa Nueva Zelanda.

Las inmunizaciones se efectuaron semanalmente con 600 µg de cada enzima, resuspendidas en solución salina 0.85% y mezcladas volumen a volumen con adyuvante completo de Freud. Se aplicaron por vía subcutánea.

Después de 4 inmunizaciones se sangraron los conejos de la vena marginal de la oreja, permitiéndose la coagulación espontánea de la sangre y separando el suero con pipeta Pasteur.

Los sueros se mantuvieron a -40 °C hasta su uso.

8.2. Doble inmunodifusión.

La presencia de anticuerpos se estimó precipitando el antígeno (enzimas) con el antisuero específico, por doble inmunodifusión, al difundir ambos en una capa semisólida (tal como el gel de agar), formándose bandas de precipitación en el sitio donde la concentración es óptima para los reactantes.

Se realizó siguiendo la técnica descrita por Ouchterlony (26).
Soluciones.

A.- Agar al 1.5%.

Disolver por calentamiento 1.5 g de agar purificado en 100 ml de solución salina 0.85%. Añadir 1 ml de azida de sodio 1%.

B.- Solución teñidora.

Disolver 500 mg de amido negro en 100 ml de ácido acético al 5%.

C.- Solución desteñidora.

Acido acético al 3%.

D.- Solución preservadora.

Mezclar 10 ml de glicerol con 90 ml de solución salina 0.85%, adicionada de mercurial.

Procedimiento.

- En cajas de Petri de 10 cm de diámetro colocadas sobre una superficie totalmente horizontal, se depositaron 20 ml de la solución de agar en ebullición, y se dejó solidificar.
- Se realizaron 5 perforaciones en el gel, un pozo central y cuatro pozos periféricos equidistantes.
- En el pozo central se colocó el antisuero, que se dejó difundir durante 24 hr.
- En los pozos periféricos se depositaron los antígenos (Hemisfe-

ricina, Hemisfericina Dializable , Pinguinaína y Pinguinaína Dializable).

- Las cajas de Petri se mantuvieron en un ambiente húmedo a temperatura ambiente.

- Se examinó periódicamente el desarrollo de las bandas de precipitación y cuando este fue óptimo se lavaron exhaustivamente con solución salina-mercurial, con la finalidad de remover las proteínas no reaccionantes.

- A continuación se mantuvo el gel en solución preservadora durante tres días.

- El gel se retiró de la caja de Petri, se colocó sobre una placa de vidrio y se secó con papel filtro a temperatura ambiente.

- Posteriormente se tiñó con la solución de amido negro 0.05% durante 20 minutos y el exceso de colorante se eliminó con cambios frecuentes de solución desteñidora, hasta observar claramente las bandas de precipitación.

- Las placas se secaron con aire en posición vertical.

RESULTADOS.

I. Aislamiento y purificación de las enzimas.

El jugo de los frutos de ambas Bromeliaceas es de un color amarillo. La tabla 1 muestra que el peso promedio del fruto es mayor para B. pinguin obteniéndose por lo tanto mayor cantidad de jugo por cada fruto, los valores de pH son muy similares (ácidos) en ambos casos. La cantidad de azúcares totales es mayor para B. pinguin así como la cantidad de protefmas, mientras que la concentración de azúcares reductores es mayor para B. hemisphaerica.

Cromatografía de exclusión molecular.

En el perfil de elución en Sephadex G-75 (fig. 1) que presenta el jugo de B. pinguin, se observan 2 picos. El pico I, que sale dentro del volumen de exclusión, con escasa actividad enzimática sobre caseína, y el pico II, con elevada actividad enzimática.

El perfil de elución en Sephadex G-75 (Fig. 2) para el jugo de B. hemisphaerica muestra 3 picos. El pico I que sale dentro del volumen de exclusión con alta concentración de azúcares totales (tabla 2) y escasa actividad enzimática sobre azure, el pico II, con elevada actividad enzimática y menor concentración de azúcares totales, y el pico III constituido principalmente por un pigmento amarillo.

En los perfiles cromatográficos de estas proteasas se observa que el segundo pico de cada una de ellas es el que presenta la mayor actividad enzimática. Son estos picos los utilizados para la realización del presente trabajo y que denominamos enzimas filtradas.

TABLA 1.

Algunas características del fruto y jugo total de Bromelia hemisphaerica y B. pinguin.

