



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

POLIAMINAS Y ACTIVIDAD  
PROTEOLITICA EN TEJIDO  
HERIDO DE SOLANUM  
TUBEROSUM L.

T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A

Carlos Arturo Pérez Brizuela



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 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.

## I N D I C E

	Página.
1. INTRODUCCION .	1
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .	21
3. PARTE EXPERIMENTAL .	26
4. RESULTADOS Y DISCUSION .	36
5. CONCLUSIONES .	84
6. BIBLIOGRAFIA .	85

## 1. INTRODUCCION .

En el libro de Biocufmica del tejido vegetal herido, editado por Kahl (1), se hace referencia a las variadas condiciones ambientales o factores a que estan sujetos los vegetales, la acci3n de éstos puede imponer una destrucci3n parcial o aún completa del organismo vegetal. Si las plantas no son letalmente dañadas son capaces de regenerar el tejido dañado o protegerse por sí mismos contra la herida, el ataque de parásitos y la pérdida de agua; a través de un proceso de restablecimiento a la herida algo similar al de los animales. Comúnmente las células diferenciadas por debajo de una superficie herida, incapaces de divisi3n celular, son desdiferenciadas, pierden sus funciones originales, recuperan su actividad mit3tica y finalmente forman tejido meristemático. Este meristema o cambio a la herida, en el curso de una nueva fase de diferenciaci3n, reemplaza la funcionalidad del tejido dañado o produce una capa de frontera tisular en la regi3n de herida, tal como un periderma, produciendo el cierre de la herida. El restablecimiento de herida parece ser un sistema muy adecuado para las investigaciones sobre las capacidades de desarrollo de las células vegetales.

Para tales investigaciones el tejido de almacenamiento ha sido frecuentemente usado, por ejemplo; tubérculos de papa (Solanum tuberosum L .) o raíces de zanahoria - (Daucus carota). Estos tejidos de almacenamiento además - de que tienen la ventaja de estar compuestos de manera - homogénea de células parenquimatosas, estn disponibles

en cualquier temporada del año.

La herida y el lavado prolongado de cortes de tejido producen cambios profundos desde el punto de vista metabólico y fisiológico en las células involucradas.

Los cambios ultraestructurales de tejido de almacenamiento herido de alcachofa (Helianthus tuberosus), zanahoria, y papa, siguen casi la misma tendencia en las primeras 24 horas después de herida, aunque la respuesta citológica en los diferentes tejidos es algo diferente. Entre los cambios están: inducción de mitosis que lo presenta por ejemplo, el tejido de tubérculo blanco de papa, y la modificación química de pared celular que lo presentan el tejido de alcachofa de Jerusalem y el de zanahoria. En cualquiera de los tejidos mencionados, núcleo y nucleolo se extienden considerablemente; al mismo tiempo retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres y polisomas se incrementan notablemente (2,3, y 4).

Por otra parte, los cambios ambientales a los que puede estar sujeta una célula, pueden producir en ésta la aparición de mecanismos de adaptación; estos mecanismos, por ejemplo, regulan el número real de moléculas de una enzima particular, que se hace manifiesta en su velocidad de síntesis y degradación, así como en el número de moléculas activas en el que se involucren mecanismos de activación e inactivación (1).

Entre los mecanismos físicos y químicos de activación e inactivación se encuentran:

a) Activación e inactivación de enzimas a través de la asociación y disociación de sus subunidades así como de la enzima misma.

Activación por asociación de subunidades. Un elemento estructural esencial de las enzimas con estructura cuaternaria es la subunidad, la cual aislada es generalmente inactiva catalíticamente. Después de la asociación con otra subunidad o subunidades, la enzima se activa, (5), pero sólo en combinación con otras es capaz de unirse y convertir sustratos. El ejemplo más conocido lo representa la fosfatasa alcalina de E. coli, que está formada por dos subunidades idénticas las cuales son inactivas, estando disociadas, mientras que en presencia de  $Zn^{2+}$  se reasocian restableciéndose la actividad de la enzima. Este es un proceso totalmente reversible (6 y 7).

Activación por asociación de las moléculas de enzima activas. La agregación específica de moléculas de enzima a grandes agregados moleculares de alto peso molecular, se ha demostrado para un número de diferentes enzimas y definitivamente altera drásticamente las propiedades cinéticas de las moléculas individuales. La glutamato deshidrogenasa de hígado, consiste de varias subunidades idénticas, las cuales forman una enzima activa con un peso molecular de 280 000 daltons. En presencia de ADP y distintos aminoácidos esta enzima, si está a una concentración elevada, forma agregados entre sus moléculas dando una partícula de 2.2 millones de daltons, conservando no

obstante su actividad de L-glutamato deshidrogenasa, y - presentando la variación de algunas de sus constantes cinéticas (6).

b) Activación e inactivación de enzimas a través de mecanismos alostéricos.

La rápida activación o inactivación de rutas metabólicas se ejerce muy frecuentemente a través de enzimas alostéricas. Estas enzimas alostéricas se caracterizan por que metabolitos de bajo peso molecular (efectores), se pueden unir a la enzima en un sitio diferente al sitio activo, lo cual trae como consecuencia un incremento en la afinidad por su sustrato concomitante al incremento en su grado de saturación. Generalmente estas enzimas reguladoras o alostéricas se encuentran en sitios estratégicos, como por ejemplo en el caso que se presenta durante el control de la hidrólisis de glucosa en la ruta glicolítica; el ATP actúa como un efector positivo (activador) de la fosfatasa y como un efector negativo (inhibidor) de la fosfofructocinasa. Estas enzimas comúnmente poseen estructura cuaternaria (5).

c) Activación e inactivación de enzimas a través de modificación enzimática.

La modificación enzimática de enzimas o proteínas, puede ser muy diversa. Consiste en la transferencia de grupos específicos a las proteínas en donde se fijan covalentemente. Lleva en todos los casos conocidos a cambios profundos ya sea en la actividad de la enzima o en la regulación de la misma. Tales modificaciones enzimáticas son carbanilaciones (transferencia de grupos carba-

milo de carbamilsfosfato a distintos grupos de la enzima), fosforilaciones, acilaciones, oxidación y reducción de - grupos tiol (los cuales son necesarios en la estructura y función de la enzima) y adenilaciones (transferencia de - residuos de adenilato). El efecto de estas modificaciones químicas, resultado de las diversas acciones enzimáticas, trae como consecuencia la activación o inactivación de la proteína previamente formada (5).

d) Activación e inactivación de enzimas a través de proteólisis limitada.

Se conocen una serie de enzimas que se almacenan como precursores inactivos después de su síntesis (zimógenos, - proenzimas) los que pueden convertirse rápidamente a su forma activa mediante una proteólisis específica, irreversible y limitada.

Esta activación parece estar ampliamente dispersa en la naturaleza (por ejemplo, sintetetasas de quitina en levadura,  $\beta$ -amilasas en células de aleurona de ciertas Gramíneas; todas las enzimas digestivas en mamíferos (8)). La inactivación por proteólisis limitada, por otra parte, parece iniciar la degradación de moléculas de enzima, como ha sido demostrado en mamíferos y como se sugiere ocurra para el caso de algunas enzimas en tejido de almacenamiento vegetal herido (9).

La herida sobre cualquier tipo de tejido de almacenamiento vegetal induce cambios específicos en la actividad de varias enzimas. Los mecanismos de activación e inactivación de enzimas anteriormente descritos han sido estu

diados durante el fenómeno de herida como probables explicaciones a los cambios específicos en la actividad de varias enzimas en tejido de almacenamiento vegetal. La gran mayoría de estas proteínas incrementan su actividad, algunas no reaccionan del todo y otras decrecen su actividad.

El incremento en actividad puede ser debida a la activación de enzimas previamente inactivas o a la síntesis de novo de éstas. Ambos mecanismos parecen operar en tejido herido. Por ejemplo entre las enzimas activadas se ha descrito una ribonucleasa (10), y entre las inducidas se han realizado estudios con fenilalanina-amonioliasa (9), peroxidasa (11) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (12).

La herida de hojas de papa y parenquima de tubérculos de papa lleva a un incremento en la actividad hidrolizante del ARN, esta actividad tiene un máximo a los dos días después de herida reduciendo su actividad a tiempos posteriores. En esta actividad hidrolizante del ARN contribuye: una ARN-asa, una fosfomonoesterasa ácida y una fosfodiesterasa. El posible mecanismo de inducción está aún indefinido (10).

El tejido de tubérculo de papa latente contiene entre 8-11 isoenzimas de peroxidasa, la mayoría en formas aniónicas. El incremento en la actividad total de peroxidasa después de herida del tejido refleja la activación o síntesis de casi todas estas isoenzimas y la aparición de tres de sus nuevas variantes moleculares (11).

La síntesis extensiva de ácidos nucleicos de todo tipo como de coenzimas y ácidos grasos en tejido vegetal herido presupone la acción del ciclo de pentosa fosfato. Este mecanismo se inicia con la acción de dos deshidrogenasas, glucosa-6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, las cuales incrementan su actividad como una consecuencia de herida. Comúnmente la actividad se incrementa con un máximo al primer o segundo día después de herida y luego los niveles caen tanto en tejido de papa como de zanahoria. Este patrón correlaciona muy bien con la evolución de  $^{14}\text{CO}_2$  de la  $^{14}\text{C}$ -1 glucosa administrada (12). En tubérculo de papa blanca 5 isoenzimas de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) contribuyen a la actividad total y parece que la herida incrementa la acción de ellas.

La herida conduce a una rápida e intensa acumulación de una serie de compuestos fenólicos, de entre los cuales el ácido siquímico, el ácido caféico y el ácido clorogénico son los más prominentes. La producción de polifenoles procede alrededor de los 2 o 3 días después del corte del tejido de papa blanca y decrece otra vez (13). Dos enzimas de importancia estratégica en la síntesis de polifenoles, la fenilalaninaamonioliasa y la ácido trans-cinámico 4-hidroxilasa están presentes tanto en tejido de tubérculo intacto como herido. La herida, sin embargo, induce un incremento en actividad de ambas enzimas después de una fase lag de 3 a 6 horas y con un máximo de actividad entre 1 a 2 días después de herida de tejido de papa blanca.

La aparición de la actividad de fenilalanina amonioliase después de herida parece deberse a la síntesis de novo de la(s) enzima(s), como se desprende del uso de inhibidores de síntesis de proteínas, de experimentos por marcado de densidad y de experimentos inmunoquímicos (14).

Estos cambios inducidos por herida en diversas enzimas ha llevado a involucrar también posibles mecanismos de degradación y a ubicarlos en algún tiempo durante la herida; intentando establecer una correlación de inducción-degradación que regule la actividad de las enzimas. Todavía no se conoce nada acerca de la naturaleza de estos mecanismos degradantes, con excepción de algunos experimentos que los sugieren tentativamente (14).

Como ya se ha mencionado, las proteínas con actividad de fenilalaninaamonioliase son sintetizadas de novo después de herida y como una consecuencia su actividad se incrementa considerablemente. Después de llegar a un máximo la actividad decrece. El sistema degradante que se ha estudiado para fenilalanina-amonioliase en cortes de tejido de tubérculo de papa blanca aparece inmediatamente antes de que la enzima llegue a su máximo de actividad y probablemente sea de naturaleza proteínica (14).

Tanaka y Matsushita (9) reportan que el pH óptimo del sistema inactivante fué de 6.0 . Sus estudios previos muestran que la concentración de la enzima cambia paralelamente con la actividad in vivo . Sin embargo estudios inmunoquímicos indican que la inactivación no fue debi-

da a proteólisis. Estos resultados sugieren que las proteínas con actividad de fenilalanina-amonoliasa primero son inactivadas por un sistema de inactivación, y luego la enzima inactiva es rápidamente descompuesta por una proteinasa (9).

Algunas de las enzimas glicolíticas son sintetizadas algunas son degradadas o inactivadas y otras no responden del todo a la perturbación causada por herida. Uno de los más activos catalizadores en tejido de papa latente, fosfoglucomutasa (PGM), se degrada rápidamente después de herida y el proceso de degradación afecta las tres isoenzimas en una forma comparable. Aquí se tiene que aclarar que el término "degradación" en este contexto se usa haciendo referencia a la desaparición de las isoenzimas y no tiene el significado, de que una degradación de proteína haya sido comprobada, y aquí es donde se piensa que la degradación, así entendida, debe estar involucrando la síntesis de proteasas específicas o inespecíficas. Las enzimas proteolíticas específicas y las específicas por grupo ya son bien conocidas como principios degradativos en células de eucariotes. En cualquier evento, las proteasas de alguna forma reconocen, que ciertas proteínas deben degradarse, y otras no. Esto podría explicarse por el hecho de que si las proteínas se asocian con efectores (por ejemplo, sustratos, cofactores), no son susceptibles a degradación proteolítica. Es entonces hasta que el efector es disociado cuando la conformación de la proteína -

cambia a una altamente susceptible; la proteína se reconoce como sustrato y es degradada.

