

2 8 16.6

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

**COMPONENTES PROTEOLITICOS
DE LA PINGUAINA.**

FRANCISCO LOPEZ LIRA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

MOTIVACION.

A mi paso por la facultad de Química los consejos y orientaciones que escuchara de un viejo maestro y amigo me impulsaron a seguir siempre adelante. Muy seguido nos decía que cuando hicieramos algo, lo hicieramos de tal manera que pusieramos el mayor de nuestros esfuerzos en la tarea encomendada y desde luego que no nos olvidáramos de ponerla al servicio de la humanidad. Cuando la naturaleza se "resista a revelar sus secretos, perseveren, que la perseverancia allana todos los caminos".

Se aproximaba la terminación de mi carrera de licenciatura y me pareció buen momento para poner en práctica mucho de lo aprendido.

Un día en clase de Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, el Dr. Carlos del Río Estrada, hablaba sobre enzimas, refiriéndose especialmente a aquellas que degradan proteínas y mencionaba una enzima contenida en el fruto de la piña, llamada bromelina, nos decía que cuando las personas comen piña, el escaldor que se siente en la lengua, era debido a que la piña posee una enzima con actividad sobre proteínas y que era debido a esta acción proteolítica sobre la lengua por lo cual se sentía la boca escaldada. Ese día en clase me acordé cuando de niño iba con mis amigos de caza al monte. Por los lugares frecuentados en aquellos tiempos de infancia había un fruto comestible, que al ingerirlo nos producía unas escaldadas, que duraban uno o varios días. Era también frecuente que cuando las personas tenían parásitos intestinales, particularmente áscaris lumbricoides, los lugareños recomendaban el jugo de este fruto, para curar dicho padecimiento.

Me quedé con la inquietud por saber si el fruto tendría una proteasa igual que la piña, que fuera nueva y mucho mas activa, ya que el

escaldor sentido comparado cuando se comía piña y guámara, era mucho mayor con ésta última.

Pensé entonces que sería bueno como tema de tesis hacer una investigación sobre la sustancia o sustancias presentes en el fruto que pudieran ser responsables de las propiedades antihelmínticas atribuidas al fruto. Entonces decidí consultar información referente a proteasas, sobre todo de bromelina porque creí que podría ser una enzima parecida a esta la que tuviera la actividad tanto por la forma de la planta como por su propiedad de escaldar la lengua.

Una de las primeras cosas que encontré y que me sirvió como punto de referencia fué el nombre científico de la guámara que era Bromelia pinguin L. Busqué referencias sobre el fruto y encontré reportes que informaban de la existencia de una enzima en este fruto, la pinguinaina, con actividad sobre proteínas y con propiedades parecidas a la bromelina (SH dependiente activada por NaCN, cisteína, etc.).

Reuní todos los artículos referentes a la pinguinaina y encontré que no pasaban de diez y a pesar de ello había discrepancia sobre si eran una o dos las enzimas presentes en el fruto. Esto aumentaba mi interés por hacer un estudio del fruto existente en abundancia en forma silvestre en nuestro país y proponerla para su industrialización como un sustituto parcial de la bromelina y papaína, dada la multiplicidad de usos que poseen estas enzimas en medicina, industria farmacéutica, de la pintura, alimenticia, etc., y debido también a que se reportaba un contenido mayor de enzima con respecto a aquel obtenido de la piña (10 veces mas); además parecía interesante poder investigar si en realidad eran uno, dos o mas los componentes activos presentes en el fruto.

CONTENIDO

	pág.
MOTIVACION	i - v
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	6
RESULTADOS	14
DISCUSION.	17
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFIA	22

Con esta idea a realizar, surgía un problema que no había pensado, el lugar de trabajo. Me dediqué entonces a ver quien aceptaba asesorar el trabajo y darme un lugar en su laboratorio para poder iniciar el estudio de la B. pinguin L. como tema de tesis.

Lo que me planteé fue a quien recurrir. Al primero que consulté para recibir una orientación fué a mi maestro de Seminario de Bioquímica el Dr. Alberto Huberman. El me envió a ver al Dr. Alejandro Blanco en aquel entonces jefe del Departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Química, al parecer en algún tiempo había trabajado con bromelina. Después de una breve plática sobre el tema me sugirió ir al Departamento de Tecnología en Alimentos a ver al Dr. Rubén Berra Coz, el cual había o estaba trabajando con bromelina. Fui a ver al Dr. Berra Coz, volviendo de nueva cuenta a plantear mi inquietud, pero él, desgraciadamente estaba de año sabático no pudiendo brindarme su ayuda.

Fui entonces en busca de apoyo con la Dra. Beatriz Medina que había sido mi maestra de Bioquímica II, le planteé mi situación y me ofreció la oportunidad de ayudarme, pero que debía elaborar un protocolo de investigación sobre el tema a desarrollar. Ni tarde ni perezoso me metí a la biblioteca y a la semana siguiente ya lo tenía elaborado, lo leyó, le pareció adecuado y me llevó al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Química. Empecé a trabajar con gran entusiasmo, pero de mis experimentos iniciales no me salía ni una curva de calibración de proteínas. Después de varios intentos por aprender a trabajar no lo logré, entonces la Doctora Medina me llevó a los laboratorios Merck de México donde ella es asesora técnica y donde aprendería lo suficiente para retomar de nueva cuen-

ta la investigación.

Después de un año de ir y venir, regresé nuevamente a la Facultad de Química, con otra mentalidad. Cuando llegué me enteraron de que ya habían reportado mi trabajo sobre Bromelia pinguin L. Me enseñaron el artículo y lo leí rápidamente, era reportado por el Dr. Félix Córdoba y col. Afortunadamente no era referente a la pinguinaina, pero sí era uno sobre una enzima muy parecida.

Decidí ir a la Facultad de Medicina, a la Unidad de Biología Experimental que era donde laboraban los investigadores que reportaban el artículo, en aquel entonces el encargado del laboratorio era la Dra. Concepción Agundis Mata (el Dr. Córdoba, jefe del laboratorio, se encontraba en la Paz B. C. como director del Centro de Investigaciones Biológicas). Le expresé nuevamente mi inquietud sobre la investigación que deseaba realizar haciéndole patente mi interés por llevarla a cabo. Al finalizar la plática me ofreció la oportunidad de irme a trabajar a su laboratorio.

Inmediatamente se lo comuniqué a la Dra. Medina diciéndome que no desaprovechara la oportunidad que se me presentaba y que si continuaba con el ritmo que ella me hizo llevar en menos de cuatro meses la terminaría.

De la fecha aquella hasta hoy, han pasado muchas cosas y sobre todo han transcurrido no cuatro meses sino cuatro años, en los cuales he aprendido bastante, no solo en el campo científico, sino también en el humano. Es el producto de aquella investigación lo comunicado en esta tesis.

Debo un agradecimiento muy especial a la Dra. Beatriz Medina, que constituyó un verdadero pilar por haberme brindado su apoyo incondi-

cional para empezar a desarrollar esta investigación, dándome consejos y "jaladas de orejas" que no olvidaré y que tendré muy presente a lo largo del camino iniciado. De verdad mi mas sincero reconocimiento.

A la Dra. Concepción Agundis Mata por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio de Biología Experimental.

A mis amigos presentes y ausentes, que supieron hasta la saciedad mi interés por la "enzima" y colaboraron con su granito de arena (Mariano, Flavio, Gioconda, Almita, etc.).

Al Dr. Medardo Reyes Tapia por sus enseñanzas en el manejo de todos los trucos y "mañas" en el arte de manejar columnas de cromatografía de filtración molecular en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida.