	<u>B. hemisphaerica.</u>	<u>B. pinguin</u>
Peso promedio por fruto	22.0 g	32.9 g
Volumen promedio de jugo por fruto.	10.0 ml	13.0 ml
pH promedio de jugo.	3.2	3,5
Proteína en jugo.	6.8 mg/ml	8.0 mg/ml
Azúcares totales en jugo.	125.6 mg/ml	155.0 mg/ml
Azúcares reductores.	29.0 mg/ml	22,0 mg/ml

TABLA 2.

Azúcares totales de los picos obtenidos por filtración en gel.

	<u>B. hemisphaerica</u>	<u>B. pinguin</u>
Pico 1.	5.0 mg/ml.	No determinado
Pico 2	2.5 mg/ml	3.1 mg/ml
Dializables.	0.065 mg/ml	0.1 mg/ml

TABLA 3

Actividad específica de ambas enzimas sobre Hide Powder Azure.

	<u>B. hemisphaerica</u>	<u>B. pinguin</u>
	Absorbencia/min/ml.	
Jugo total	0.12	0.12
Filtración en gel	0.5	0.6
Precipitadas con sulfato de amonio.	0.7	0.9

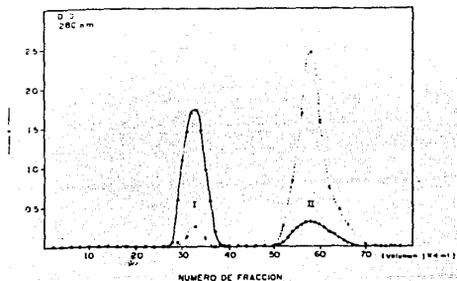


Figura 1. Perfil cromatográfico del jugo dializado de *E. pinguin* en Sephadex G-75. Se empleó una columna de 2.5 cm x 100 cm con flujo constante de 35 ml/hr. Se colectaron fracciones de 4 ml. Como eluyente se utilizó amortiguador de citratos 0.02 M pH 5,5 con acetato fenil mercurico. La línea continua indica absorbancia a 280 nm. y la línea discontinua la D.O. de la actividad enzimática sobre caseína.

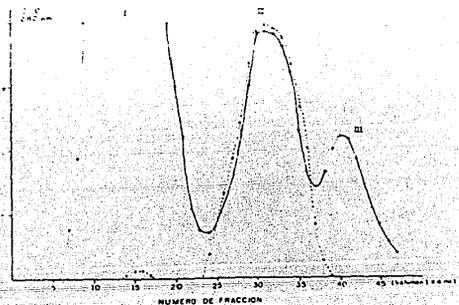


Figura 2. Perfil cromatográfico del jugo dializado de *E. hemisphaerica* en Sephadex G-75. Se empleó una columna de 2.5 x 22 cm con flujo constante de 34 ml/hr. Se colectaron fracciones de 4 ml. Como eluyente se utilizó amortiguador de citratos 0.02 M pH 5,5 con acetato fenil mercurico. La línea continua indica absorbancia a 280 nm. y la línea discontinua la D.O. de la actividad enzimática sobre azure.

Actividad específica.

La tabla 3 muestra los valores de la actividad específica sobre azure de los jugos, de las enzimas filtradas y de las precipitadas con sulfato de amonio al 100% de saturación, observándose que la actividad específica es mayor en todos los casos para B. pinguin.

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PAGE convencional. Los corrimientos electroforéticos realizados en ausencia de agentes reductores y desnaturalizantes, muestran 3 bandas para Hemisfericina y 2 bandas para Pinguinafna (fig. 3) cada una de ellas con actividad enzimática (tabla 4). La tinción para glicoproteínas con el reactivo de Schiff fue positiva para todas las bandas observadas en la tinción para proteínas.

SDS-PAGE. En presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

a) Con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C y 10 minutos de incubación en todos los casos.

Las muestras de Hemisfericina incubadas a 40 y 60°C se resuelven en 9 bandas, y las incubadas a 85 y 100°C sólo en 3, con pesos moleculares mayores para las bandas obtenidas a 40 y 60°C, que los que se obtienen a 85 y 100°C (fig. 4, tabla 5).

Las muestras de Pinguinafna incubadas a 40 y 60°C se resuelven en 5 bandas, mientras que las incubadas a 85 y 100°C sólo en 2, con pesos moleculares menores a los que presentan las bandas obtenidas a 40 y 60°C (fig. 5, tabla 6).

b) Con diferentes tiempos de incubación de 5 a 30 minutos (intervalos de 5 minutos) y temperatura de incubación de 85°C.

Para Hemisfericina obtuvimos un patrón de 3 bandas en todos los

H H H H P P P P

Figura 3. PAGE convencional de Hemisfericina(H)
y Pinguinaína (P).

TABLA 4.

Actividad enzimática de las bandas de Hemisfericina y Pinguinaína, obtenidas en PAGE convencional.