Ya que las proteasas son candidatos prominentes para la destrucción de fosfoglucomutasa, ésta fue sujeta a proteólisis in vitro con objeto de simular un posible mecanismo in vivo. Los resultados revelan una degradación observada de las tres isoenzimas con la consecuente reducción en la actividad, cuando eran sujetas a triptólisis, quimotriptólisis o digestión pronática. Por lo que la degradación de la enzima por varias proteasas asemeja el proceso de degradación in vivo.

El tipo y características de las proteasas involucradas en el fenómeno de herida resulta aún indefinido aunque es seguro que su actividad está involucrada en procesos regulatorios.

Esta actividad regulatoria en la que se han involucrado a las proteasas es tan diversa como su propio mecanismo de acción. Las proteasas se han clasificado en dos grupos: (1) endopeptidasas, aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos internos y, (2) exopeptidasas que hidrolizan proteínas dando aminoácidos libres de extremos carbono o nitrógeno terminales de la cadena polipeptídica. Las peptidasas hidrolizan dipéptidos del extremo C- ó N-terminal y las dipeptidasas, son altamente específicas a dipéptidos.

El término proteasa se usa para describir a todas - las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos, pero se acostumbra llamar a las endopeptidasas proteasas, y a las

exopeptidasas, peptidasas (11), (tabla 1).

La mayoría de las endopeptidasas vegetales parecen ser enzimas sulfhidrilo, aunque recientemente se ha ido incrementando el número de endopeptidasas en tejidos vegetales, que para sus actividades catalíticas no requieren de grupos sulfhidrilo.

Estas enzimas se agrupan en dos grupos: el grupo ácido con pH óptimo de actividad cercano a 3-4, semejante al de la pepsina y un grupo alcalino con un pH óptimo de 8 ó cercano, que se asemeja a las proteasas de serina.

Las proteasas de sulfhidrilo tienen un pH óptimo como enzimas puras, en la región de 5-7, con un peso molecular de 25 000-30 000. En este grupo se incluye a la papaina, con un peso molecular de 23 000, un pH óptimo entre 5.5 y 7.0, la enzima es muy estable a pH neutro, y a temperaturas elevadas; contiene seis enlaces disulfuro y tiene un grupo sulfhidrilo libre, el cual es parte del sitio activo.

Los vegetales aparentemente emplean endopeptidasas sulfhidrilo y ácidas, así como carboxipeptidasas de serina para degradar sus proteínas, mientras que los animales emplean un amplio espectro de enzimas, incluyendo endopeptidasas de serina, endopeptidasas ácidas y metalo carboxipeptidasas.

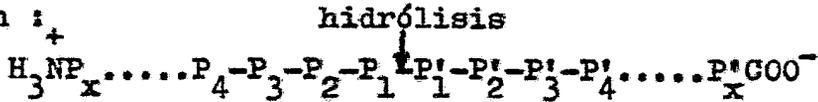
Las enzimas clasificadas como proteasas de serina exhiben un pH óptimo cercano a 8, con un peso molecular cercano a 25 000.

TABLA 1. CLASIFICACION DE PROTEASAS.

Clase	Mecanismo	Ejemplos
Endopeptidasa	Sulfhidrilo	Papaína, ficina, catepsina D.
Endopeptidasa	Serina	Tripsina, quimotripsina, subtilisina.
Endopeptidasa	Acida	Pepsina, catepsina B.
Endopeptidasa	Metalo	Termolisina, proteasas neutras.
Exopeptidasa	Serina	Carboxipeptidasa C y Y.
Exopeptidasa	Metalo	Carboxipeptidasa A y B.

Stumpf, P., Conn, E.: Plant Proteinases. The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Vol. 6 .

Considerando su especificidad (11) éstas se clasifican en :



- a) Las enzimas semejantes a la tripsina que hidrolizan proteínas en los enlaces peptídicos internos donde la lisina y la arginina ocupan los residuos  $\text{P}_1$  de un sustrato proteico.
- b) Las proteasas semejantes a la quimotripsina que hidrolizan en los centros hidrofóbicos de los residuos  $\text{P}_1$  del sustrato, como tirosina o fenilalanina.
- c) Enzimas semejantes a la elastasa que hidrolizan en sitios de pequeños residuos hidrofóbicos, tales como alanina, estando éstos en el sitio  $\text{P}_1$ .

Las proteasas ácidas tienen un pH óptimo alrededor de 2-3. Estas enzimas exhiben especificidades por el sustrato que favorecen el rompimiento entre cadenas grandes laterales hidrofóbicas en los sitios  $\text{P}_1$  y  $\text{P}'_1$  sobre la proteína.

Dentro del grupo de las exopeptidasas se incluyen - las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas.

Las carboxipeptidasas vegetales hidrolizan rápidamente la mayoría de los aminoácidos carbono terminales - de las proteínas y polipéptidos, aunque por lo general la glicina y prolina se hidrolizan a una mayor velocidad. Su pH óptimo está entre 3.5 y 5.5 dependiendo del sustrato.

Las aminopeptidasas tienen un pH óptimo en el intervalo de 6.5 a 10 y se agrupan como neutras y alcalinas dependiendo de su pH óptimo.

Si los cambios enzimáticos inducidos por herida en tejidos vegetales pudiesen ser regulados por actividades proteolíticas, no existen aún resultados en este sentido bien definidos. Esta regulación se podría ejercer por cualquiera de los mecanismos anteriormente propuestos. Por otro lado recientemente las poliaminas han servido como trazadores metabólicos de esta actividad de diferenciación (15).

Cada vez hay más evidencias, que indican que las poliaminas juegan un papel significativo en la biosíntesis, estructura y función de ácidos nucleicos, y que pueden influir en el metabolismo macromolecular, estructura de organelos y ciertos aspectos de crecimiento, desarrollo y senescencia en varios sistemas biológicos, incluyendo vegetales (15).

La putrescina ha sido reportada en algas, hongos y varias especies de plantas superiores (16). La Espermidina ha sido identificada en el alga Chlorella, hojas de tomate y col china (16). Altas concentraciones de espermidina y espermina han sido reportadas en embriones y varias partes de cereales, en semillas de varias Leguminosae, en embriones de zanahoria, en tubérculos de alcachofa de Jerusalem y en semillas de una variedad de plantas superiores (17). La espermidina y espermina también se encuentran como conjugados de un gran número de alcaloides vegetales (16).

El conocimiento sobre la distribución intracelular de poliaminas es escaso, especialmente en vegetales. Son

básicas en la mayoría de los valores de pH celulares y se unen fuertemente a polianiones, pero son también muy solubles en medio acuoso, por lo que se redistribuyen cuando se homogeniza un tejido. A pesar de esta dificultad, la espermina aparece principalmente en el núcleo y las otras poliaminas aparecen unidas a ribosomas principalmente (17).

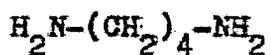
En la figura 1 se muestra la estructura de las poliaminas más comunes de ocurrencia natural.

La putrescina se produce de arginina a través de alguno de los dos mecanismos propuestos en la figura 2.

Por medio de la acción de la arginasa, la arginina puede perder urea, formando ornitina, la cual después se convierte a putrescina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa. Alternativamente, arginina puede ser convertida a agmatina por la enzima arginina descarboxilasa agmatina pierde urea, formando putrescina. Este segundo mecanismo ocurre preferencialmente en vegetales (17). Espermidina y espermina se forman de putrescina por adiciones sucesivas de residuos de amino propilo, derivados de S-adenosilmetionina via S-adenosilmetionina descarboxilasa catalizadas por una amino propil transferasa (16). Por un mecanismo diferente e independiente la cadaverina puede ser formada por descarboxilación de lisina (15).

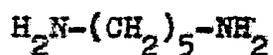
Espersmidina y espermina son catabolizadas por amina-oxidasas que funcionan por una variedad de mecanismos (17).

Por el carácter policatiónico de las poliaminas, ya descrito, se unen fuertemente a polímeros aniónicos; por



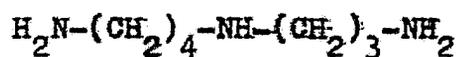
Putrescina

(1,4-diaminobutano)

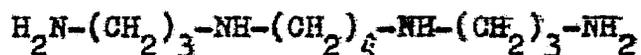


Cadaverina

(1,5-diaminopentano)



Espermidina

(un grupo propilamino adicionado a  
putrescina)

Espermina

(dos grupos propilamino adicionados  
simétricamente a putrescina )

FIGURA 1. Estructura de las poliaminas más comunes de ocurrencia natural.



lo que se asocian a ADN y ARN, y se les reconoce su papel estabilizante de la estructura secundaria de ácidos nucleicos, haciéndolos más resistentes a la degradación por nucleasas y a la desnaturalización térmica (17).

En sistemas libres de células de bacterias y mamíferos, cada etapa en la síntesis de polipéptidos puede ser promovida por la acción de putrescina, espermidina o espermina (16 y 18), mientras que en las mutantes deficientes en poliaminas de E. coli, la adición de poliamina se requiere para la síntesis de proteína. En vegetales la evidencia es limitada, y sugiere una relación análoga entre estas aminas y el metabolismo macromolecular (19).

Los efectos de poliaminas han sido descritos sobre la actividad de la ARN-polimerasa, ADN-polimerasa y ribonucleasa en sistemas bacterianos y de mamíferos. Bajas concentraciones de poliaminas incrementan la actividad de la ARN-polimerasa dependiente de ADN, mientras altas concentraciones de ellas la inhiben (19). En vegetales, espermidina incrementa la actividad de ARN-polimerasa y por otro lado inhibe la actividad y previene la formación de ribonucleasa (20).

Putrescina y aminas relacionadas han sido descritas como factores de crecimiento en algunos microorganismos, líneas celulares de mamíferos y vegetales superiores (16). Poco se conoce acerca del papel bioquímico de las poliaminas en vegetales, aunque una atención en aumento

se les está dando ahora para definir su papel como factores de crecimiento.

Las poliaminas y ácidos nucleicos se han estudiado durante el primer ciclo celular después del rompimiento de la latencia de cortes de tubérculo de alcachofa. Inmediatamente después del rompimiento de la latencia se observa un marcado descenso en el contenido de arginina y glutamina almacenadas, con un correspondiente incremento de poliaminas. Esta primera síntesis de poliaminas ocurre tempranamente durante la fase  $G_1$ , concomitante a la síntesis de ácidos ribonucleicos (21).

En segmentos de hoja de avena, cebada, maíz y trigo, y en discos de hojas de dicotiledoneas, una concentración de 1 a 10 mM de espermina prevenía la pérdida de clorofila después de 48 a 72 horas en la oscuridad. Las actividades de ribonucleasa y proteasas ácidas y neutras que se elevan por efecto del corte de hojas, son detenidas o reducidas a niveles basales por efecto de poliaminas (22).

Los niveles de putrescina, diaminopropano, agmatina y espermidina son altos en hojas jóvenes y declinan con el envejecimiento (22).

Estos datos apoyan las ideas del papel de las poliaminas en la regulación del desarrollo vegetal, aunque mucha de esta información resulta aún circunstancial o casual, se espera acumular más evidencias sobre poliaminas y su correlación con desarrollo, y con los cambios de ac-

tividad de sus enzimas de biosíntesis y degradación.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

### 2.1 Antecedentes .

La herida y el proceso de restablecimiento subsecuente a ésta; sirve como sistema modelo para realizar investigaciones sobre las capacidades de desarrollo de tejidos vegetales, aunque aún permanece incierto, como es que la diferenciación celular inducida en cortes de tejido se puede equiparar a una situación que acontezca en el órgano entero. Células de raíces enteras u órganos de almacenamiento que no están comúnmente expuestos a un ambiente externo, pueden desarrollar una capacidad para la acumulación activa de iones cuando se expone tejido cortado al ambiente externo, adquiriendo la habilidad de diferenciarse a través de un proceso de desrepresión del genoma (23).

Los estímulos primarios que disparan esta desrepresión son aún desconocidos. Se han postulado mecanismos que dependen de aspectos difusionales, involucrando , por ejemplo, - componentes de naturaleza hormonal, o simplemente de la disponibilidad de metabolitos o sustratos, y también se considera que el control se ejerce por un mecanismo global complejo que involucra todo un conjunto de factores de los cuales algunos se han caracterizado y otros se desconocen - (24).

El corte y lavado de tejido vegetal definitivamente tiene un efecto drástico sobre el intrincado sistema de comunicación celular, y las marcadas diferencias en las res-

puestas pueden deberse a que el tejido sea lavado o meramente dejado en una atmósfera húmeda (23).

Van Steveninck (23) comparando las estructuras citoplásmicas en células parenquimatosas de tejido de betabel in situ con células parenquimatosas en cortes que habían sido incubados por varios períodos de tiempo; encontró que la extensión del retículo endoplásmico se reducía drásticamente a vesículas citoplásmicas pequeñas - inmediatamente después del corte y lavado del tejido, mientras que después de 24 horas seguía una reorganización a un sistema lamelar que se prolongaba hasta las 48 horas. Esto resulta de interés ya que la fracción microsomal aislada de cortes de tejido incubado poseían una capacidad mayor para sintetizar proteína comparada con fracciones de tejido fresco de betabel o de tejido de alcachofa de Jerusalem (25), los cuales fueron prácticamente inactivos. Se desconoce con que extensión el incremento en la eficiencia se deba a cambios moleculares especialmente asociados a células meristemáticas; o producidos previamente al establecimiento de la célula meristemática.