A la maestra Aida Navas por brindarme su apoyo al asesorar este trabajo, le doy mis mas sinceros agradecimientos.

A mi esposa que además de ser una compañera para toda la vida, ayudó a mecanografiar ésta tesis, corrigiendo errores ortográficos y de vocabulario a quien le robé horas de trabajo al repetir una y otra vez lo escrito.

A mis padres que son a los que les debo mi formación, mi agradecimiento de hijo, por haberme brindado la opción al estudio, que tanto sacrificio les costó, sin su ayuda económica y moral, no hubiera podido llegar hasta donde he llegado. A ellos les debo todo, hasta la vida que con esto ni con ninguna otra cosa podría pagárselas.

Francisco López Lira.

COMPONENTES PROTEOLITICOS DE LA PINGUINAINA

INTRODUCCION.

El papel de las enzimas proteolíticas en todas las formas de vida parece formar parte del proceso de recambio total de las proteínas. No obstante, a pesar de la información acumulada, no sabemos nada acerca de cuales sean las señales que regulen los mecanismos propios de la proteólisis, por medio de los cuales esta clase de enzimas degrada proteínas ya sea de una manera completa o limitada como es el caso de activación de zimógenos, en donde una molécula precursora es convertida a su forma activa por la eliminación de un fragmento pequeño de su cadena polipeptídica (ejemplo: proinsulina a insulina, procolágena a colágena, tripsinógeno a tripsina, propapaína a papaína, etc.). Inevitablemente, el destino final de las proteínas es su degradación, independientemente de que su vida media sea corta o larga (de segundos, horas, días o meses). Los productos de hidrólisis pueden ser reutilizados por el mismo organismo para la síntesis de nuevas proteínas o bien por otros organismos para apoyar nuevos procesos de vida. El conocimiento claro de los procesos bioquímicos que toman parte en esta acción es fundamental para entender la existencia y el papel de las proteasas en la naturaleza.

Las proteasas se han clasificado en base a su mecanismo de acción como endopeptidasas y exopeptidasas bien sea porque éstas rompan enlaces peptídicos internos o porque actúen a nivel de los grupos carboxilo o amino terminales de la cadena polipeptídica. Algunas enzimas proteolíticas escapan a este tipo de clasificación, e incluyen peptidasas que rompen dipéptidos de los extremos carboxilo o amino terminales de proteínas y que actúan de una manera específica para estos dipéptidos. Conforme

han aparecido nuevos informes sobre enzimas proteolíticas, se han generado divergencias para el uso de los términos proteasa y proteinasa, por lo que, con objeto de unificar criterios, se ha propuesto recientemente que el término proteasa debe usarse en la descripción de enzimas que rompan enlaces peptídicos (sean éstos de la proteína que fuera), las enzimas que actúen sobre enlaces peptídicos internos (endopeptidasas) sean llamadas proteinasas y que las exopeptidasas sean nombradas peptidasas (1). Aceptando esta proposición, de aquí en adelante se tratará de usar ésta nueva terminología.

Ultimamente se ha puesto mucho énfasis en las implicaciones que puedan tener las proteasas tanto animales como vegetales sobre la membrana celular al activar mecanismos aun desconocidos (in vitro) como por ejemplo, la iniciación de la división celular y el escape a la inhibición del crecimiento por contacto en cultivo de fibroblastos 3T3 (2), la acción sobre membrana liberando un péptido necesario para la acción de la insulina (3), etc.

No obstante de que se ha efectuado bastante trabajo con la papaina (extraída del látex de la papaya, *Carica papaya*) mucho de nuestro conocimiento de la bioquímica y del mecanismo de acción de proteasas ha venido del estudio de enzimas microbianas y animales, por las cuales se han obtenido algunos datos sobre los procesos regulatorios que involucran actividades proteolíticas.

A pesar de esto, es evidente que las proteasas vegetales pueden también proporcionar oportunidades únicas para el estudio de enzimas proteolíticas, de tal manera que puedan dar alguna explicación sobre los fenómenos biológicos dependientes de proteólisis que ocurren en los organa

nismos animales.

En preparaciones parcialmente purificadas y extractos crudos de tallos y frutos de diferentes familias de vegetales, las cuales incluye Caricaceae, Bromeliaceae, Moraceae, etc., se ha comunicado de varias enzimas cuya actividad es SH dependiente. Es probable que todas estas proteasas sulfhidríficas de plantas empleen mecanismos catalíticos similares para hidrolizar enlaces peptídicos, pero debido a la gran diversidad existente de enzimas SH dependientes (tamaño, especificidad, propiedades cinéticas, etc.) estos mecanismos podrían variar considerablemente.

Es de llamar la atención que las proteasas extraídas de vegetales, muchas usan primariamente en su sitio activo un grupo SH (importantísimo para la degradación de proteínas) (23) a diferencia de los animales y microorganismos que utilizan primariamente endopeptidasas que poseen en su sitio activo serina.

Dentro de la familia Bromeliaceae existe una gran variedad de plantas que crecen en las regiones tropicales y subtropicales de América y en algunas especies del género *Bromelia* se ha informado la existencia de proteasas, *B. pinguin* L. (4), *B. hemisphaerica* L. (5) y *B. karatas* (5) entre otras.

La planta *Bromelia pinguin* L. crece abundantemente en México en forma silvestre y recibe distintos nombres de acuerdo a la localidad (6). Así es llamada "aguava" en Sinaloa, "cardo" en Veracruz, "cocuiztle" o "cocuite" en Sinaloa y Jalisco, "chom" (maya) en Yucatán, "guámarra" en Nayarit, "piñuela" en Oaxaca y Veracruz, "thumbiriche" en Michoacán y Nuevo León y "timbiriche" en Veracruz y Morelos. Matuda (7) describe la planta de la siguiente manera:

"*Bromelia pinguin* L. planta de 1 a 1.5 m se desarrolla en costa arenosa, hojas en roseta, angostamente triangulares, blanquisco-torrentosas en el envés; inflorescencia paniculada, panículo de 50-170 cm de longitud por 3 ó 4 cm de grosor densamente blanco-torrentoso; brácteas florales, anchas en la base, luego contraídas en un limbo lineal enrollado de 3 a 5 cm de longitud, blanco-torrentoso en el ápice; ovario multiovalado, baya amarilla anaranjada, ovoidea, de 3.5 cm de largo por 2 cm de grosor, ácida."

Del jugo de los frutos de B. pinguin L. se extrae una proteasa, la pinguinafina, reportada por primera vez en 1942 por Asenjo y Colaboradores (4).

La pinguinafina es activada por compuestos que contienen grupos sulfhidrilos libres como cisteína, 2-mercaptoetanol, tioglicolato, 2-3 dimercaptopropanol (8) y otros agentes reductores como KCN, NaCN, etc. (9) e inhibida por agentes oxidantes suaves como I_2 , H_2O_2 (8) ó por metales pesados como Hg, Fe y Cu.

En estudios realizados con enzima parcialmente purificada extraída de los frutos de B. pinguin L. se ha comunicado la presencia de un solo componente enzimático en la variedad Puerto Rico (8, 9) y dos en la variedad Cubana (10).

Dado que es poco frecuente encontrar un solo componente con actividad de proteasa en extractos de plantas, se procedió a realizar un estudio de la planta B. pinguin L. variedad mexicana, con el objeto de encontrar alguna otra proteasa o proteasas presente(s) en el jugo de B. pinguin que presentara(n) características diferentes a las ya anteriormente reportadas, de tal manera que en el futuro pudiera tener alguna

aplicación en el discernimiento sobre funcionamiento y el papel de las proteasas en la naturaleza como se explicó en párrafos anteriores.