Hemisfericina	Absorbencia/min/ml.
Banda 1	0.075
Banda 2	0.073
Banda 3	0.070
Pinguinaína	
Banda 1	0.080
Banda 2	0.10

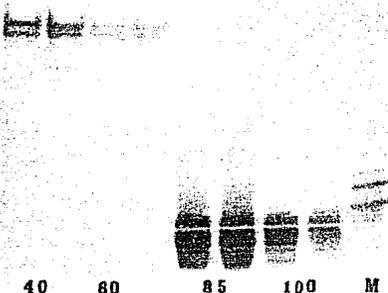


Figura 4. SDS-PAGE de Hemisfericina con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C y 10 minutos de incubación. (M) marcadores de peso molecular. Anhidrasa carbónica, 29,000; trypsinogeno, 24,000; lactoglobulina, 18,400; lactoalbúmina, 14,200.

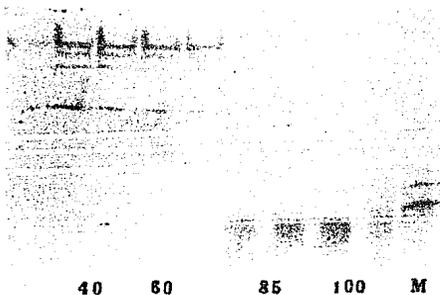


Figura 5. SDS-PAGE de Pinguinafina con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C, y 10 minutos de incubación. (M) marcadores de peso molecular. Anhidrasa carbónica, 29,000; trypsinogeno, 24,000; lactoglobulina, 18,400; lactoalbúmina, 14,200.

Tabla 5. Pesos moleculares de las muestras de Hemisfericina incubadas a 40, 60, 85 y 100°C. SDS-PAGE.

Temperatura de incubación.	Pesos moleculares.
40 y 60°C	95,400
	83,100
	75,800
	70,700
	54,900
	50,100
	39,800
	33,200
85 y 100°C	30,200
	10,500
	9,000
	8,000

Tabla 6. Pesos moleculares de las muestras de Pinguinafina incubadas a 40, 60, 85 y 100°C. SDS-PAGE.

Temperatura de incubación.	Pesos moleculares.
40 y 60°C	75,800
	72,400
	58,800
	37,100
	32,200
85 y 100°C	10,000
	8,000



Figura 6. SDS-PAGE de Hemisfericina con diferente tiempo de incubación de 5 a 30 minutos. A 85°C. (A) temperatura ambiente. (M) marcadores de peso molecular. Anhidrasa carbónica, 29,000; lactoalbúmina, 14,200.

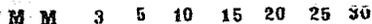


Figura 7. SDS-PAGE de Pinguinaína con diferente tiempo de incubación de 5 a 30 minutos. A 85°C. (A) temperatura ambiente. (M) marcadores de peso molecular. Albúmina de huevo, 45,000; anhidrasa carbónica, 29,000; lactoalbúmina, 14,200.

tiempos de incubación, similar al patrón obtenido a 85°C y 10 minutos de incubación (fig. 6).

Para Pinguinaína observamos un patrón de 2 bandas para todos los tiempos de incubación, similar al patrón obtenido a 85°C y 10 minutos de incubación (fig. 7).

c) Con temperatura de incubación de 65 a 85°C , con variaciones de 5°C , y un tiempo de incubación de 10 minutos.

En Hemisfericina se observa desde 65°C el mismo patrón de 3 bandas que presentan las muestras incubadas a 85°C (fig. 8).

Mientras que para Pinguinaína a 65, 70, y 75°C hay un mismo patrón de 3 bandas con mayor peso molecular que las que se obtienen a 80 y 85°C (fig. 9, tabla 7).

d) Con incubación de las muestras a 100°C durante 60 minutos. En la figura 10 se observa tanto para Hemisfericina como para Pinguinaína una sola banda con un peso molecular aproximado de 8,300 daltones.

Se determinó la actividad enzimática de ambas muestras en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura de incubación empleadas en los corrimientos electroforéticos, observándose que la actividad específica de las muestras disminuye al aumentar la temperatura (tabla 8).

SDS-PAGE. En presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol.

a) Con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C , y tiempo de incubación de 10 minutos.

En Hemisfericina observamos el mismo patrón electroforético de 4 bandas para las temperaturas de 40 y 60°C , para 85 y 100°C el patrón es de 6 bandas con pesos moleculares menores al que poseen las



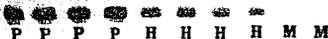
65 70 75 80 85 M M

Fig. 8. SDS-PAGE de Hemisfericina con diferente temperatura de 65 a 85°C. Con 10 minutos de incubación. (M) Albúmina de huevo, 45,000; anhidrasa carbónica, 29,000.