Por otra parte cada vez hay más evidencias que indican que las poliaminas podrían jugar un papel significativo en la biosíntesis, estructura y función de ácidos nucleicos, de tal manera que por ejemplo, la espermina estabiliza marcadamente la estructura terciaria del ARN de transferencia, lográndose los mejores cristales de es-

te ácido ribonucléico en presencia de espermina (16). Las poliaminas estabilizan también la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, haciéndolos más resistentes a la degradación por nucleasas y a la desnaturalización térmica (17), afectan la síntesis de proteínas (18), así como la estructura y estabilización de organelos. Se ha visto que estabilizan protoplastos contra la lisis (20) e influyen en ciertos aspectos de crecimiento y desarrollo, al incrementar, por ejemplo, la frecuencia de divisiones mitóticas en protoplastos de hoja de cebada (17), y se ha descrito su participación en senescencia en varios sistemas vegetales, en donde el proceso se manifiesta por una reducción en el contenido de proteína, ácidos nucleicos y clorofilas (20). Las poliaminas resultan potentes inhibidores de senescencia en protoplastos de mesófilo de cebada y en tejido de hojas de varias mono y dicotiledóneas (17).

La información disponible en la que se involucre la existencia y papel de las enzimas proteolíticas durante la herida resulta aún indefinible; sin embargo se ha intentado definir si las enzimas proteolíticas son las responsables de la regulación de la actividad enzimática en tejido herido, tal es el caso de las investigaciones en relación a un posible sistema inactivante de naturaleza proteínica sobre la actividad de fenilalanina-amonioliasa; esta enzima incrementa su actividad drásticamente después de un período lag de cerca de 3 horas, en tejido

de raíz de papa, en respuesta a herida, alcanzando su máximo de actividad alrededor de las 12 horas y declinando en tiempos posteriores (9). Experimentos preliminares trataron de demostrar la existencia de actividad proteolítica en este tejido pero se encontró que ésta no se modificaba en respuesta a herida bajo las condiciones de estudio (9) Aún así es posible postular un sistema inactivante mediante una proteasa específica que catalice una proteólisis - limitada de fenilalanina-amonioliasa como lo hacen un grupo de proteasas esnecíficas en animales (26).

## 2.2 Objetivos.

Con estos antecedentes en mente nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo : Si la respuesta de herida es una forma de despertar el tejido en relación a crecimiento; el contenido de poliaminas y la actividad proteolítica deben estar correlacionados.

El objetivo de este trabajo ha sido el determinar el contenido de proteína, poliaminas, aminoácidos y actividad proteolítica durante los cambios metabólicos inducidos por herida en tejido de papa.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Materiales.

##### 3.1.1 Reactivos .

Azocaseína (sulfanilamida azocaseína), hemoglobina (bovina, sustrato para proteasa), ácido D-isoascórbico, espermina (tetraclorhidrato), espermidina (diclorhidrato), L-prolina, L-lisina, ácido L-glutámico, putrescina, albúmina bovina. - (Sigma).

Tris (hidroximetilaminometano), 2-mercaptoetanol, ácido tricloroacético, tritriplex II, cloruro de potasio, peptona, extracto de levadura, agar, metil-celolve, etanol absoluto, ninhidrina - (Merck).

Sacarosa, hidróxido de sodio, n-propanol, ácido perclórico. - (J.T. Baker).

Sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, fosfato de potasio, mono y dibásico - (Técnica Química).

Cloruro de magnesio, ácido cítrico monohidratado, cloruro de estaño (II) . - (Productos Químicos Monterrey).

Resina AG 50W-I4 (100-200 mallas) .- (Bio-Rad).

Cloranfenicol .- (Boehringer Mannheim GmbH).

##### 3.1.2 Material biológico.

Papas alfa de tamaño mediano, obtenidas del comercio. Los tubérculos fueron firmes, sin signo de brotamiento, por consiguiente en estado fisiológico latente.

## METODOLOGIA

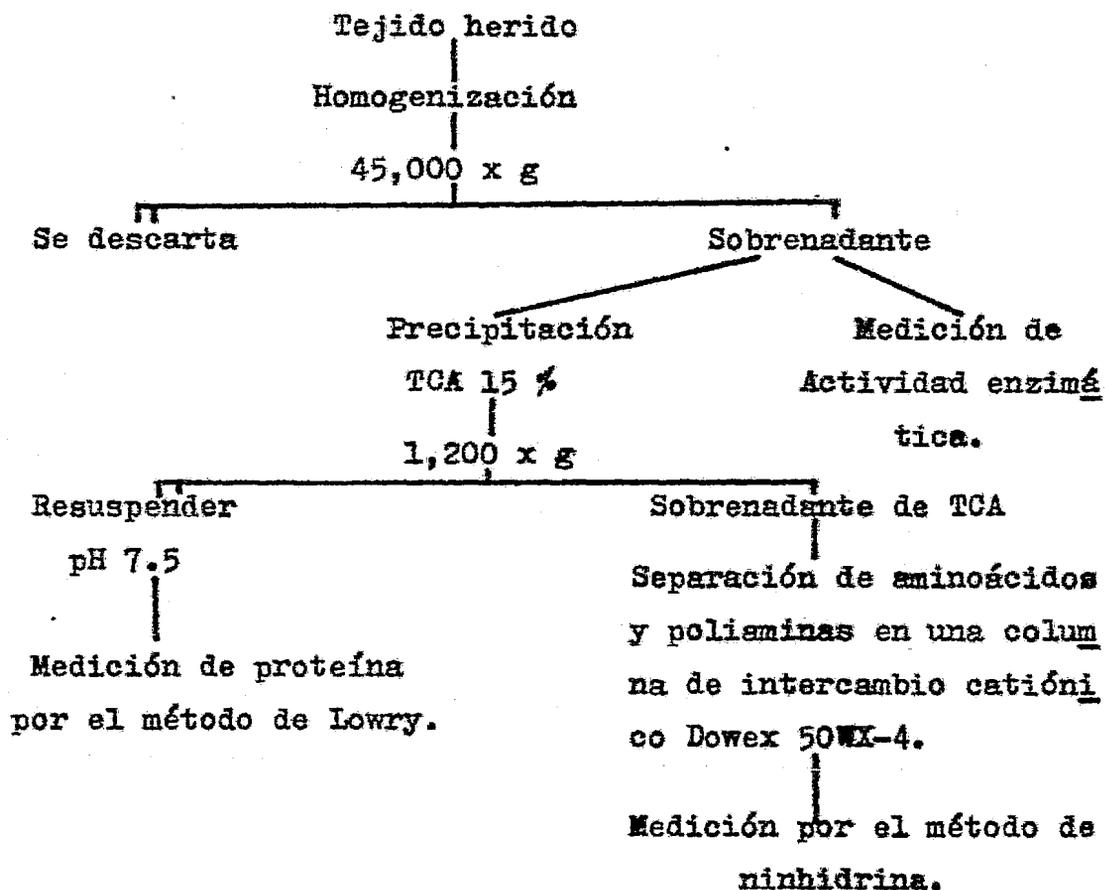


FIGURA 3. Metodología empleada para la extracción de proteína, aminoácidos, poliaminas y proteasas.

### 3.2 Metodología.

#### 3.2.1 Sistema de herida.

El sistema de incubación de tejido herido fue el denominado sistema de cámara húmeda, modificación del sistema de Kahl (27).

El tubérculo es lavado primero con agua corriente, seguido de un lavado con una solución de cloralex al 10 % (v/v) y posteriormente un lavado exhaustivo con agua destilada estéril sobre la superficie del tubérculo. Las manipulaciones fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar, donde las papas son cortadas en discos de 19 mm de diámetro y 3 mm de espesor usando un rebanador comercial de papas, y un cilindro de aluminio del diámetro deseado, ambos estériles.

Los cortes en discos fueron colocados en frascos Gerber estériles y se procedió a pesar una cantidad equivalente a 9 g de tejido fresco. Los discos ya pesados se lavaron tres veces con agua estéril, escurridos y colocados sobre papel filtro mojado, colocado a su vez sobre una esponja que contiene 10 ml de agua estéril, y 50 microgramos por mililitro de cloranfenicol todo esto contenido en una caja de Petri estéril (3 x 12 cm) que constituye el sistema de incubación denominado cámara húmeda.

Las cajas de Petri se colocaron en una incubadora a  $26 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , a diferentes tiempos de incubación, bajo iluminación constante. Este proceso se reconoce como el sistema que produjo respuesta de herida.

Los discos frescos como heridos incubados a diferentes tiempos, son sujetos a control microbiológico; el cual se

realizó tanto con un disco muestra como con el agua residual de la cámara húmeda. El control microbiológico se realizó en cajas de Petri, sobre un medio de cultivo sólido, - constituido por: peptona (0.4% p/v), extracto de levadura - (0.5% p/v), acetato de sodio (0.2% p/v) y agar (1% p/v). - Las cajas se incubaron a 35° C durante 48 horas y posteriormente durante 72 horas a 25° C. Toda muestra que presentase contaminación era desechada.

### 3.2.2 Extracción y determinación de Proteína.

El tejido fresco o herido, incubado según el tiempo - especificado, se lavó con agua estéril y se colocó en un - frasco de homogenización especial del homogenizador Virtis; donde se le adicionaban 12 ml de buffer extractor constituído por Tris-HCl 0.15 M pH 7.5, K-EDTA 1 mM, sacarosa 0.5 M, mercaptoetanol 4 mM, ácido isoascórbico al 1 % p/v, y se - homogenizaba en la posición 20 del regulador de velocidad del homogenizador durante 3 minutos, con 2 minutos de intervalo entre cada uno de ellos. El homogenizado se mantubó - a 4°C.

El homogenizado es filtrado sobre tres capas de gasa y recolectado en un tubo de centrifuga (policarbonato, con capacidad de 30 ml), previamente enfriado en hielo. Se centrifugó a 45,000 x g (23,000 rpm aproximadamente) por 20 - minutos en el rotor 30 de la centrifuga Spinco-Beckman L-50 a 4°C. El sobrenadante se recolectó por decantación en un tubo de centrifuga graduado y se midió el volumen recolectado, pasos que se realizaron a 4°C. Este sobrenadante

se colocó en un tubo de ensaye previamente enfriado en hielo y etiquetado, y se empleó inmediatamente o se conservó en el congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Una fracción de 1 ml de este sobrenadante es precipitado con ácido tricloroacético sólido para llegar a una concentración final de 15 % p/v en solución, se agitó hasta la total disolución del ácido tricloroacético, y se dejó reposar por un intervalo de 1 a 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 3,500 rpm por 15 minutos en una centrífuga clínica, el sobrenadante ácido se guardó en un refrigerador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y el pellet se resuspendió en Tris-HCl 0.05 M pH 8, y neutralizó a este mismo pH con solución 1 M de Tris base, el pellet completamente disuelto sirvió como fuente para medir proteína por el método de Lowry (28).

Todas las determinaciones de las metodologías descritas y por describir fueron realizadas por duplicado y en 3 extractos de diferentes preparaciones.

### 3.2.3 Determinación de Aminoácidos y Polisaminas.

Una alícuota del sobrenadante ácido, resultante de la precipitación con ácido tricloroacético de la proteína, se neutralizó por la adición de KOH 1 M, y se determinó el contenido de compuestos que reaccionan con ninhidrina (30).

Una cantidad equivalente en volumen a 100 densidades ópticas de ninhidrina, del sobrenadante ácido ya descrito, se aplicó a una columna de intercambio catiónico Dowex 50W-X4 (0.5x9 cm), modificación del método de Raymondjean, M. ,

(29), que ha sido previamente equilibrada con una solución de HCl 0.05 M; se lavó entonces con esta misma solución hasta recolectar un volumen total de 15 ml que corresponde a la fracción no unida a la columna de este sobrenadante ácido, cuyo pH es de 2. Se aplicó un buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8 y 0.25 M de KCl para la elución de aminoácidos al cambio de pH.

La elución con otro buffer fosfato de potasio 20 mM - pH 8 y 3.0 M de KCl permite recolectar fracciones donde e-luyen las poliaminas. Tanto las fracciones eluidas con 0.25 M (aminoácidos) y 3.0 M (poliaminas) de KCl, se cuantificaron por el método de ninhidrina.

#### 3.2.4 Determinación de Actividad Proteolítica.

Para determinar la actividad proteolítica (31) se utilizó un extracto crudo enzimático (una fracción del sobrenadante de 45,000 g del homogenado de tejido fresco o tejido herido incubado según el tiempo especificado). Este extracto se dializó previamente contra buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6, K-EDTA 1 mM, mercaptoetanol 4 mM por toda la noche.

Al extracto dializado se le determinó el contenido de proteína por Lowry, y una concentración equivalente en volumen a 0.46 mg de proteína por ml de sistema de reacción, es la que se empleó para medir actividad proteolítica tanto en extractos crudos como de algún otro paso de purificación. El sistema de reacción contenía azocaseína como sustrato en concentración de saturación para la enzima.