Se ha informado de una serie de aplicaciones médicas para este tipo de enzimas, por ejemplo, efectos antidiabéticos, anti-inflamatorios, en la destrucción de coágulos (11, 12), etc., sin que haya una explicación acerca del mecanismo por medio del cual actúa. Por otra parte dentro de la industria se le ha empleado como ablandadores de carne, en el curtido de pieles, en la clarificación de la cerveza, en la extracción de aceites de residuos de pescado (12), etc.

El objeto de este trabajo, además de determinar la existencia de varios componentes enzimáticos presentes en el jugo de B. pinguin L. y caracterizarlos, empleando técnicas de cromatografía de filtración molecular en gel, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectroforesis respectivamente, es hacer énfasis sobre la potencialidad de emplear industrialmente este fruto en la obtención de proteasas, como un sustituto (total o parcial por su alto rendimiento) de enzimas proteolíticas, tales como la bromelina (extraída de la piña) y la papaína (extraída del látex de papaya) lo que permitiría emplear los correspondientes frutos para otros fines, ya que primariamente han sido empleados como alimentos y secundariamente para la obtención de las enzimas proteolíticas.

MATERIALES Y METODOS.

A.- Aislamiento de la enzima.

1.- Fruto.

La recolección de los frutos de B. pinguin L. variedad mexicana, se realizó en las localidades de el Pantanal y el Salto en el estado de Nayarit. Los frutos se lavaron, pesaron y almacenaron en bolsas de plástico dentro de un congelador Revco Ultralow a -40°C .

2.- Obtención del jugo.

Se cortó en pequeños trozos un racimo completo de 98 frutos y se molieron en un mortero y se filtraron a través de una gasa. El jugo obtenido de esta manera se centrifugó a 16,000 rpm durante una hora en una centrífuga refrigerada Internacional PR-6, con el objeto de eliminar material particulado. En el sobrenadante se realizaron las siguientes de terminaciones: contenido de Nitrógeno total empleando el método de Nessler (13), carbohidratos totales según el procedimiento descrito por Scott y Colaboradores (14), pH y actividad enzimática sobre:

a).- Caseína por el método de Kunitz (15).

b).- Método de Azure (colágena a la que se le acopló covalentemente en los residuos de hidroxiprolina el colorante azul remazol brillante) (17).

3.- Medición de la actividad enzimática.

a).- Actividad hidrolítica sobre caseína.

Se midió la actividad enzimática según el método descrito por Kunitz (15) modificado por Velázquez (16) como se describe: a 0.9 ml de la mezcla de reacción conteniendo amortiguador de fosfato 0.1 mol pH 7.5 y enzima ($1-10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) se le adicionó 0.1 ml de cisteína 0.2 mol (concenen

tracción óptima determinada experimentalmente).

Se incubó la mezcla anterior en un baño a 37°C durante 30 minutos, tiempo necesario para lograr la activación completa de la enzima; se añadió inmediatamente 1 ml de caseína (calidad Hammersten, Merck, Darmstadt) al 4% disuelta en amortiguador de fosfatos 0.1 mol pH 7.5, dejándose reaccionar durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se suspendió la acción hidrolítica añadiendo 3 ml de ácido tricloroacético (Merck) al 5%. Después de 30 minutos de reposo se filtró el contenido de los tubos y los filtrados se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro (Zeiss PMQ II) contra un blanco tratado de igual manera que lo indicado pero sin enzima. La actividad enzimática fué expresada en micromoles de tirosina (para lo que se elaboró una curva estándar de tirosina). 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 define como el número de unidades por miligramo de enzima.

b).- Actividad hidrolítica sobre Hide Powder Azure.

Se midió la actividad enzimática empleando como sustrato sintético Azure (Calbiochem, USA) según el método de Rinderknecht (17) modificado por Velázquez (16) como se describe: a tubos de ensayo (13 x 100 mm) conteniendo 3.9 ml de enzima ($5-15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) disuelta en amortiguador de acetato de sodio 0.2 mol para el intervalo de pH 3.5 a 5.5 o fosfato de sodio 0.1 mol para el intervalo de 6.0 a 8.5 (estos amortiguadores no interfieren en la actividad catalítica de la enzima) (9), se les adicionó 0.1 ml de cistefna 0.2 mol, después de incubarse a 37°C durante 30 minutos se vertieron sobre tubos que contenían 10 mg de Azure; los tubos se

mantuvieron a 37°C durante 5 minutos hasta la aparición del color azul y se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo.

El contenido de los tubos se filtró y se leyeron los filtrados a 595 nm en un espectrofotómetro contra un blanco de reactivos. 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.

4.- Determinación de las condiciones óptimas para la medición de la actividad enzimática. (concentración de activador y pH óptimos).

Investigando las condiciones adecuadas para la acción de la enzima se determinó primero la concentración óptima de activador midiéndose la actividad enzimática de jugo completo de B. pinguin sobre caseína en una mezcla de reacción que contiene amortiguador de fosfato 0.1 mol pH 7.5 cisteína como activador y caseína al 4%. Además se ensayaron otros activadores: EDTA 0.05 mol, NaCN 0.2 mol y la mezcla de cisteína 0.2 mol + EDTA 0.05 mol. Simultáneamente se midió la actividad en ausencia de activador.

Para seleccionar el pH óptimo para la acción enzimática se utilizó el jugo completo y como sustrato Hide Powder Azure, amortiguador de acetato de sodio 0.2 mol para el intervalo de pH 3.5 a 5.5 y amortiguador de fosfato de sodio 0.1 mol para el intervalo de 6.0 a 8.5. Como activador en todos los casos se empleó cisteína 0.2 mol.

B.- Separación de los componentes enzimáticos.

1.- Cromatografía de filtración molecular en gel.

En una columna de 100 x 2.6 cm (Pharmacia) empacada con Sephadex G 75-120 y equilibrada durante un día con amortiguador de citratos

0.02 mol pH 5.5 adicionada de acetato fenilmercúrico 1×10^{-4} mol como se indicó previamente (18), se colocó 1 ml de jugo dializado ($3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en 4 ml de amortiguador de citratos 0.02 mol con el cual se dializó la muestra durante 15 días con cambios cada 4 días, para eliminar parte de color amarillo que posee este jugo.

Se permitió un flujo constante de $35 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ y se colectaron fracciones de 4 ml en un colector LKB Redirac, registrándose la absorbancia en un registrador LKB UVICORD a 280 nm.

Al contenido de los tubos se les midió la actividad sobre caseína y la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

2.- Cromatografía de intercambio iónico.

Para realizarla se empleó una columna (Pharmacia) de 2.5×60 cm empacada con CM-Sephadex C 50 equilibrada previamente con amortiguador de citratos 0.005 mol pH 5.5 adicionada con acetato fenilmercúrico 1×10^{-4} mol. Se aplicaron 175 ml ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) de enzima obtenida por filtración molecular en gel y dializada contra amortiguador de citratos 0.005 mol pH 5.5.

Para la elución se utilizó un gradiente lineal de citrato de sodio de 0.005 mol a 1.2 mol pH 5.5, adicionado de acetato fenilmercúrico 1×10^{-4} mol como inhibidor. Se colectaron fracciones de 5 ml en un colector LKB Ultraorac a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 280 nm en forma continua en un registrador UVICORD LKB. Al finalizar el experimento a los tubos con máxima absorbancia se les determinó proteína(19) y actividad enzimática sobre caseína.