65 70 75 80 85 M M

Fig. 9. SDS-PAGE de Pinguinafina con diferente temperatura de 65 a 85°C. Con 10 minutos de incubación. (M) Anhidrasa carbónica, 29,000.



P P P P H H H H M M

Fig. 10. SDS-PAGE de Hemisfericina y Pinguinafina con incubación a 100°C durante una hora. (M) ASB, 66,000; lactoalbúmina, 14,200.

Tabla 7. Pesos moleculares de las muestras de Pinguinafna incubadas de 65 a 85°C., durante 10 minutos. SDS-PAGE.

Temperatura de incubación.	Peso molecular.
65, 70 y 75°C.	52,400
	46,700
	38,000
80 y 85°C.	10,000
	8.120

Tabla 9. Pesos moleculares de las muestras de Hemisfericina incubadas a 40, 60, 85 y 100°C durante 10 minutos. PAGE en presencia de SDS sin 2-mercaptoetanol.

Temperatura de incubación.	Peso molecular.
40 y 60°C	75,800
	63,000
	56,200
	50,100
85 y 100°C	17,700
	15,800
	14,700
	14,100
	8,300
	8,100

Tabla 8. Valores de Actividad específica para las muestras de Hemisfericina y Pinguinafna en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

Temperatura de incubación.	Actividad específica. Absorbencia/mim/mg.	
	H	P
40°C	0.82	0.88
60°C	0.47	0.57
65°C	0.21	0.32
70°C	0.15	0.24
75°C	0.14	0.12
80°C	0.13	0.10
85°C	0.06	0.075
100°C	0.06	0.06

Tabla 10. Pesos moleculares de las muestras de Pinguinafna incubadas a 40, 60, 85 y 100°C durante 10 minutos. PAGE en presencia de SDS sin 2-mercaptoetanol.

Temperatura de incubación.	Peso molecular.
40 y 60°C	63,000
	53,700
	37,100
85 y 100°C	15,100
	13,100
	12,800
	8,300
	8,000

4 bandas en que se desarrollan las muestras incubadas a 40 y 60°C (tabla 9).

Las muestras de Pinguinafina incubadas a 40 y 60°C, desarrollan 3 bandas y las de 85 y 100°C 5 bandas (fig. 12), estas últimas con menor peso molecular al que poseen las bandas de 40 y 60°C (tabla 10).

b) Con diferente tiempo de incubación de 0 a 30 minutos, y temperatura de incubación de 85°C (se considera como tiempo cero las muestras a temperatura ambiente).

Para Hemisfericina a tiempo cero de incubación, se observan 4 bandas semejante al patrón que se obtuvo a 40 y 60°C con 10 minutos de incubación; y un patrón electroforético de 6 bandas para todas las muestras incubadas desde 5 a 30 minutos (fig. 13).

Las muestras de Pinguinafina a tiempo cero de incubación, presenta 3 bandas, similares al patrón que se obtuvo a 40 y 60°C y 10 minutos de incubación, y el mismo patrón electroforético de 5 bandas desde 5 a 30 minutos de incubación (fig. 14).

En los corrimientos electroforéticos anteriores se observa un patrón electroforético similar para ambas enzimas ya que el número de bandas en las que se desarrollan no disminuye conforme se aumenta la temperatura de incubación a diferencia del comportamiento observado en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

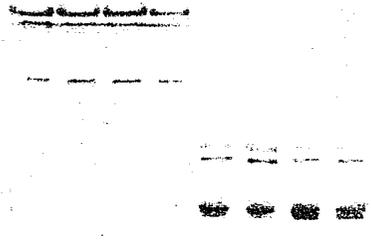
3, Cinética de salida de H-D y P-D.

En la figura 15 se esquematiza la cinética de diálisis de ambas enzimas, observandose gran similitud. Las formas dializables de la Hemisfericina y Pinguinafina (H-D, P-D) obtenidas, se concentraron por evaporación a temperatura ambiente.



40 60 85 100

Figura 11. PAGE en presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol de Hemisfericina con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C. y 10 minutos de incubación.



40 60 85 100

Figura 12. PAGE en presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol de Pinguinaína con diferente temperatura 40, 60, 85 y 100°C. Con 10 minutos de incubación.

A 5 10 15 20 25 30 M

Figura 13. PAGE en presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol de Hemisfericina con diferente tiempo de incubación de 5 a 30 minutos, con variaciones de 5 minutos. A 85°C. (A) temperatura ambiente. (M) Anhidrasa carbónica, 29,000; lactoalbúmina, 14,200.