El sistema estaba constituido por buffer fosfato de potasio 56 mM pH 5.7, azocaseína 4 mg/ml disuelta en el buffer anterior y ditiotreitol 1 mM.

Después de adicionada la enzima, al tiempo cero se tomaba una alícuota de la mezcla de reacción, la cual se detenía adicionando ácido perclórico al 14 % (v/v) hasta una concentración final del 7 % (v/v) a 4°C. Los tubos para la medición de actividad proteolítica se incuban a 40°C a diferentes períodos de tiempo, al término de los cuales se precipitaban en igual forma que el blanco y se dejaban sedimentar a 4°C durante una hora. Después de este tiempo se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos en una centrifuga clínica; el sobrenadante se recolectó por decantación y se midió inmediatamente el cambio de densidad óptica a 340 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de espesor en un espectrofotómetro Carl Zeiss. La actividad específica medida, se definió como el cambio en 0.001 D.O. a 340 nm por hora por mg de proteína.

Cuando se utilizó albúmina bovina como sustrato esta fue previamente desnaturalizada (10 minutos a ebullición), empleándose a una concentración de 0.1 % p/v, en algunas ocasiones se usó hemoglobina, sustrato para proteasa, en solución al 2 % p/v ambas proteínas fueron disueltas en el mismo buffer en el que fue disuelta azocaseína, modificación del método de Tanaka, Y. (9).

El sistema de medición de actividad proteolítica fue exactamente igual al utilizado con azocaseína como sustrato.

Con estos sustratos la determinación difirió en cuanto a que la reacción enzimática se detuvo por la adición de una solución de ácido tricloroacético al 30 % p/v para obtener una concentración final del 15 % en solución, a 4°C. El sobrenadante se neutralizó con NaOH 1 M y en él se midió por el método de Lowry la L-tirosina liberada.

### 3.2.5 Purificación de la actividad proteolítica.

La enzima se purificó fraccionando la proteína por precipitación con sulfato de amonio. Una fracción de sobrenadante de 45,000 g (obtenido como se describe en 3.2.2) de tejido herido incubado durante 48 horas, se fraccionó con sulfato de amonio sólido hasta un 10 % de saturación (32), se dejó reposar por una hora, y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos en tubos de policarbonato, el sobrenadante se recuperó por decantación y el pellet se resuspendió en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6, K-EDTA 1 mM, mercaptoetanol 4 mM, y se mantuvo a 4°C. Al sobrenadante se le determinó el volumen en un tubo de centrífuga graduado y se adicionó HCl 1 M hasta obtener un pH entre 5 y 6, seguidamente se adicionó sulfato de amonio en una cantidad equivalente a un 40 % de saturación, se dejó reposar por una hora, siguiéndose después el mismo procedimiento de obtención del sobrenadante de 10 % de saturación.

El sobrenadante con 40 % de saturación con sulfato de amonio se siguió fraccionando a un 80 % y después al 100 % de saturación con sulfato de amonio.

Los pellets resuspendidos en buffer fosfato de potasio

50 mM pH 6, K-EDTA 1 mM, mercaptoetanol 4 mM , de las diferentes fracciones fueron dializados exhaustivamente durante la noche contra el buffer en que se disolvieron, y a alícuotas de cada una de estas fracciones se les determinó el contenido de proteína por el método de Lowry, y se les midió también la actividad proteolítica utilizando las condiciones de medición especificadas en el punto 3.2.4 .

### 3.2.6 Efecto de los componentes de la reacción en el sistema de medición de actividad proteolítica.

Los efectos de los componentes de la reacción para medir actividad proteolítica se determinaron utilizando muestras de extractos de tejido herido, por 48 horas de incubación; a los que se les realizó un fraccionamiento de proteína del 10 al 40 % de saturación con sulfato de amonio sólido (según condiciones del punto 3.2.5 de este capítulo), a excepción del extracto empleado para el caso del inciso (a), en el que se utilizó un extracto crudo. En lo que respecta a las condiciones de medición de actividad proteolítica fueron las mismas especificadas en el punto 3.2.4, usando Azocaseína como sustrato.

Los efectos estudiados fueron los siguientes:

(a) Diálisis. Se comparó la actividad específica de la proteasa presente en un extracto crudo (sobrenadante obtenido - en el punto 3.2.2) sin dializar y habiendo dializado previamente.

(b) Agentes reductores ( mercaptoetanol y ditiotreitól). Se comparó la actividad específica de la proteasa, en una fracción de proteína precipitada del 10-40% de saturación con - sulfato de amonio sólido, presente en una muestra de esta - fracción dializada en ausencia de agentes reductores y en un

sistema de reacción para medir actividad proteolítica que también carecía de ellos, contra el sistema cuyas condiciones ya fueron establecidas (punto 3.2.4 ).

(c) K-EDTA. Se comparó la actividad específica de la proteasa presente en la fracción mencionada, cuando una muestra de ella era dializada en ausencia de K-EDTA contra otra muestra de esa misma fracción tratada bajo las condiciones normales ya establecidas. A otra muestra de esta fracción se le midió la actividad proteolítica variando la concentración de K-EDTA en el sistema de reacción a 5 mM y se comparó también su actividad específica con la muestra medida bajo las condiciones normales ya establecidas.

(d) Concentración de fosfato de potasio. Se incrementó la concentración total de buffer fosfato a 100 mM en el sistema de reacción y se midió la actividad proteolítica. La actividad específica fue comparada con el sistema establecido.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### 4.1 Resultados.

##### 4.1.1 Contenido de proteína en tejido herido.

Con el objeto de definir si el sistema de incubación de tejido herido funcionaba de acuerdo a la respuesta esperada, es decir en un incremento en el contenido de proteína, se procedió a determinar y cuantificar el contenido de proteína a diferentes tiempos de incubación de tejido herido.

La cuantificación de proteína fue hecha utilizando el método de Lowry y en la figura 4 se muestra la curva patrón de proteína utilizando albúmina bovina como control, de la cual fueron interpolados los resultados en todos los casos que posteriormente se mencione. La tabla 1 muestra el contenido de proteína en donde se indica la desviación estandar de algunos tiempos de incubación de tejido herido. Para la apreciación de estos datos en forma diferente se han utilizado los mismos para la obtención de la figura 5.

Los resultados revelan, en cuanto al contenido de proteína se refiere, que el tejido herido mantiene el contenido de proteína en las primeras horas de incubación; observándose que aproximadamente a las 6 horas de incubación el contenido de proteína se incrementa notablemente ( 175 % ), y este incremento se mantiene aproximadamente hasta las 24 horas, después de las cuales el contenido de proteína decae a los niveles basales, y aún

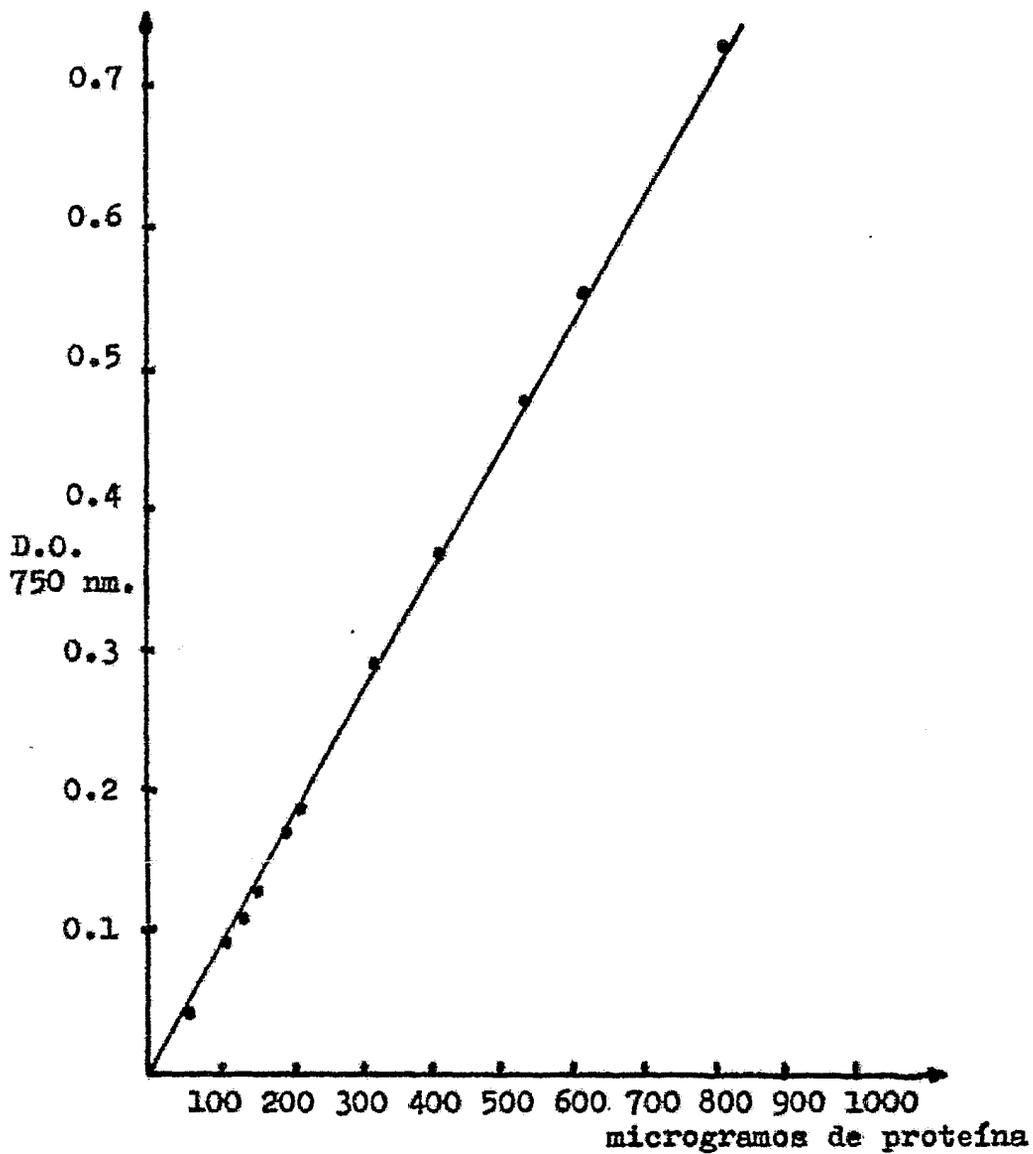


FIGURA 4. Curva patrón de protefna. Determinación por el método de Lowry, usando albúmina bovina como control.

por debajo de ellos (68 %) después de las 48 horas de incubación.

Estos resultados permitieron comprobar que el sistema de incubación denominado "cámara húmeda" funcionaba adecuadamente en tanto a la respuesta de herida esperada, es decir en una activación de la síntesis de proteínas, que se vería reflejada en un incremento en el contenido de proteína, incremento que se hace notable a las 6 horas de incubación de tejido herido y que se mantiene aproximadamente hasta las 24 horas de incubación. Además, los cambios en el contenido de proteína podían ser debidos a una actividad proteolítica en el tejido herido, principalmente en horas posteriores a las 24 horas de incubación de tejido herido, donde la reducción en el contenido de proteína alcanza un 68 % por debajo de los niveles basales. Este aspecto se estudió posteriormente.

#### 4.1.2 Contenido de aminoácidos y poliaminas en tejido herido.

Con el objeto de determinar los cambios en el contenido de poliaminas (uno de los objetivos de este trabajo) se procedió a la calibración de una columna de intercambio catiónico para definir el patrón de elución de éstas. La columna permite retener poliaminas debido a su naturaleza policatiónica, sin embargo, el extracto de tejido - que se aplicaba a las columnas de intercambio catiónico contenía no sólo poliaminas sino otras especies cuya naturaleza podía ser también catiónica, como el caso de aminoácidos; por lo que se requería de una separación e-

TABLA 1. CONTENIDO DE PROTEINA EN TEJIDO HERIDO DE  
Solanum tuberosum L.

Tiempo de incubación (horas)	mg de proteína g de tejido fresco
0	2.76 ± 0.37
3	2.97
6	4.83 ± 0.36
9	3.67
14	3.24
18	3.73 ± 0.33
24	3.77 ± 0.41
30	2.93
48	3.15 ± 0.51
72	1.88 ± 0.44
120	1.98 ± 0.56

La proteína se precipitó con ácido tricloroacético al 15 % de una fracción de sobrenadante de 45,000 g (punto 3.2.2 del capítulo de Parte Experimental); el sedimento obtenido de centrifugar a 1,200 g se resuspende en Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 y se determina por el método de Lowry, el contenido de proteína se extrapola de la figura 1.