C).- Identificación de los componentes separados.

1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

A las distintas fracciones de pinguinaína purificada parcialmente

se les efectuó análisis electroforético en gel de poliacrilamida según el método de Ornstein y Davis modificado por Clarke (20); se emplearon los siguientes reactivos:

Solución A.

Se disolvieron en agua 18.1 g de tris(hidroximetil)-aminometano (sigma), se adicionó 34 ml de HCl 1.0 N, 0.12 ml de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilendiamina) y se aforó a 100 ml con H₂O bidestilada.

Solución B.

Se disolvieron 5.98 g de Tris en 50 ml de agua bidestilada y se adicionaron 48 ml de HCl 1.0 N, 0.46 ml de TEMED y se aforaron a 100 ml.

Solución C.

Se disolvieron por separado en agua bidestilada 28 g de Acrilamida (Merck) y 0.735 g de bisacrilamida (Merck), se mezclaron y aforaron a 100 ml.

Solución D.

Se disolvieron por separado 20 g de Acrilamida (Merck) y 5 g de bisacrilamida (Merck), se mezclaron y aforaron a 100 ml con agua bidestilada.

Solución E.

4 mg de riboflavina (Sigma) se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada.

Solución F.

40 g de sacarosa se aforaron a 100 ml con agua bidestilada.

Solución G.

0.140 g de persulfato de amonio (Merck) se aforaron a 100 ml con agua bidestilada.

Para preparar los geles se mezclaron las soluciones de la siguiente manera.

Gel de resolución.

1 volumen de solución A

1 volumen de solución C

2 volúmenes de solución G

Gel Concentrador:

1 volumen de solución B

1 volumen de solución D

1 volumen de solución E

4 volúmenes de solución F

A tubos de vidrio de 10 cm x 7 mm colocados en un soporte adecuado, se les añadió 2 ml de gel de resolución, inmediatamente después, se adicionó con cuidado un poco de agua en la parte superior del gel para obtener un nivel horizontal, lo que facilita la migración uniforme de las muestras, además de que evita el contacto del gel con el aire; los geles permanecieron en reposo durante 20-30 minutos hasta su polimerización. Una vez polimerizado se retira el agua de la superficie y se colocan 0.5 ml de gel concentrador, procediendo de la manera descrita previamente para el gel de resolución hasta alcanzar su polimerización. Las columnas se montaron en un soporte que conecta con una cuba de electroforesis Pharmacia GE-4 que contenía amortiguador Tris-glicina 0.01 mol pH 8.1.

Se aplicaron las muestras de enzima ($30 \mu\text{l}$, $1.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) adicionadas de azul de bromofenol al 0.25% (P/V) en sacarosa al 20% (P/V) en amortiguador de Tris-glicina 0.005 mol pH 8.1 en la parte superior de las columnas y se pasó una corriente de 150 voltios (6 mA/columna) durante 3 h.

En seguida se retiraron los geles, se fijaron con ácido 5-sulfosalicílico (Merck) al 20% (P/V) en H_2O durante 12 horas, se tñeron con Negro de Amido al 0.5% (P/V) en ácido tricloroacético (Merck) al 12.5% (P/V) durante 12 h y se eliminó el exceso de colorante con ácido acético (Merck) al 4% (V/V) en H_2O .

2.- Inmunolectroforesis.

Se realizó con geles de agarosa al 1% disuelta en amortiguador de Tris-Veronal con fuerza iónica de 0.05 pH 8.6 aplicando $10 V \cdot cm^{-1}$ durante 3.5 h. En la placa de agarosa se hicieron tres horadaciones, en la primera y en la tercera se aplicaron las fracciones I y II obtenidas por cromatografía de intercambio iónico y en la parte media la fracción B obtenida por filtración molecular en gel. Al término del experimento se colocó antisuero antipíngüina en cada uno de los canales centrales dejándose difundir durante 12-15 h.

Las placas de inmunolectroforesis, fueron tratadas por presión, colocando sobre cada placa 5 papeles filtro (Whatman No. 1) y una placa de vidrio encima de los papeles para luego aplicar un peso de aproximadamente 1 Kg. Esta operación se repitió dos veces (21). Después de esto, las placas fueron lavadas con solución de NaCl 0.1 mol, adicionada de acetato fenilmercurio 1×10^{-4} mol, con objeto de eliminar el exceso de antisuero y de antígenos, dejando exclusivamente las bandas de precipitado; luego se tñeron con solución de Azul Brillante de Coomassie al 0.5% (P/V) en una solución de ácido acético al 10% (V/V) en etanol al 45% (V/V) en H_2O . El exceso de colorante se eliminó lavando los geles con una solución igual que la anterior pero sin Azul Brillante de Coomassie.

Obtención de antisueros.

Con la enzima obtenida por filtración molecular en gel de Sepha-

dex G 75-120 se inocularon conejos Nueva Zelanda por vía subcutánea aplicándoles 1 ml ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) de enzima emulsionada con Adyuvante completo de Freund (V/V) semanalmente, durante 6 semanas. Después de la sexta inyección se sangraron los conejos por la vena marginal de la oreja, se permitió la coagulación espontánea de la sangre y se separó el suero con ayuda de una pipeta Pasteur. El suero total (antisuero) se empleó para efectuar inmunoelectroforesis.

RESULTADOS.

A.- Obtención del jugo y selección de condiciones óptimas de actividad en zimática.

El jugo obtenido a partir de la maceración de los frutos, es denso y de un color amarillo claro, con un contenido de proteína medido como N total de $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de jugo (Ver tabla No. 1). Al jugo de 3 lotes de 98 frutos cada uno de B. pinguin se les determinó pH, resultando similar (pH 3.9) al presentado por el jugo de varias especies (Bromelia hemisphaerica, B. karatas y Ananas comosus, etc.) (22).

Para valorar las condiciones adecuadas de acción de la enzima se midió el efecto de activadores e inhibidores sobre la acción enzimática (determinada ésta midiendo su efecto sobre caseína), la que es influenciada por la presencia de algunos compuestos que, como la cisteína, actúan activando a la enzima y otros como el acetato fenilmercurico en el que el mercurio inhibe los grupos SH libres necesarios para la actividad. (8,18).

Los resultados se presentan en la figura No. 2 donde vemos que la cisteína a una concentración 0.2 mol resulta ser mejor activador que la cisteína + EDTA como se informó para otras proteasas (22).

La concentración óptima de cisteína como activador se midió empleando este reactivo a concentraciones que variaban desde 0.05 mol hasta 4 mol (fig. número 3). La concentración óptima encontrada fué de 0.2 mol.

Para la determinación del pH óptimo se midió la actividad enzimática empleando azure; se encontraron dos pH máximos, uno a 5.5 y otro a 7.5 (fig. No. 4), que coinciden con los reportados para la variedad cubana de B. pinguin L. (10). De acuerdo con estos resultados, para efectuar las determinaciones enzimáticas en condiciones óptimas, empleamos para

TABLA 1

ALGUNAS PROPIEDADES DEL FRUTO Y JUGO DE LA PLANTA TROPICAL
BROMELIA PINGUIN L.