A 5 10 15 20 25 30 M

Figura 14. PAGE en presencia de SDS y sin 2-mercaptoetanol de Pinquinafina con diferente tiempo de incubación de 5 a 30 minutos con variaciones de 5 minutos. A 85°C. (A) temperatura ambiente. (M) Anhidrasa carbónica, 29,000; lactoglobulina, 18,400; lactoalbúmina, 14,200.

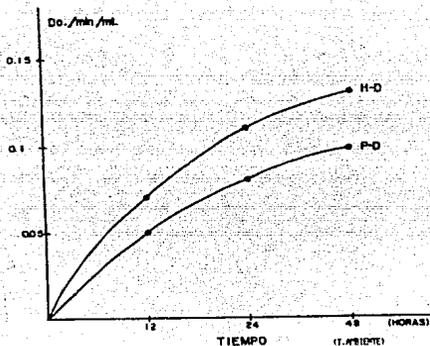


Figura 15. Cinética de salida de Hemisfericina y Pinguinafina dializables a temperatura ambiente. A partir de 0.7 y 0.88 unidades de D. O. iniciales para Hemisfericina y Pinguinafina respectivamente.

4. Pruebas inmunoquímicas.

Doble inmunodifusión.

Las enzimas obtenidas por filtración en gel y sus formas dializables, por doble inmunodifusión contra sueros homólogos y heterólogos dan una sola banda de precipitación tanto para Hemisfericina como para Pinguinafina y sus formas dializables, observándose gran similitud puesto que tanto los sueros homólogos como heterólogos las reconocen prácticamente de igual forma. Sin embargo, las enzimas aunque muy semejantes, no son iguales, es posible observar un pequeño espólon de identidad parcial (figs. 16, 17).

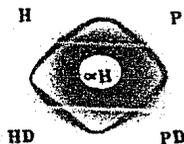


Figura 16. Doble inmunodifusión. α H, antisuero Hemisfericina. H, Hemisfericina. H-D, Hemisfericina dializable. P, Pinguinafina. P-D, Pinguinafina dializable.

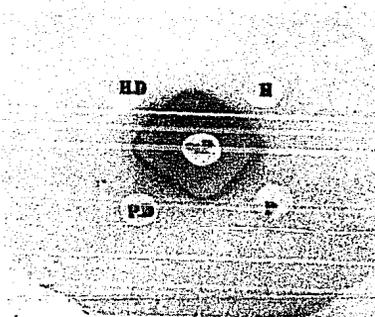


Figura 17. Doble inmunodifusión. α P, antisuero Pinguinafina. P, Pinguinafina. P-D, Pinguinafina dializable. H, Hemisfericina. H-D, Hemisfericina dializable.

DISCUSION.

La obtención y purificación de las proteasas Hemisfericina y Pinguinaína se realizó mediante procesos rápidos y reproducibles como son: la cromatografía de exclusión molecular y la precipitación con sales. Como ha sido reportado para ambas especies, el jugo de ambas bromeliáceas presenta un alto contenido de proteínas, azúcares totales y azúcares reductores. B. hemisphaerica rinde menor cantidad de proteína, aunque presenta mas azúcares reductores, mientras que B. pinguin proporciona un alto contenido de proteínas, mayor actividad proteolítica y menor cantidad de azúcares reductores tanto para los jugos como para las formas filtradas y precipitadas.

Es interesante comparar la cantidad de proteína que se obtiene de otras fuentes vegetales con las obtenidas de los frutos de B. pinguin y B. hemisphaerica (8 g/l y 6.8 g/l respectivamente) de donde se obtiene una mayor cantidad de la que se extrae a partir de los frutos correspondientes para surtir la demanda comercial de proteasas; así, de Carica papaya (de donde se extrae la papaína) se obtiene un rendimiento del 0.01% de enzima por peso de fruto verde (16), de Ananas comesus (de donde se extrae la bromelaina) se obtiene de 3.0 a 3.5 g/l de jugo. Esta situación deberá considerarse desde el punto de vista tecnológico a fin de sustituir las fuentes comerciales de importación de proteasas.

El perfil de elución de los jugos de ambas bromeliáceas presenta dos picos con actividad proteolítica, el primero es un componente de peso molecular alto y sale con el volumen de exclusión, tiene escasa actividad enzimática. El segundo tiene approxi

madamente el 90% de la actividad enzimática total. Existe para E. hemisphaerica un tercer pico sin actividad enzimática, no analizado en este trabajo y que está constituido fundamentalmente por un pigmento amarillo. Estos resultados son semejantes a los reportados previamente para ambas enzimas (10, 32).