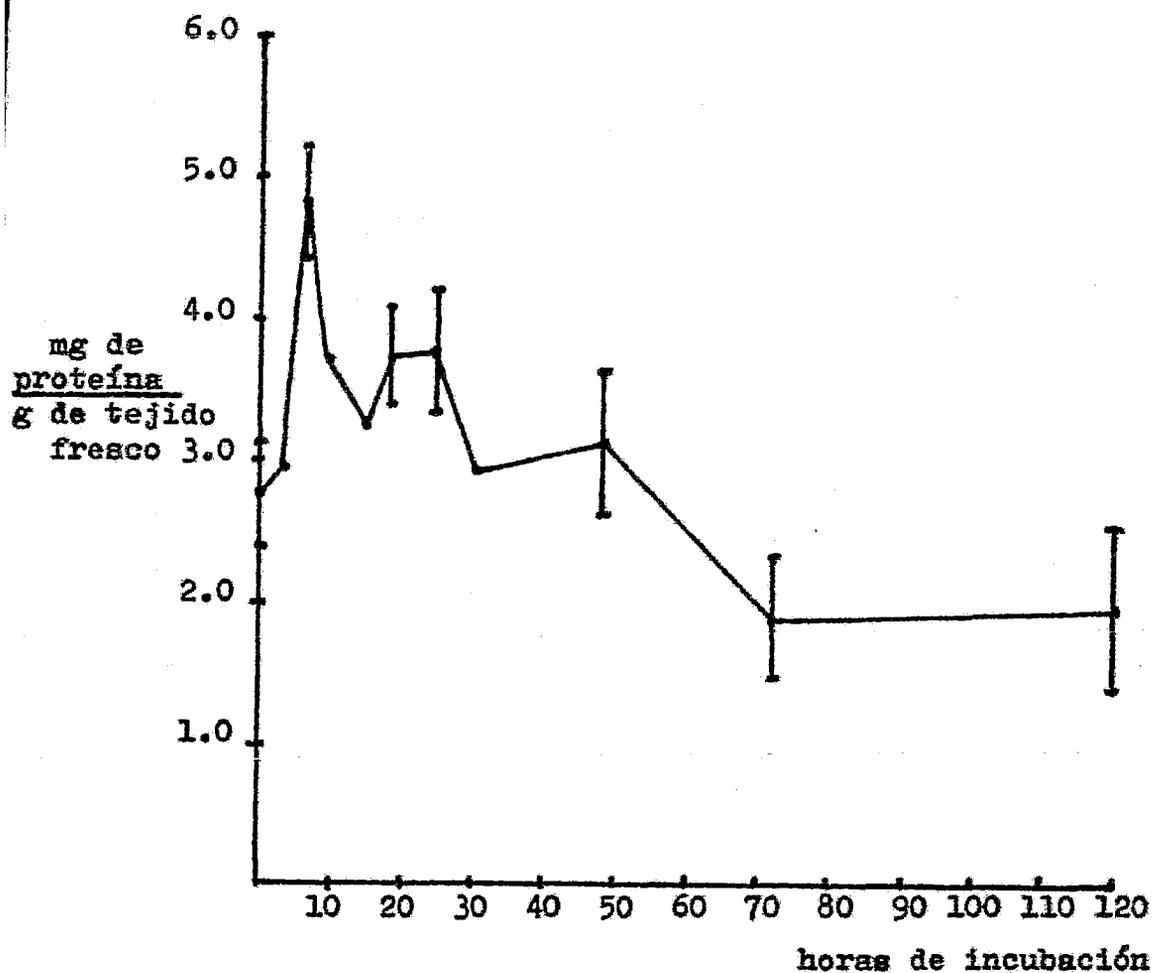


FIGURA 5. Contenido de proteína en tejido herido de *Solanum tuberosum* L. El contenido de proteína fue determinado por el método de Lowry, interpolando de la figura 1.

fectiva y bien definida en primer lugar entre aminoácidos y poliaminas, además de asegurar un rango de separación entre aquellos aminoácidos básicos, de mayor carácter catiónico que los otros aminoácidos, y las poliaminas. De esta manera mientras se lograba la cuantificación de los contenidos de poliaminas a lo largo de la incubación de tejido herido, se obtendría también un perfil de la misma naturaleza del contenido de aminoácidos, información que sería complementaria a la obtenida de la actividad proteolítica que permitiera interpretar la reducción en el contenido de proteína ya mencionado anteriormente, después de las 24 horas de incubación de tejido herido.

Para lograr este objetivo, cuantificación de aminoácidos y poliaminas totales, hubo primeramente la necesidad de determinar varios controles previos para la obtención de resultados. Entre estos controles se hicieron curvas de calibración de la columna de intercambio catiónico como se muestran en las figuras 6, 7 y 8; donde se definen los patrones de elución en forma independiente para cada aminoácido señalado (figura 6), para las poliaminas señaladas (figura 7); así como el patrón de elución de una mezcla de prolina, arginina y espermidina (figura 8).

La columna de intercambio catiónico fue calibrada con aminoácidos neutros y básicos; encontrándose que los patrones de elución de los aminoácidos neutros, como leucina y prolina, no variaban significativamente, elúan al

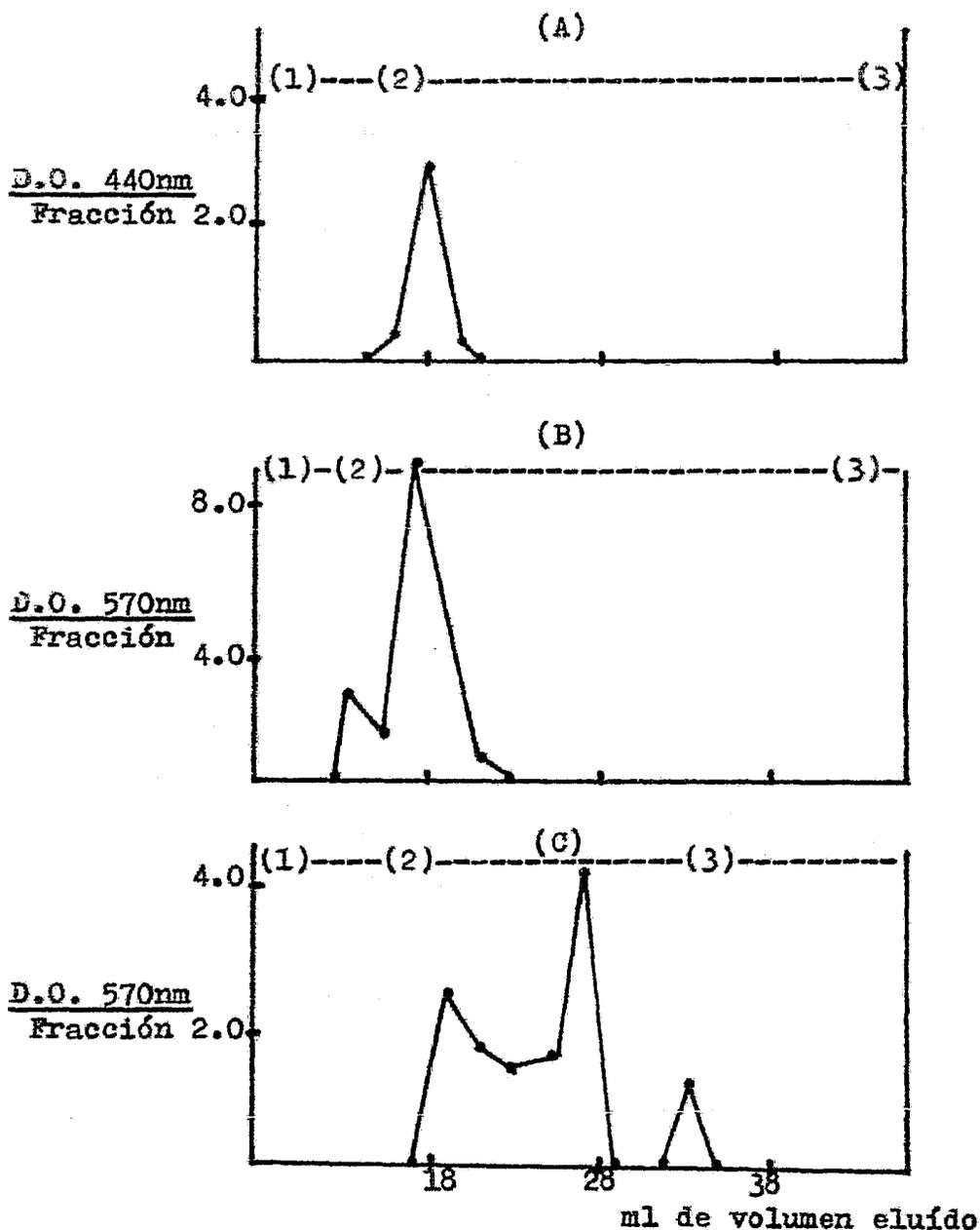


FIGURA 5. Patrones de elución de aminoácidos. Se utilizó una columna de intercambio catiónico Dowex 50W-X4 de 0.5 por 9.0 cm (Raymond Jean, M. 1979). Patrones de elución de : (A) Prolina 3 D.O. (2 micromoles), (B) Leucina 14 D.O. (4 micromoles) y (C) Arginina 12 D.O. (3 micromoles). El orden de eluyentes fué: (1) Lavado con HCl 0.05M, fracciones no unidas, (2) buffer fosfato de potasio 20 mM pH 5.0-0.25M de KCl, elución de aminoácidos al cambio de pH, (3) buffer anterior, con 3.0 M de KCl.

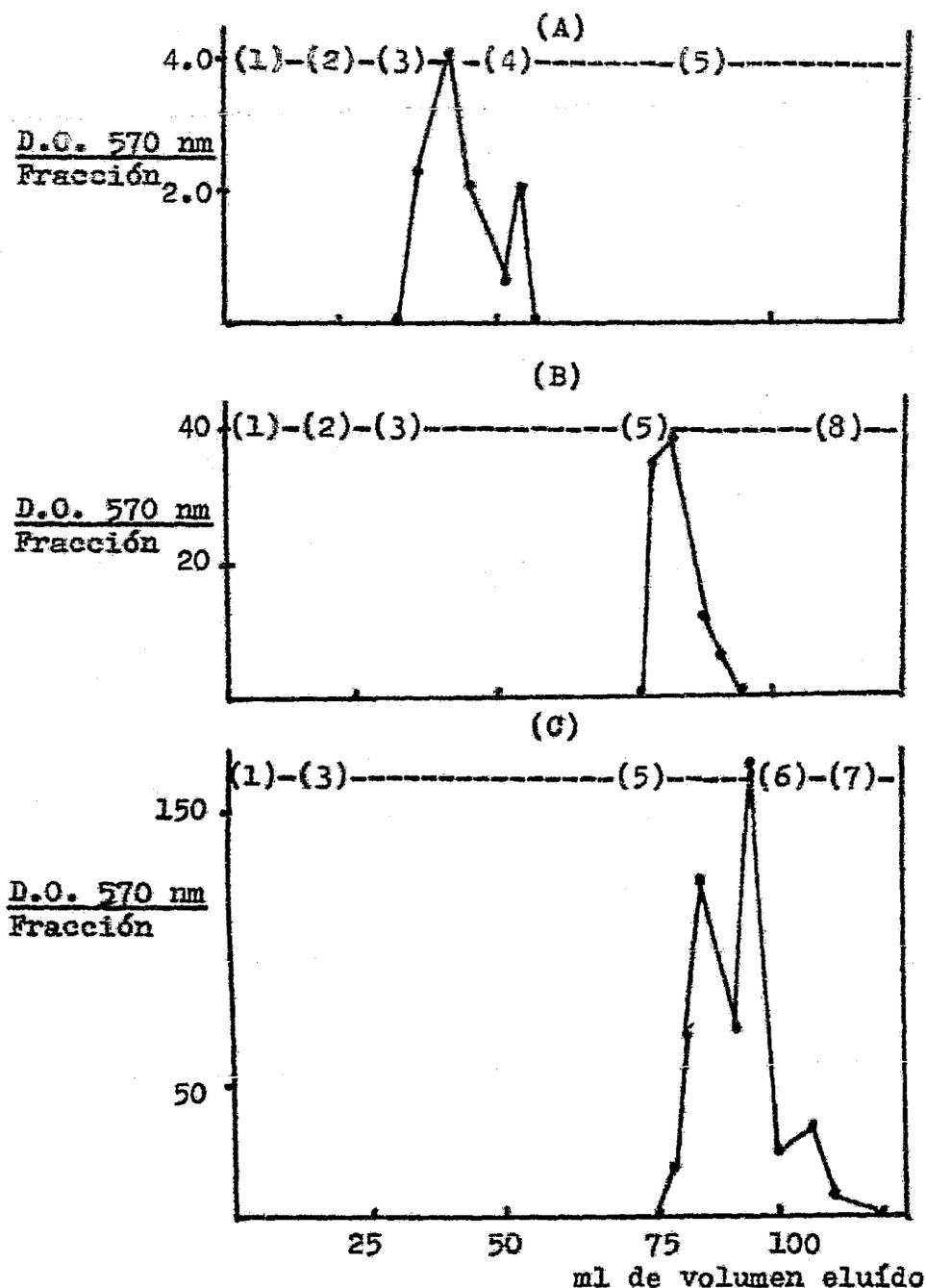


FIGURA 7. Patrones de elución de poliaminas en una columna de intercambio catiónico, Dowex 50WX-4, 0.5 x 9.0 cm, (Raymondjean M., 1979). Patrones de elución de: (A) Putrescina 11 D.O. (1 micromol), (B) Espermidina 91 D.O. (16 micromolas), (C) Espermina 530 D.O. (64 micromolas). Eluyentes: (1) HCl 0.05 M; (2) al (8) buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0 con: (2) 0.25 M de KCl, (3) 1 M de KCl (4) 1.25 M de KCl, (5) 2.0 M de KCl, (6) 2.25 M de KCl, (7) 2.5 M de KCl, (8) 3.0 M de KCl.