Peso promedio por fruto	32.9 g
Volumen promedio de jugo obtenido por fruto	13.0 ml
pH del jugo completo	3.9
Proteínas en jugo completo (Met. de Nessler)	10.0 mg/ml
Azúcares totales en jugo completo (Met. de Antrona)	39.0 mg/ml

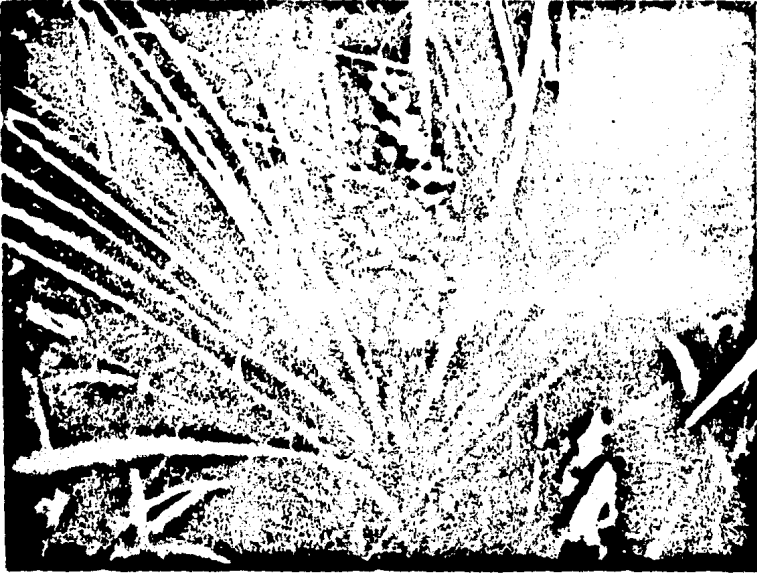


Fig. 1 Planta de Bromelia pinguin L.

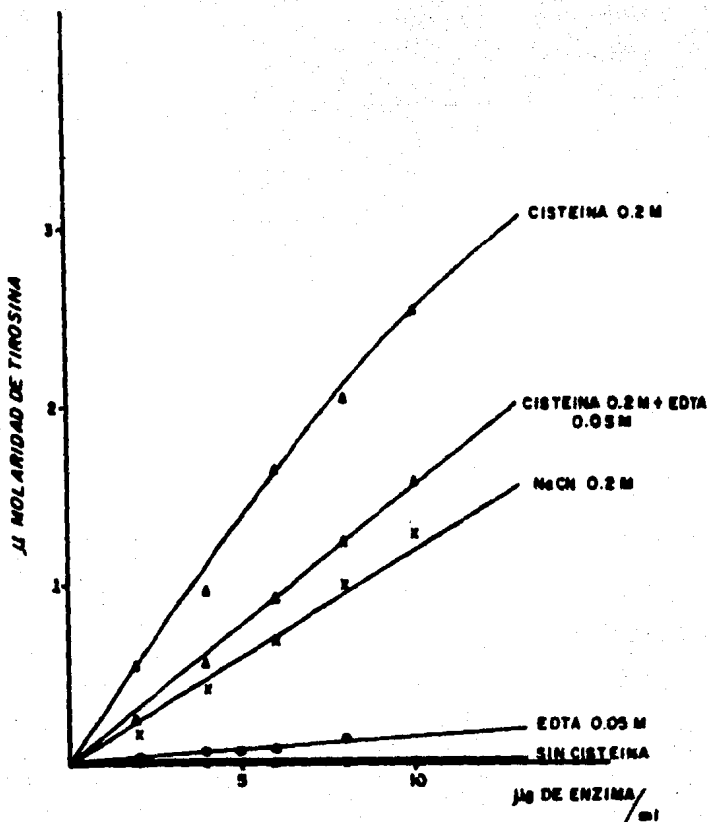


Fig. 2 Efecto de diferentes activadores e inhibidores sobre la actividad enzimática de jugo de B. pinguin L. Se empleó NaCN, EDTA, cisteína + EDTA y cisteína. La actividad específica es expresada en unidades de actividad enzimática por mg de proteína, medida como N total, por el método de Nessler.

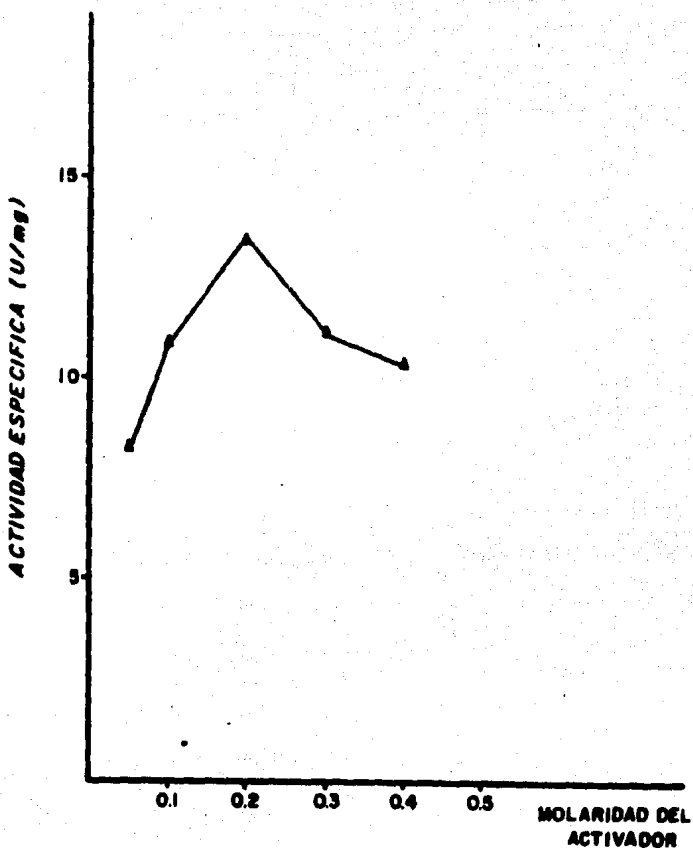


Fig. 3 Determinación de la concentración óptima de cisteína para la actividad enzimática de jugo completo de B. pinguin L. Las concentraciones empleadas fueron de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mol. Se utilizó como sustrato caseína (Hammersten) disuelta en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 mol pH 7.5.

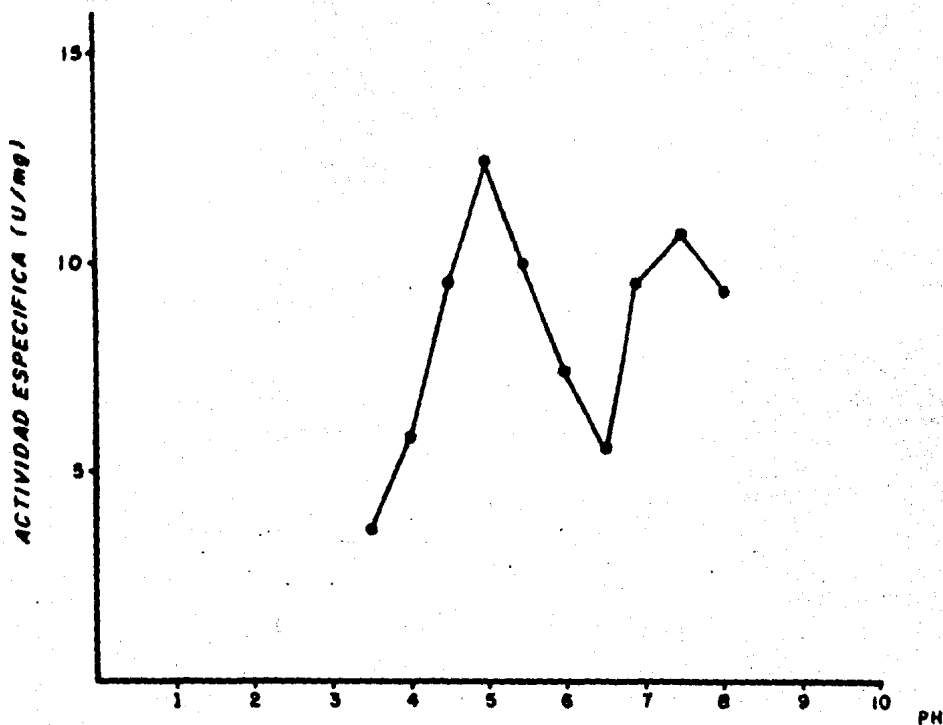


Fig. 4 Comportamiento de jugo completo de B. pinguin L. con respecto al pH. Se empleó como sustrato Hide Powder Azure (colágena unida a un colorante azul) y amortiguador de acetato de sodio 0.2 mol para el intervalo de pH de 3.5 a 5.5 y amortiguador de fosfato de sodio 0.1 mol para el de 6.0 a 8.5.