Al someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida las enzimas purificadas por filtración en gel y precipitadas con sulfato de amonio al 100% de saturación, la Hemisfericina se resuelve en 3 bandas catiónicas y la Pinguinaína en 2, todas con actividad proteolítica; resultados comparables a los previos, ya que la gran mayoría de las proteasas vegetales son catiónicas (14). Sin embargo, Córdoba y cols. (9) reportan un mayor número de bandas (formas moleculares), que las descritas en este trabajo. En un intento por obtener resultados similares a nuestros reportes previos se realizaron diversos ensayos variando las condiciones de corrida (pH, concentración del gel, fuerza iónica del amortiguador, corriente, etc.), sin éxito. Consideramos como una explicación posible a esta diferencia el hecho de que en los corrimientos previos se trabajó con las enzimas recién filtradas, mientras que en nuestros experimentos utilizamos las muestras mantenidas a -40 °C durante un año, y precipitadas con sulfato de amonio; así Takahashi y cols. (31) reportaron para Phaseolus vulgaris que la lectina obtenida de semillas almacenadas difiere en su patrón de agregación respecto a la lectina aislada de semillas recién cosechadas, resultados similares a los que obtuvimos y que por lo tanto apoyan el modelo molecular propuesto por nuestro grupo de trabajo (9).

Se demostró por tinción específica que las formas moleculares enzimáticas son de naturaleza glicoproteica, con lo que se confirma que la presencia de azúcares (reportada en estudios anteriores) se encuentra asociada a las enzimas (33). Recientemente se determinaron azúcares aminados en estas formas enzimáticas y cuando menos 9 componentes activos separados por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex (37), separación que con resultados muy similares fue reportada previamente por nuestro grupo (2). Suponemos que la presencia de azúcares aminados en proporción diferente en cada una de las formas explicaría la diferencia en movilidad electroforética de las mismas. Por otro lado, durante la precipitación con sulfato de amonio sólido la solución de proteínas modificó sustancialmente su fuerza iónica, condición que consideramos modificó la asociación de las enzimas.

La electroforesis con SDS y 2-mercaptoetanol a temperatura ambiente, 40 y 60 °C se resuelve en 9 bandas para Hemisfericina y en 5 para Pinguinaína. El número de bandas disminuye para Hemisfericina a partir de 65°C, hasta que a 100 °C se obtiene una banda. Para Pinguinaína el número de bandas igualmente va disminuyendo al aumentar la temperatura de incubación salvo que se observa este fenómeno a mayor temperatura (75 °C) y nuevamente a 100°C se obtiene una sola banda. Este comportamiento sugiere mayor estabilidad térmica de Pinguinaína que de Hemisfericina.

La tendencia a disminuir el número de bandas en las que se desarrollan las enzimas al aumentar la temperatura y el tiempo de incubación podría tentativamente explicarse si consideramos que los enlaces no covalentes que estabilizan las diversas formas

moleculares enzimáticas (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, atracciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, etc.) y enlaces covalentes (puentes disulfuro) se están rompiendo (disociando) para dar lugar a formas más sencillas, de menor peso molecular, siendo la más simple de estas la que posee un peso molecular de 8,300 daltones, lo que confirma lo reportado previamente para Hemisfericina y Hemisfericina Dializable (2).

Con base en la gran similitud existente entre estas enzimas, sus pesos moleculares también similares (25,000 para Pinguinaína y 24,000 para Hemisfericina) y analizando ahora el modelo propuesto (2) puede considerarse la posibilidad de que las diversas formas moleculares que se presentan se deban a asociaciones diferentes entre los monómeros de 8,000 daltones aproximados de peso molecular, siendo etapas intermedias del fenómeno de asociación-disociación, las formas obtenidas durante el tratamiento de las proteasas con diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Se descarta la probabilidad de que las bandas en que se resuelven las proteasas sean contaminantes y/o productos de autocatálisis de las enzimas, ya que las más sencillas de estas formas poseen actividad hidrolítica, como quedó demostrado en los experimentos de cinética de salida de H-D y P-D.