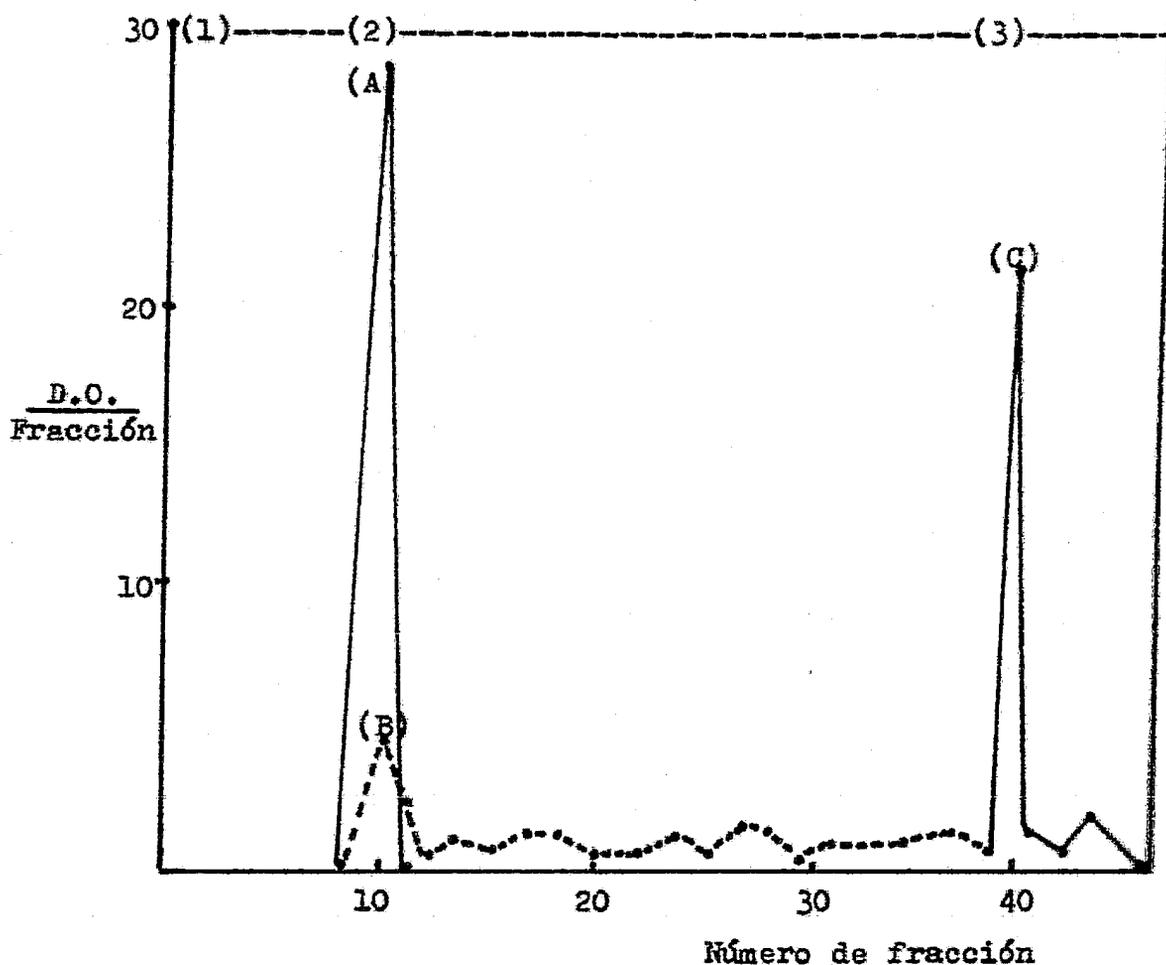


FIGURA 8. Patrón de elución de mezcla de aminoácidos y una polizmina en una columna de intercambio catiónico - Dowex 50WX-4, como en la figura 4. (A) Prolina 35 D.O. / 440 nm (29.2 micromolas), (B) Arginina 39 D.O. 570 nm - (23.6 micromolas), y (C) Espermidina 26 D.O. 570 nm - (4.5 micromolas). Orden de eluyentes: (1) HCl 0.05 M, - (2) buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 0.25 M de KCl y (3) buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl.

cambio de pH 2 a 8, con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl, como se observa en la figura 6. En cambio el aminoácido básico, arginina, se retuvo con más fuerza en la columna cuando el lavado con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl era limitado, ocasionando con esto que parte de este aminoácido se eluyese con 3.0 M de KCl (figura 6, C); por lo que se decidió lavar exhaustivamente con el buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl, lo que permitió eluir casi completamente a arginina, -previamente a la elución de las poliaminas con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl. Esta separación se confirmó al observar los patrones de elución que se obtuvieron con poliaminas.

El estudio de los patrones de elución de poliaminas (figura 7), muestra que las poliaminas eluyen a concentraciones más altas de 0.25 M de KCl: putrescina eluye con 1 M de KCl, aproximadamente, en buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0, espermidina eluye con 1.25 M de KCl, en el buffer anterior y espermina empieza a eluir en el buffer anterior con 2.0 M de KCl y termina eluyendo con 2.25 M de KCl; concluyendo, la elución con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl lograba eluir el contenido total de poliaminas de extractos de tejido, habiendo separado perfectamente con anterioridad a los aminoácidos, ya que definitivamente ninguno de ellos eluía a esta concentración de KCl.

Cuando se realizó un cromatograma empleando una mezcla de prolina, arginina y espermidina; se pudo com-

probar con toda claridad que la conclusión anteriormente descrita era cierta, ya que los dos aminoácidos eluían al cambio de pH con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0 - 0.25 M de KCl y un lavado exhaustivo permitían separar - arginina, aminoácido que más se retiene a la columna, de la poliamina, espermidina, que eluía con buffer fosfato 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl (figura 8).

Se realizaron curvas patrón por el método de ninhidrina tanto para aminoácidos como para poliaminas, ya - que cada especie tiene diferente absorptividad molar como puede observarse en las figuras 9, 10 y 11.

Al mismo tiempo que se establecía el método para la separación de aminoácidos y poliaminas haciendo uso de - la columna de intercambio catiónico, se establecía tam- bién la capacidad de retención de la resina ocupada por el tamaño de la columna usada. La capacidad de retención de la columna se determinó en base al análisis de dos as- pectos: el contenido de compuestos que daban reacción con ninhidrina y que eran recolectados en las fracciones del lavado con HCl 0.05 M, y la sensibilidad de detección por el método de ninhidrina de las poliaminas eluidas con - buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl. Cuando se aplicaban a la columna de intercambio catióni- co menos de 100 D.O. de ninhidrina en su equivalente en volumen de extracto ácido de tejido, lo que se observa- ba era que la sensibilidad de detección de poliaminas se reducía por el método de ninhidrina; y que cuando se a- plicaban más de 100 D.O. de ninhidrina se observaba que

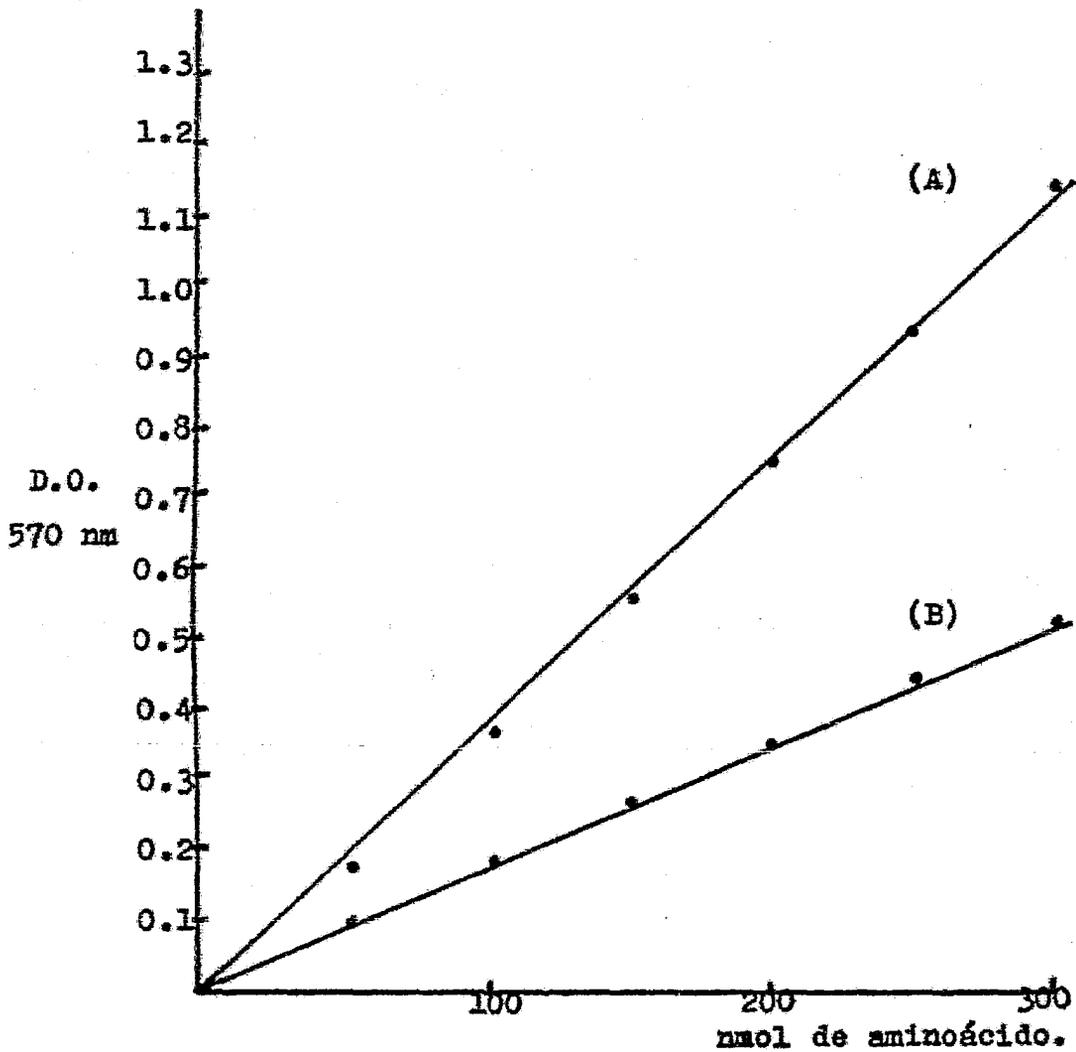


FIGURA 9. Curvas patrón de aminoácidos. Usando como - control: (A) L-Leucina y (B) L-Arginina, determinados por el método de Ninhidrina.

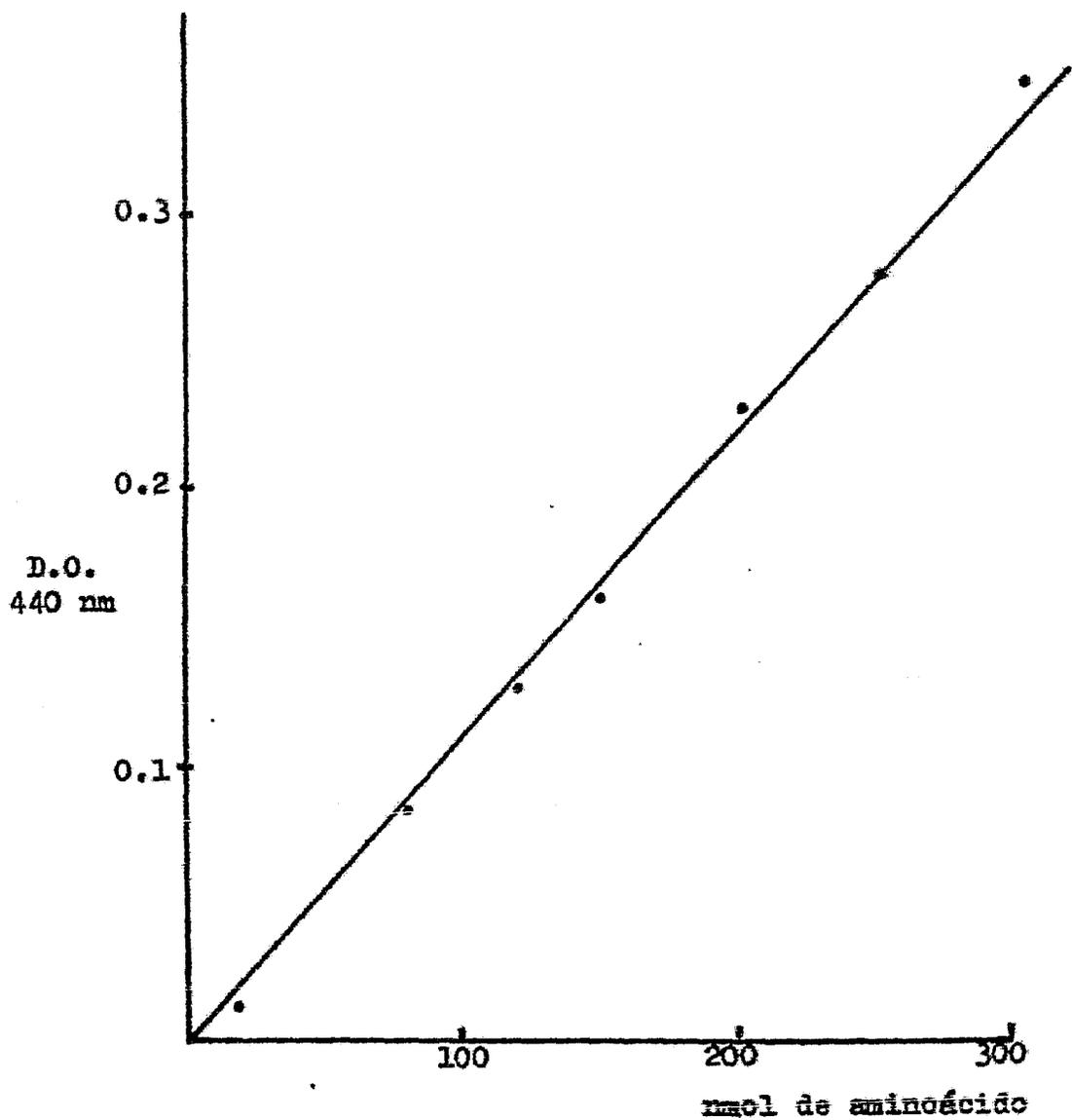


FIGURA 10. Curva padrão de L-Prolina determinada por el método de Ninhidrina a 440 nm.