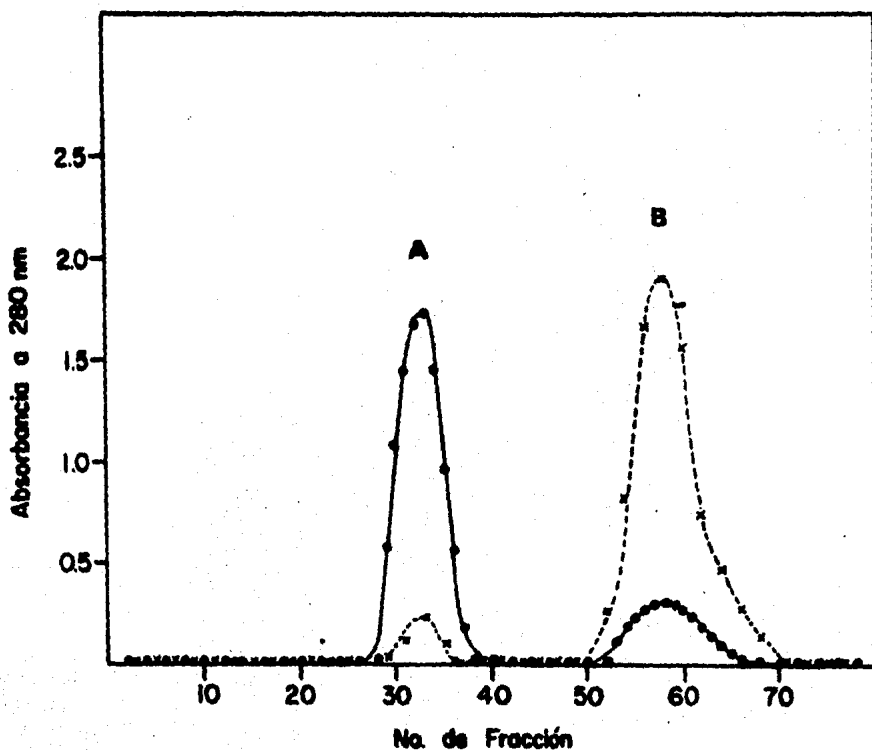


Fig. 5 Cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G-75 de jugo completo de B. pinguin L. dializado exhaustivamente contra amortiguador de citrato de sodio 0.02 mol pH 5.5. Se empleó una columna de 2.5 x 100 cm empacada con Sephadex G-75, aplicándose un flujo de $35 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ y fracciones colectadas de 4 ml. Como eluente se utilizó amortiguador de citrato de sodio 0.02 mol pH 5.5 adicionado de acetato fenilmercuríico 1×10^{-4} mol. (●—●) absorbancia a 280 nm; (---■---) actividad enzimática sobre caseína.

fines de este trabajo una concentración de activador 0.2 mol y amortiguador de fosfatos 0.1 mol pH 7.5.

B.- Separación de los componentes enzimáticos.

1.- Cromatografía de filtración molecular en gel.

El jugo de B. pinguin L. presenta un perfil de elución en Sephadex G 75-120 (Fig. 5) donde se puede apreciar la presencia de dos picos, uno mayor A, con escasa actividad enzimática sobre caseína y que sale en un volumen de 120 ml dentro del volumen de exclusión (no se analiza en este trabajo), y otro componente menor B, que presenta una elevada actividad ($2.64 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) y que se usó para los trabajos de caracterización.

2.- Cromatografía de intercambio iónico.

La fracción con actividad enzimática obtenida por filtración molecular en gel Sephadex G 75-120 (175 ml) fué sometida a intercambio iónico en una columna de CM Sephadex C-50. La aplicación de un gradiente lineal de amortiguador de citratos, dió lugar a la aparición de dos componentes (I y II), con elevada actividad enzimática (1.94 y $1.88 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivamente, Fig. No. 6) claramente definidos.

C.- Identificación de los componentes separados.

1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se emplearon las muestras resultantes tanto por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G 75-120 y los obtenidos por intercambio iónico. Se puede ver que la fracción B obtenida por filtración molecular en gel (Fig. No.5) se resuelve en 5 bandas bien delineadas mientras que la fracción I y II de CM-Sephadex (Fig. No. 6) se resuelve en tres y dos respectivamente.

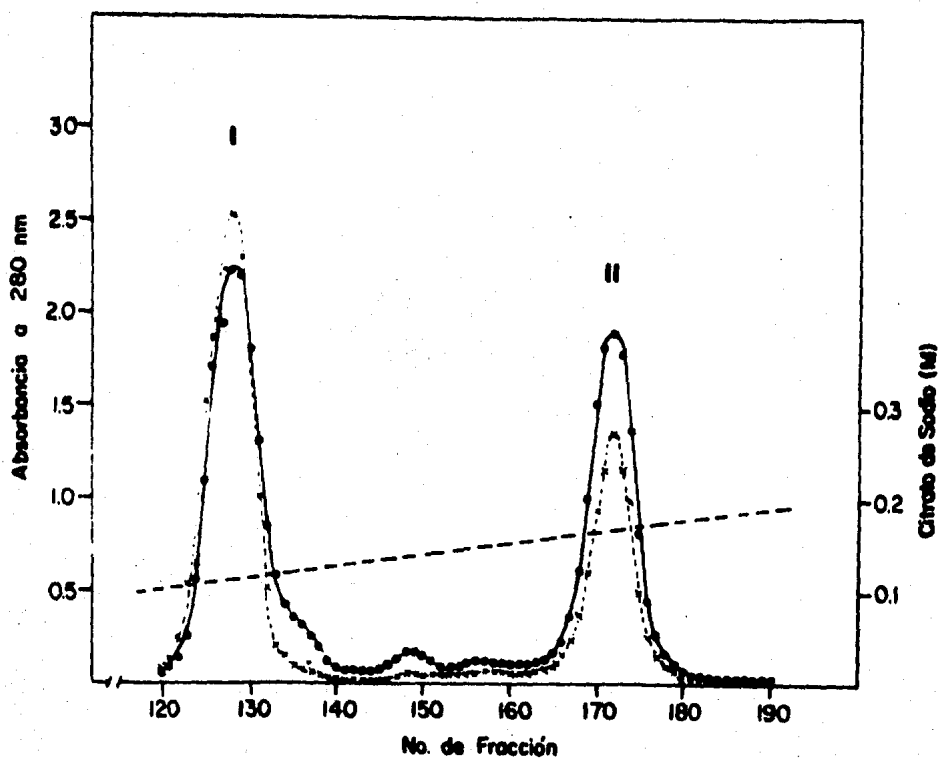


Fig. 6 Cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex de la fracción B obtenida por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G-75 a partir de jugo completo de B. pinguin L. Se empleó una columna de 2.5 x 50 cm empacada con CM-Sephadex C-50, aplicándose un gradiente lineal de citrato de sodio 0.005 --- 0.2 mol con flujo de $20 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ y fracciones colectadas de 5 ml. (—●—) absorbancia a 280 nm; (---○---) actividad enzimática.