Por otro lado, durante su tratamiento con un agente desnaturalizante (SDS), el número de bandas no disminuye conforme aumenta la temperatura, sino por el contrario se incrementa, este fenómeno se explica si asumimos que una temperatura de 60 °C o menos no propicia la ruptura de todos los enlaces no covalentes termolábiles, y dado que los enlaces disulfuro no se rompen puesto

que no existe reductor, tentativamente podemos asumir que el número de bandas en que se resuelven las enzimas representarían las posibles formas de asociación de los monómeros de 8,300 daltones, dadas exclusivamente por puentes disulfuro. No creemos que las variadas formas que se evidencian tanto por PAGE convencional como SDS-PAGE y PAGE en presencia de SDS y sin reductor, sean producto de autocatálisis, puesto que por un lado la actividad enzimática no se presenta al pH natural del jugo (9), solo en presencia de un reductor (cisteína) y no sin pasar por alto además, que las enzimas se encuentran protegidas con acetato fenil mercurio, y que la salida de las formas dializables se efectuó en presencia de mercurial.

La presencia de una sola banda de precipitación tanto para Hemisfericina como para Pinguinaína y sus formas dializables que se obtiene por doble inmunodifusión con sueros homólogos nos muestra que dichas formas son iguales antigénicamente, mientras que la ligera diferencia obtenida con sueros heterólogos nos habla de la gran semejanza entre ambas especies, coherente con su gran cercanía filogenética.

Finalmente, es importante mencionar que el método de purificación empleado en este trabajo, basado en filtración en gel y precipitación con sales, es un método muy sencillo y económico de aislamiento y purificación de enzimas proteolíticas y que proporciona un alto rendimiento de las mismas.

CONCLUSIONES.

1. El jugo de los frutos de B. pinguin y B. hemisphaerica posee una elevada cantidad de enzimas, por lo que es una de las mejores fuentes de proteasas en la naturaleza.
2. Las enzimas Hemisfericina y Pinguinaína presentan gran similitud en cuanto a su patrón de purificación, ambas poseen la mayor actividad enzimática en el segundo pico del perfil cromatográfico en Sephadex G-75, y precipitan al 100% de saturación con sulfato de amonio, aparentemente sin contaminantes.
3. La electroforesis convencional en gel de poliacrilamida (pH 8.3) de las fracciones filtradas y precipitadas con sulfato de amonio resuelve 3 bandas para Hemisfericina y 2 para Pinguinaína, todas con actividad enzimática.
4. El empleo de sales en la purificación de estas proteasas modificó sustancialmente su fuerza iónica y por ende su asociación difiere de modelos previos.
5. Las diversas formas enzimáticas de Hemisfericina y de Pinguinaína son todas de naturaleza glicoprotéica.
6. La Pinguinaína y la Hemisfericina presentan formas dializables con actividad enzimática (P-D y H-D).
7. La electroforesis en presencia de SDS a diferentes temperaturas y tiempos de incubación para las dos enzimas da un número de bandas que disminuye al aumentar la temperatura, dando finalmente en ambas la forma más simple, de aproximadamente 8,300 daltones de peso molecular. Considerando etapas intermedias del fenómeno de asociación-disociación los patrones electroforéticos obtenidos en estas condiciones.

8. Ambas proteasas son inmunogénicas en el conejo.

9. La Hemisfericina y la Pinguinaína son antigénicamente muy similares.

10. Las formas dializables de ambas proteasas son iguales a las formas no dializables, ya que comparten los mismos determinantes antigénicos.

11. El modelo propuesto para Hemisfericina puede aplicarse a Pinguinaína ya que ambas presentan semejanzas en su purificación, comportamiento electroforético e inmunogénico y también presentan formas dializables con cinética de salida muy semejante.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abe, Y., Iwabuchi, M., and Shin-ichi I., 1971. Multiple forms in the subunit structure of concanavalin A. Biochem. and Biophys. Research Communications, 45 (5): 1271-1278.
2. Agundis, C., Reyes M., and Córdoba F., 1977. Hemisphaericin D, a dialysable and polymerizable protease found in Bromelia hemisphaerica. Experientia, 33: 867-869.
3. Asenjo, C. F. and Del Capella de Fernandez M., 1942. A new protease from Bromelia pinguin. Science, 95: 48-49.
4. Asenjo, C. F. and Del Capella de Fernandez M., 1945. Uses, preparation, and properties of pinguinain, the protein splitting enzyme of the Maya fruit. J. Agriculture. Univ. Puerto Rico, 29: 35-49.
5. Baker, J. G., 1889. Handbook of the Bromeliaceae. George Bell (ed.), London; págs.: 26-27.
6. Ball, A. D., 1941. Protein-digesting enzymes of papaya and pineapple. U.S. Dept. Agr. Circ., 631 págs.
7. Barret, A. J., 1980. Proteinases. Fed. Proc., 39: 39.
8. Cooreman, W. H., Scharpe, S., Demeester, J. and Lauwers A., 1976. Bromelain, biochemical and pharmacological properties. Pharm. Acta Helv., 51 (4): 73-98.
9. Córdoba F., Agundis C. and Reyes M., 1978. Una proteasa dializable y polimerizable descubierta en Bromelia hemisphaerica. Temas bioquímicos de actualidad. U.N.A.M. México; págs.: 405-413.
10. Cruz, M. T., Oliver del C. M., Del Castillo L. M., Castañeda A. M., 1974. Proteinases de plantas Mexicanas I. Determinación de pesos moleculares de proteinasas cisteínicas por concentración de grupos tioles. Rev. Lat. Quim., 5: 18-23.