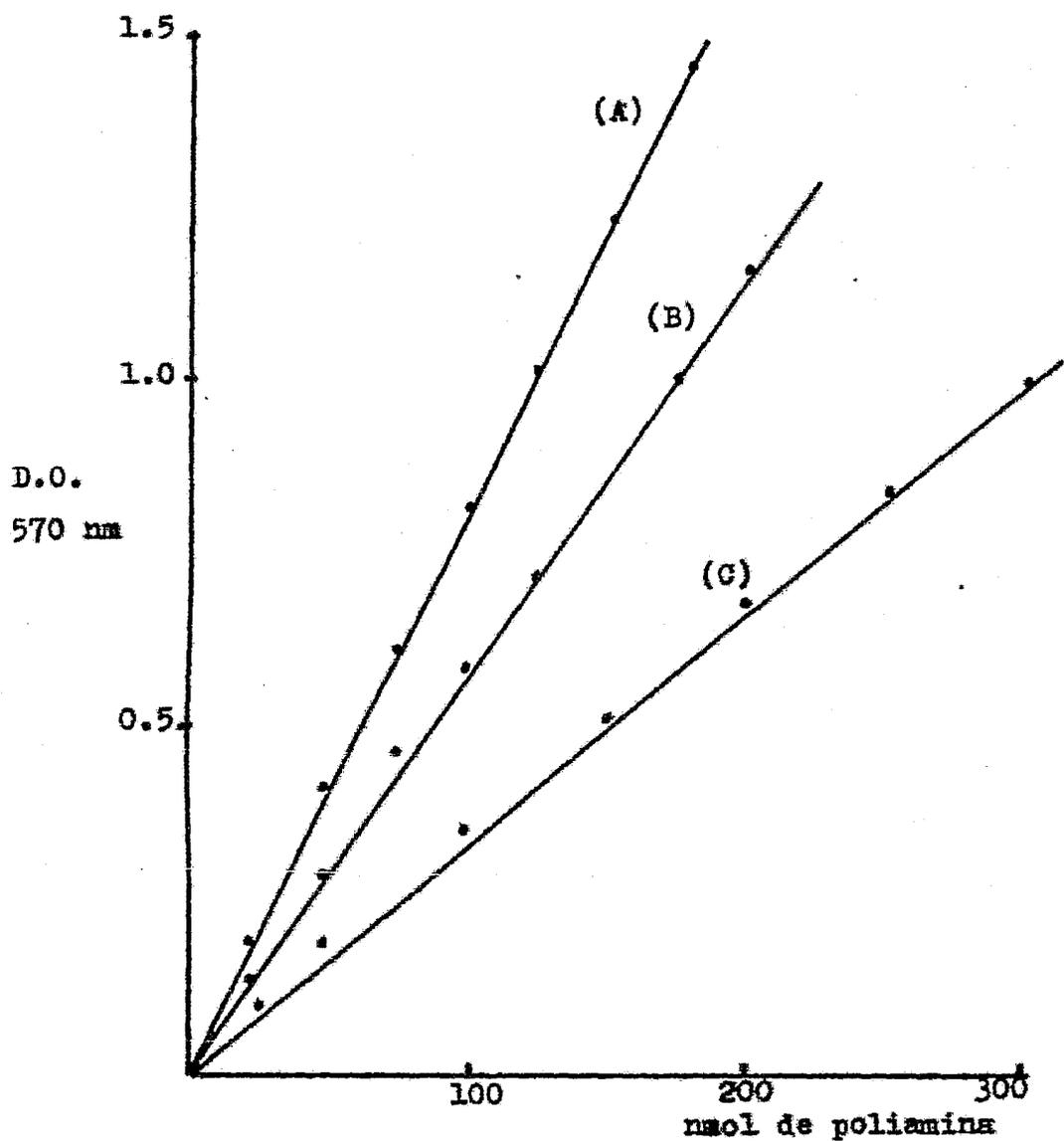


FIGURA III.- Curvas patrón de poliaminas: (A) Espermina, (B) Espermidina, y (C) Putrescina; determinadas por el método de Ninhidrina.

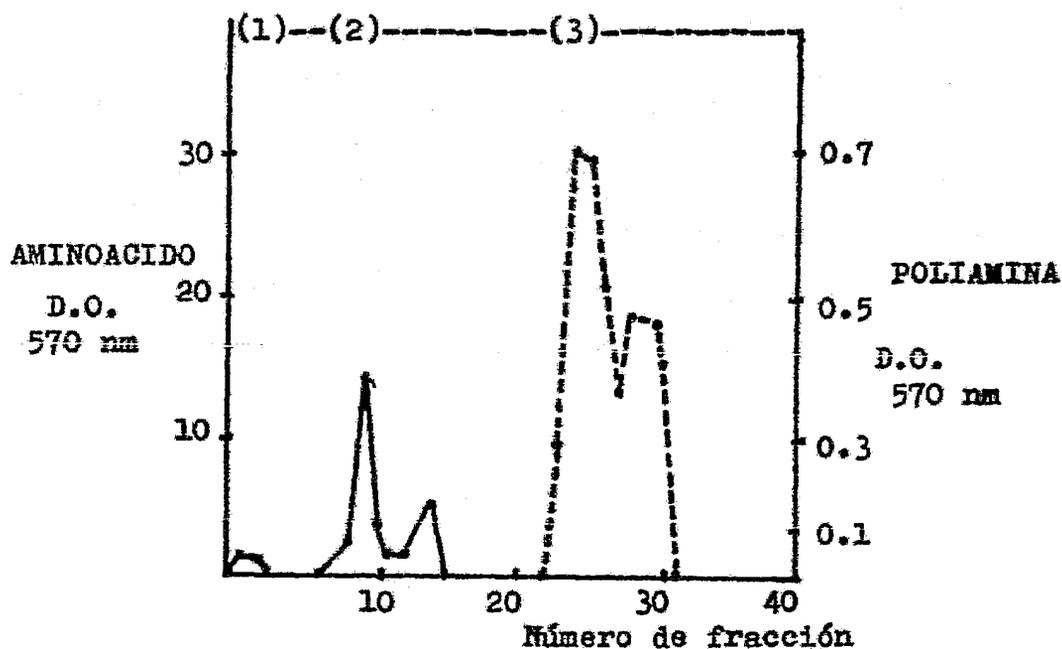
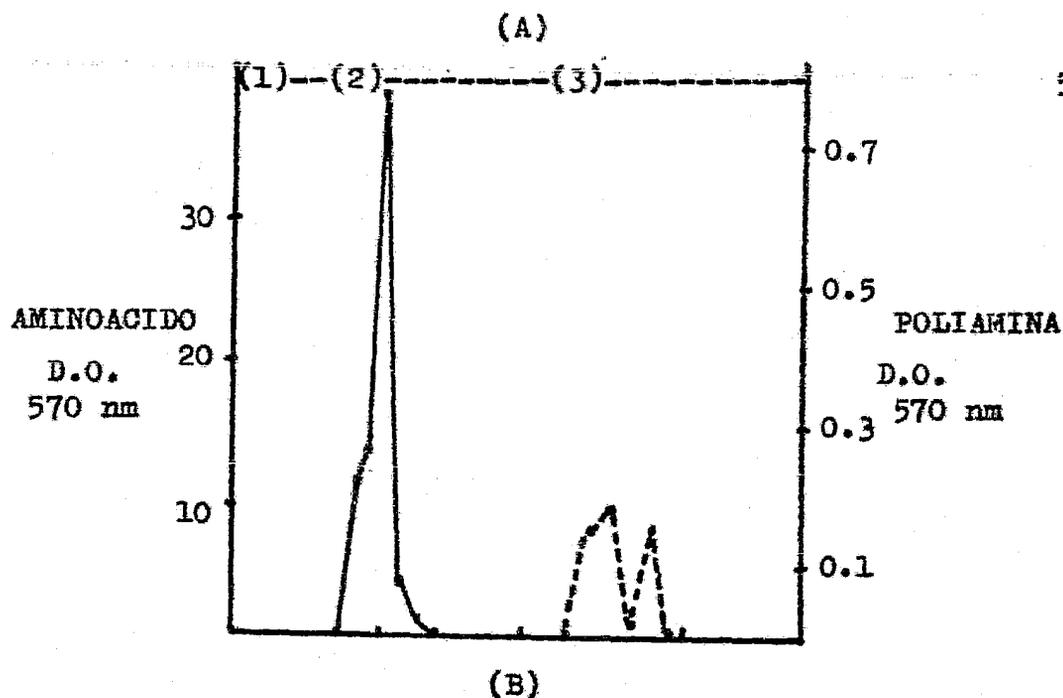


FIGURA 12. Cromatogramas de extractos de tejido: (A) tejido fresco, (B) 6 horas de incubación; eluidos de una columna de intercambio catiónico como en la figura 4. - Orden de los eluyentes: (1) HCl 0.05M, (2) buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl. elución de aminoácidos (—) y (3) el buffer anterior con 3.0 M de KCl donde eluyen las poliaminas (---).

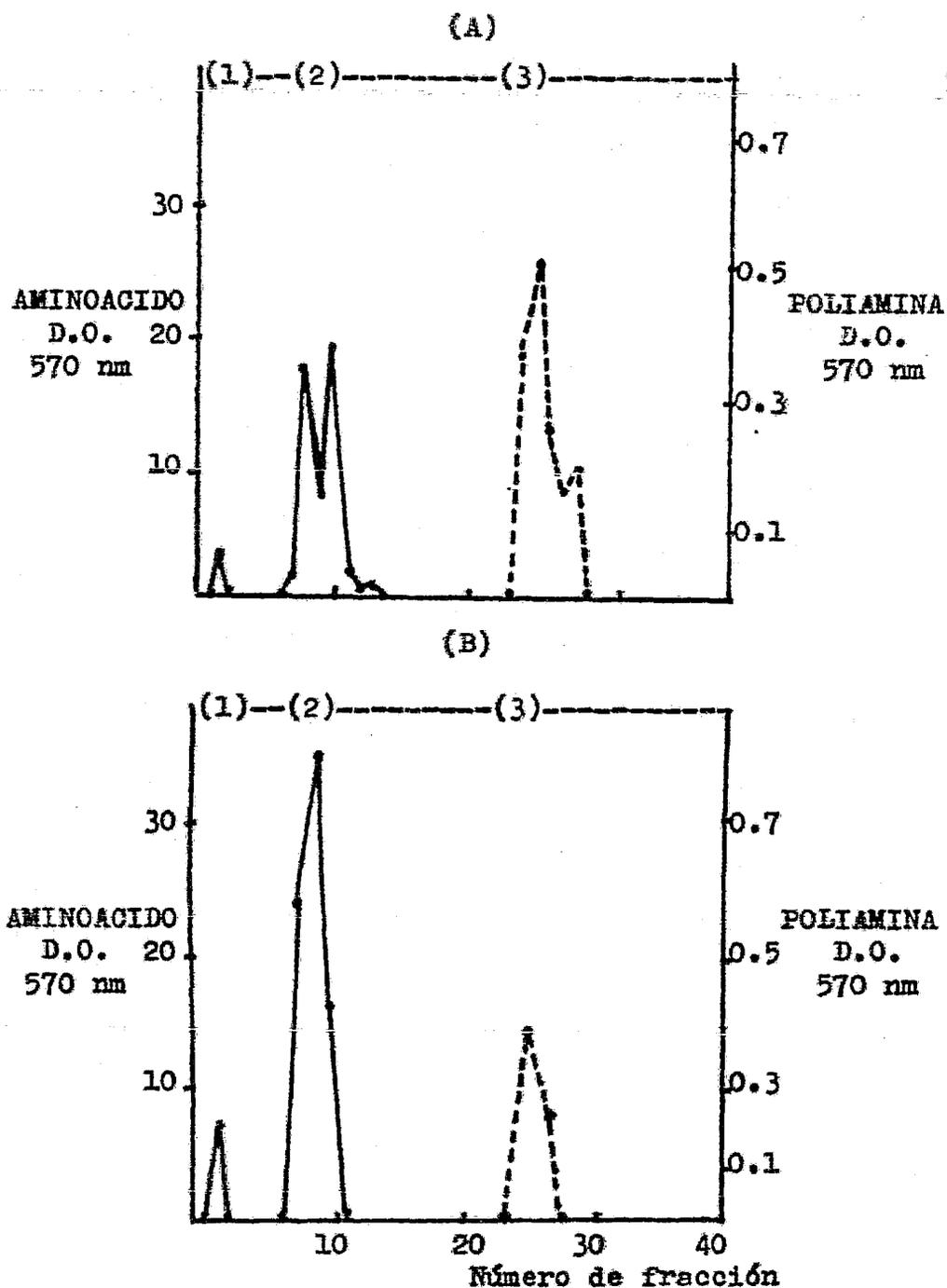


FIGURA 13. Cromatogramas de extractos de tejido: (A) tejido herido por 18 horas de incubación y (B) 24 horas de incubación; eluidos de una columna de intercambio catiónico como en la figura 12.