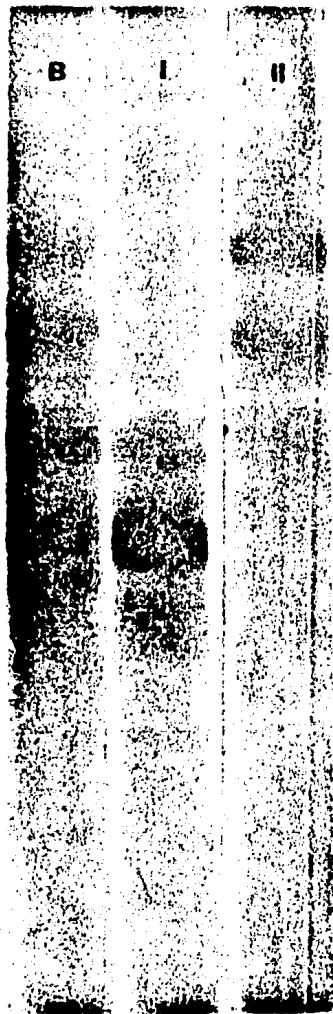


Fig. 7 Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones B obtenidas por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex y de las fracciones I y II obtenidas por intercambio iónico respectivamente. Para la electroforesis se utilizó amortiguador de Tris-glicina 0.01 mol pH 8.1 aplicando una corriente de 6 mA/columna durante 3 h .

2.- Inmunoelectroforesis.

Se emplearon las muestras obtenidas tanto por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G 75-120 y aquellas obtenidas por intercambio iónico CM Sephadex C-50. Para revelar los compuestos separados se empleó el antisuero obtenido en conejo por inoculación de la fracción B obtenida por filtración molecular en gel. En los resultados, podemos ver que la horadación en la cual se colocó la fracción B obtenida por filtración molecular en gel se resuelve en cinco arcos de precipitación que confluyen entre sí. En la horadación número I donde se colocó la fracción I de CM-Sephadex, se resuelve en tres arcos de precipitación con identidad total y que migran hacia el ánodo. La fracción II se resuelve a su vez en dos arcos de precipitación con migración catódica (Fig. No. 8).

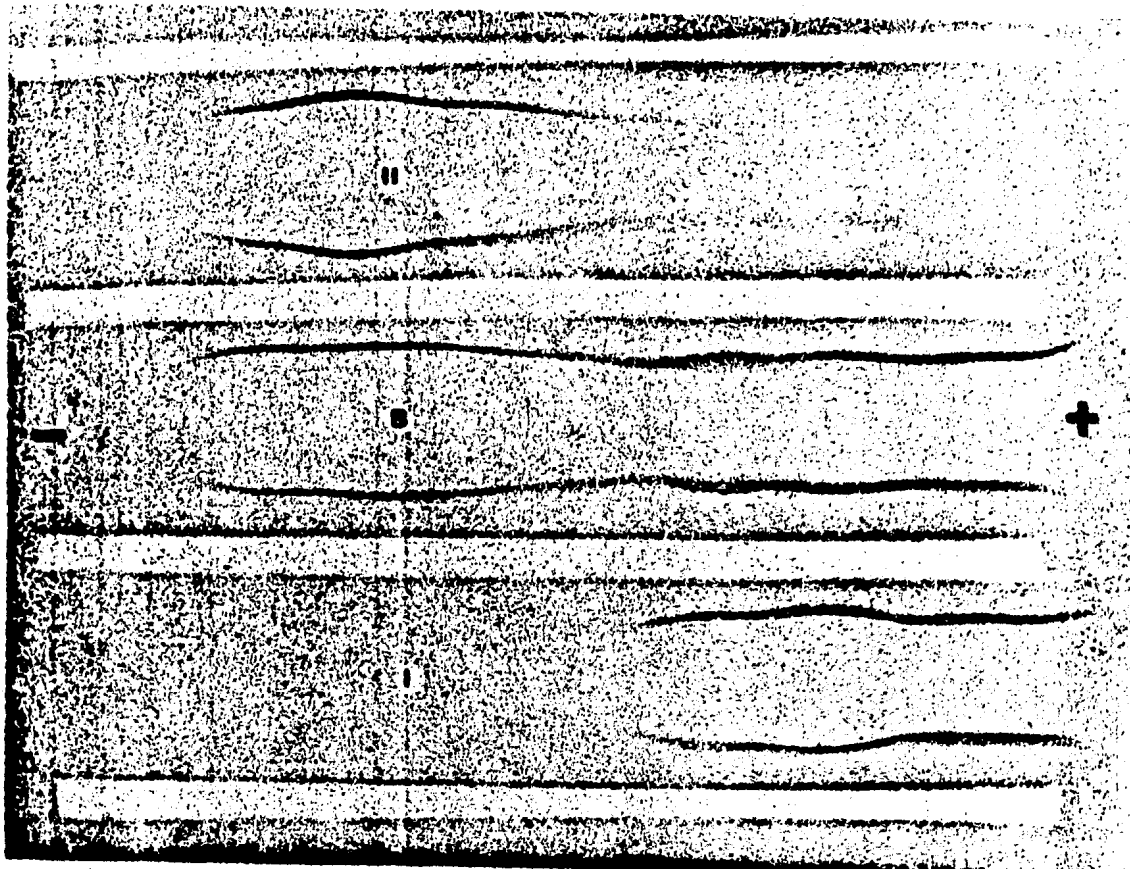


Fig. 8 Inmunolectroforesis de las fracciones B, I y II obtenidas por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex y cromatografía de intercambio iónico respectivamente. La fracción B es resuelta en 5 componentes, en tanto que las fracciones I y II en 3 y 2 componentes que cruzan antigénicamente. El amortiguador empleado fué Tris-veronal pH 8.6 con una fuerza iónica de 0.05. Se aplicó una corriente de 10 V.cm^{-1} durante 3.5 h .

DISCUSION.

En el jugo de Bromelia pinguin L. se encuentra alto contenido tanto de proteínas como de azúcares totales (tabla No. 1) tal como ha sido reportado para las variedades Puerto Rico y Cuba (8, 10) de este mismo fruto. Esto la ha hecho aparecer como una de las mejores fuentes de proteasas en la naturaleza (8), ya que se obtiene mucha más enzima que la que puede obtenerse a partir de los correspondientes frutos (papaya y piña) utilizados para surtir la demanda comercial, así, por ejemplo, de los frutos verdes de donde se extrae la papaina se obtiene aproximadamente el 0.1 % de enzima por peso de fruto verde (23) y en el caso de bromelina se obtiene de 3 a 3.7 g por litro de jugo (24).

En el proceso de selección de las condiciones adecuadas para determinar la actividad proteolítica se obtuvieron dos pH óptimos, esto nos sugirió, la posibilidad de que existiera más de un componente enzimático o bien que la acción de la enzima sobre un sustrato heterogéneo como lo es una proteína, rompiera diferentes enlaces peptídicos con una velocidad diferente a distintos valores de pH, tal y como fuera propuesto inicialmente por Schwimmer (25).

En la separación por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G 75-120, se logró el aislamiento de un componente activo (B) en un sólo paso de purificación obteniéndose otro componente con escasa actividad (A). Este compuesto (B), con mayor actividad enzimática, al ser sometido a cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50 es separado en dos fracciones con elevada actividad enzimática (Fracción I y II) uno que eluye a una baja concentración de citratos (0.11 mol) y otro que eluye a una concentración mas elevada (0.165 mol).