11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., and Smith, J., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-359.
12. Fehrntom, H., Moberg, U., 1977. SDS and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. LKB application note 306: 1-15.
13. Garduño, R., Soriano, M., Chavez, E., Cruz, M.T., Del Castillo L. M., y Castañeda A. M., 1974. Proteinases de plantas Mexicanas II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas múltiples. *Rev. Lat. Quim.*, 5: 543-548.
14. Inagami, T., and Murachi, T., 1963. Kinetic studies of Bromelain catalysis. *Biochemistry*, 2: 1439- 1444.
15. Kimmel, J. R. and Smith, F.L., 1957. The properties of papain. *Advances in Enzymology*, 19: 267-334.
16. Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30: 292-310.
17. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the head bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
18. Lehninger, A. L., 1981. *Proteínas: Purificación y caracterización* En: *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2a. ed. Omega, Barcelona; Págs. 161-187.
19. Leon, A. F., 1977. Estudios de la Hemisfericina en cromatografía de intercambio iónico (carboximetilcelulosa), así como en electroforesis en gel de poliacrilamida y algunos estudios bioquímicos. Tesis de licenciatura, E. N. C. B., I. P. N.; 60 págs.
20. López, L. F., 1984. Componentes proteolíticos de la Pinguinafna. Tesis de licenciatura, Fac. de Química, U.N.A.M. - 30 págs.

21. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265- 275.
22. Martinez, M. R., Fragoso, G. V., 1969. Estudio clínico y parasitológico de la acción anthelmintica de Bromelia pinguin. *Rev. Invest. Salud Pública*, XXIX (4): 261-288.
23. Matuda, E., 1952. Las Bromeliaceas de Chiapas. *Ann. Inst. Biol.*, XXIII: 85-153.
24. Martinez, M., 1959. Las plantas Medicinales de México. Ed. Botas. México; 478 págs.
25. Messing, R. A., Santoro, A. F. and Block, A., 1961. Isolation of electrophoretically pure pinguinain. *Enzymology*, 23: 49-51.
26. Ota, S., Stanford, M., and Stein, W. H., 1964. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit Bromelains. *Biochemistry.*, 3: 180-185.
27. Ota, S., Horie, K., Hagino, F., Hashimoto, C., and Date, H., 1972. Fractionation and some properties of the proteolytically active components of Bromelains in the stem and fruit of the pineapple plant. *J. Biochem.*, 71: 817-830.
28. Ouchterlony, O., 1953. Antigen antibody reactions in gels. IV types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 32: 231-240.
29. Pulley, G. N., and Von Loesecke, H. E., 1941. Composition of some beverages and meat tenderizers prepared from Florida papaya. *J. Fruit Products.*, 21: 37, 39, 57-61.
30. Rinderknecht, H., Geokas, H. D., Silverman, P. and Haverback, B. J., 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chem. Acta*, 21: 197-203.

31. Roig y Meza J. T., 1945. Plantas Medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. Ministerio de Agricultura, Servicio de Publicidad y divulgación, Habana, Parte II: 551-552.
32. Ronai, I. S., and Weisberg, S. M., 1954. Modified proteins for stabilizing latex paints. *Ind & Eng. Chem.*, **46**: 774-777.
33. Takahashi, T., Itoh, M., and Shimabayashi, Y., 1980. Aggregation and Fragmentation of Phaseolus vulgaris Lectin. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(7): 1655-1658.
34. Toro-Goyco, E., Matos, M., 1964. Purification of pinguinain by gel filtration. *Nature*, **203**: 82.
35. Toro-Goyco, E., Maretzki, A., and Matos, M., 1968. Isolation, purification, and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from Bromelia pinguin L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**: 91-110.
36. Velázquez, M. E., 1980. Aislamiento y purificación parcial de la Hemisfericina. Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias, U.N.A.M.
37. Wang, J.L., Cunningham, A. B., and Edelman, M. G., 1971. Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**(6): 1130-1134.
38. Weber, K., and Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406-4412.