Como la separación por cromatografía de intercambio iónico es realizado tomando en cuenta las cargas presentes en las moléculas y el tipo de intercambiador (en el caso de un intercambio catiónico el soporte tiene carga negativa y las moléculas que se van a someter a intercambio catiónico carga positiva, de ahí su nombre). Es de suponerse que la fracción que sale a menor concentración de citratos (fracción I) deba contener una cantidad menor de cargas positivas que aquellas que permanecen adheridas a la matriz, por lo que al incrementar la concentración de la sustancia que va a competir por el sitio al que se encuentra adherida, se desprege y salga. De igual modo podemos explicar el comportamiento de la fracción II la cual necesita una mayor concentración salina para ser eluida, sugiriendonos un mayor contenido de cargas positivas en su molécula.

Cuando la fracción mayor de actividad obtenida por cromatografía de filtración molecular en gel de Sephadex G-75 (fracción B) es sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida alcalina pH 8.1 se observa que se separa en cinco bandas claramente definidas. De igual manera cuando las fracciones con mayor actividad obtenidas por CM-Sephadex (I y II) son tratadas de igual forma, la fracción I migra a mayor velocidad hacia el ánodo separándose en tres componentes, mientras que la fracción II se separa en dos componentes, los cuales aparecen mas cercanos al cátodo. Esta migración electroforética de los componentes nos habla nuevamente de la existencia de una diferencia de cargas entre las fracciones separadas, posiblemente debido a la presencia de dos componentes, uno de ellos básico (2 bandas en electroforesis fig. 7) permanece cerca del cátodo y otro ácido (3 bandas en electroforesis fig. 7) permanece cerca del ánodo.

Estos resultados dan apoyo a las observaciones iniciales sobre

la existencia de dos fracciones enzimáticas una ácida pH 5.5 y otra básica pH 7.5 sugeridos por la obtención de los dos pH óptimos, de igual manera a lo que fué informado por R. Messing y col. en la variedad Cubana (10). La presencia de estos componentes ácido y básico fué confirmada posteriormente por estudios de enfoque isoelectrico (Datos no comunicados en esta tesis).

Los datos obtenidos entran en contradicción con aquellos comunicados por Toro-Goyco y col. en donde ellos informan de la presencia de un solo componente enzimático con un pI de 6.5, no obstante de encontrar un comportamiento heterogéneo en sus preparaciones cuando estas son tratadas a diferentes pH (8,26).

Si la inmunoelectroforesis es hecha sobre las dos fracciones principales obtenidas por CM-Sephadex, se encuentra que el pico I del cromatograma se resuelve en tres componentes, que corresponden a los tres que migran hacia el ánodo y el pico II, a su vez se resuelve en aquellos que migran hacia el cátodo. Puede verse por lo tanto similitud con los hallazgos en electroforesis alcalina en gel de poliacrilamida en lo que respecta a la presencia de varios componentes con movilidad eléctrica diferente.

Una cosa que nos revela la inmunoelectroforesis es la igualdad antigénica existente entre las diferentes fracciones, al obtener reacción cruzada entre las fracciones separadas (fig 8). Esto nos hace suponer que el jugo de B. pinguin L. parece estar formado por entidades enzimáticas distintas (tal y como fué discutido anteriormente) con ligeras variaciones en su molécula, suficientes para dar una movilidad electroforética diferente. Estas variaciones pudieran quedar expuestas hacia el interior de las moléculas de tal manera que los determinantes antigénicos siempre fue

ran los mismos quedando estos en la superficie molecular dando lugar a la producción de un solo tipo de anticuerpo con el cual se obtendría la antigenicidad cruzada.

CONCLUSIONES.

- 1.- El elevado contenido de enzima encontrado en el jugo de B. pinguin L. la hace una de las mejores fuentes de proteasas en la naturaleza (comunicado aquí y referencia 8).
- 2.- Los pH óptimos encontrados para la pinguinaína aislada de la variedad mexicana, son los mismos que los comunicados para la pinguinaína variedad cubana.
- 3.- La cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex separa dos componentes activos con elevada actividad enzimática.
- 4.- Por electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 8.1 la fracción obtenida por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G75-120 se separa en cinco componentes claramente definidos. Dos corresponderían a la fracción II de CM-Sephadex y tres a la fracción I de CM-Sephadex.
- 5.- La inmunoelectroforesis nos revela cruce inmunológico, lo que nos indica identidad inmunológica parcial o total.
- 6.- Finalmente el jugo completo de B. pinguin L. contiene un mínimo de dos fracciones con actividad enzimática sobre proteínas, uno ácido y otro básico, con igualdad antigénica pero movilidad electroforética diferente.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- A. J. Barret, Fed. Proc., 39, 39 (1980).
- 2.- M. M. Burger, Nature, 227, 170 (1970).
- 3.- J. Larner, K. Cheng y Col., Fed. Proc., 41 (11), 2724 (1982).
- 4.- C. F. Asenjo y M. del C. Fernández, Science, 95, 48 (1942).
- 5.- M. T. Cruz, M. C. Oliver, L. M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló
Rev. Lat. Quim., 5, 18 (1974).
- 6.- J. Ramirez y G. C. Alcocer, Sinonimia Vulgar y Científica de las
plantas Mexicanas. Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento,
México (1902).
- 7.- E. Matuda, An. Inst. Biol. XXIII, 85 (1952).
- 8.- E. Toro-Goyco, A. Maretsky y M. L. Matos, Arch. Biochem. Biophys.,
126, 91 (1968).
- 9.- C. F. Asenjo y M. del C. Fernández, J. Agri. Univ. Puerto Rico, 29,
35 (1945).
- 10.- R. A. Messing, A. F. Santoro y A. Block, Enzymologia, 22, 110 (1960).
- 11.- K. Hwang y A. C. Ing, Ann. N. Y. Acad. Sci., 54, 161 (1951).
- 12.- W. M. Codreman, S. Scarpé, J. Demeester y A. Lauwers, Pharm. Acta
Helv., 51 (4), 73 (1976).
- 13.- F. Lanni, M. L. Dillon y J. W. Beard, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74,
4 (1950).
- 14.- T. A. Scott y H. E. Melvin, Anal. Chem., 25, 1656 (1953).
- 15.- M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 30, 291 (1947).
- 16.- M. E. Velázquez, Tesis, UNAM (1980).
- 17.- H. Rinderknecht, M. C. Georkas, P. Silverman y B. J. Herverback,
Clin. Chem. Acta, 21, 197 (1968).

- 18.- S. Ota, S. Moore y W. H. Stein, *Biochemistry*, 3, 180 (1964).
- 19.- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 20.- J. T. Clarke, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 428 (1964).
- 21.- B. Wallenborg y V. B. Andersson, LKB. Nota de aplicación 249 (1978).
- 22.- R. Arnon, *Methods in Enzymology*. Vol. XIX (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Eds.) Academic Press, New York (1970).
- 23.- J. R. Kimmel y E. L. Smith, *Advances in Enzymology*, 19, 267 (1957).
- 24.- T. Murachi. *Methods in Enzymology* Vol. XIX (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Eds.) Academic Press, New York (1970).
- 25.- Schwimmer S. J. *Theoret. Bio.*, 3, 102 (1962).
- 26.- E. Toro-Goyco, I. Rodríguez-Costas y H Ehrig. *Biochem. Biophys. Acta*, 151, 622 (1980).