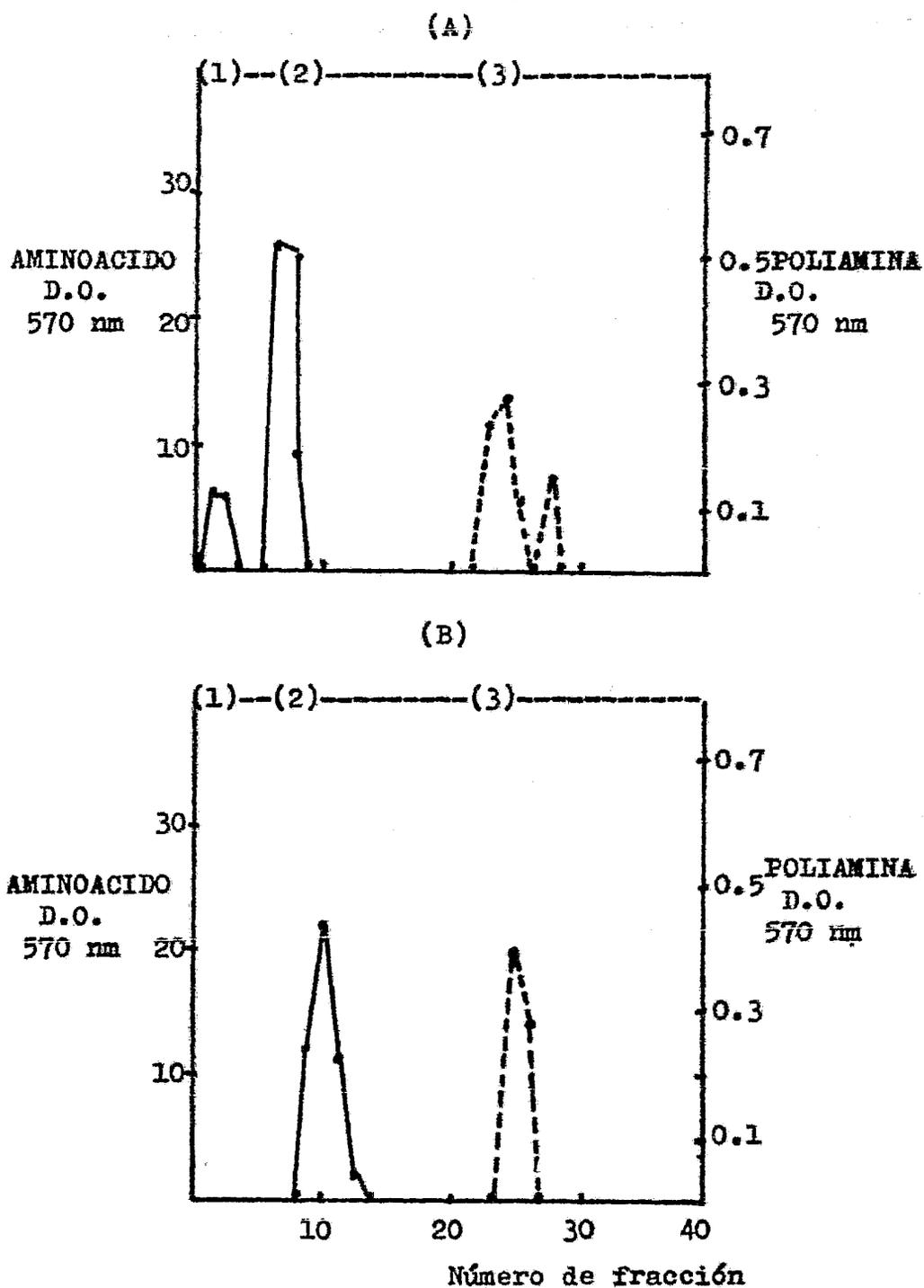


FIGURA 14. Cromatogramas de extractos de tejido: (A) tejido herido por 48 horas de incubación y (B) 72 horas de incubación ; eluidos de una columna de intercambio catiónico como en la figura 12.

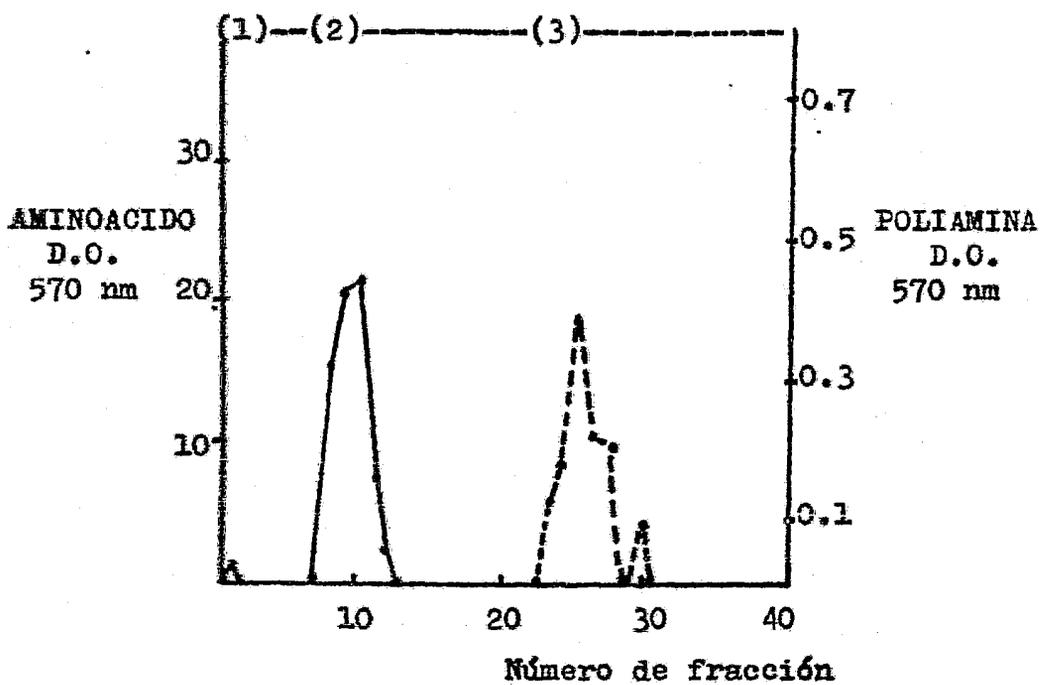


FIGURA 15. Cromatograma del extracto de tejido herido - por un tiempo de incubación de 120 horas; eluido de una columna de intercambio catiónico como en la figura 12.

había un incremento notable en el contenido de compuestos que daban reacción con ninhidrina en las fracciones recolectadas del lavado con HCl 0.05 M ; mientras que no había ya un incremento significativo en la sensibilidad de detección de poliaminas. La capacidad de retención de la resina resultó entonces ser de aproximadamente un 10 % de su capacidad teórica, de 800 D.O. de ninhidrina; con esta información se decidió no aplicar por arriba de 100 D.O. de ninhidrina.

Por consiguiente en adelante 100 D.O. de ninhidrina fue la cantidad aplicada a la columna de intercambio catiónico, de los diferentes extractos de tejido ( manteniendo constantes las dimensiones de la columna ) : habiéndose obtenido en todos los casos rendimientos de recuperación superiores al 80 %.

Habiendo establecido tanto la separación como la - cuantificación de aminoácidos y poliaminas, se procedió a aplicar los extractos de tejido fresco y herido a diferentes tiempos de incubación. Los cromatogramas de los diferentes tiempos de incubación de tejido herido se - muestran en las figuras 12, 13, 14 y 15.

En los cromatogramas de extractos de tejido herido ( figuras 12- 15 ) se puede apreciar que hay tiempos en - los cuales las fracciones del lavado con HCl 0.05 M - contenían especies que daban reacción con ninhidrina, podría pensarse que fuera aminoácido no unido, pero la capacidad de la resina es aún 8 veces mayor a la aplicada; también podría pensarse en aminoácidos ácidos ,

sin embargo un cromatograma de ácido glutámico bajo las mismas condiciones mostró que éste aminoácido eluía también al cambio de pH (dato no mostrado), con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl: por lo tanto queda aún por definir qué es el componente de estos extractos de tejido de los tiempos de incubación 6, 18, 24 y 48 horas que da reacción con ninhidrina y cuyo contenido cambió con los tiempos de incubación. Estos cromatogramas muestran también la separación entre aminoácidos y poliaminas claramente, cuando se lava exhaustivamente con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl. Los aminoácidos son eluidos al cambio de pH alrededor de la fracción número 10 inmediatamente después del cambio de pH de 2 a 8, y de eluir con el buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-0.25 M de KCl; mientras que las poliaminas en todos los casos son eluidas en conjunto alrededor de la fracción número 22, inmediatamente después de la adición de buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 3.0 M de KCl. Los cromatogramas también muestran que el contenido de poliaminas es mucho menor al de aminoácidos, por lo que se representan haciendo uso de dos escalas de densidad óptica a 570 nm. Por otra parte los cromatogramas que se presentan fueron seleccionados por representar el contenido de aminoácidos y poliaminas de tejido herido a diferentes tiempos de incubación analizado en forma comparativa de cantidad de muestra aplicada.

Cuando se analizó el contenido de aminoácidos que

reflejaban estos cromatogramas se observó un decremento a las 6 horas y un aumento a las 18 horas de incubación, lo cual no era concordante con la distribución de contenido de aminoácido mostrada en la tabla 3, principalmente en estas primeras horas de incubación de tejido herido. Esto se debió a que la distribución de la elución del aminoácido no fue uniforme en el cromatograma lo que hace difícil la interpretación a simple vista y en forma comparativa. Fue necesario entonces representar el contenido total para verdaderamente observar y analizar las variaciones de este parámetro (tabla 3). Con respecto al contenido de poliaminas no se detectó discordancia debido a que la elución de estas se distribuía entre un menor número de fracciones con un menor volumen de elución. Sin embargo, el análisis de las variaciones en los contenidos tanto de aminoácidos como de poliaminas se consideró más adecuado representarlo en contenido total con respecto a los tiempos de incubación del tejido herido (tablas 2 y 3).

Los resultados que se muestran en las tablas 2 y 3, han sido graficados en las figuras 16 y 17.

En cuanto al contenido de poliaminas se refiere estas se incrementan notablemente a las 6 horas de incubación, decayendo en horas subsecuentes hasta el nivel basal y tendiendo a aumentar después de las 24 horas, aproximadamente, de incubación de tejido herido (figura 16).

Por otro lado, el contenido de aminoácidos en teji-

TABLA 2. CONTENIDO DE POLIAMINAS EN TEJIDO HERIDO DE  
Solanum tuberosum L.

Tiempo de incubación (horas)	Contenido de Poliaminas (nmol/ g de tejido fresco)
0	78.66 ± 7.36
6	557.75 ± 143.50
18	109.21 ± 39.41
24	65.19 ± 17.26
48	195.41 ± 38.81
72	127.69 ± 7.76
120	263.06 ± 41.07

Un volumen equivalente a 100 D.O. a 570 nm del sobrenadante ácido producto de la precipitación con ácido tricloroacético del homogenado de tejido herido se aplicó a una columna de intercambio catiónico (Dowex 50W-X4, 0.5 por 9.0 cm) para separar aminoácidos y poliaminas. Las poliaminas fueron eluidas con 3.0 M de KCl en buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0, y determinadas por el método de Ninhidrina. El contenido de poliaminas se expresa como nmolas de Espermina por gramo de tejido fresco.

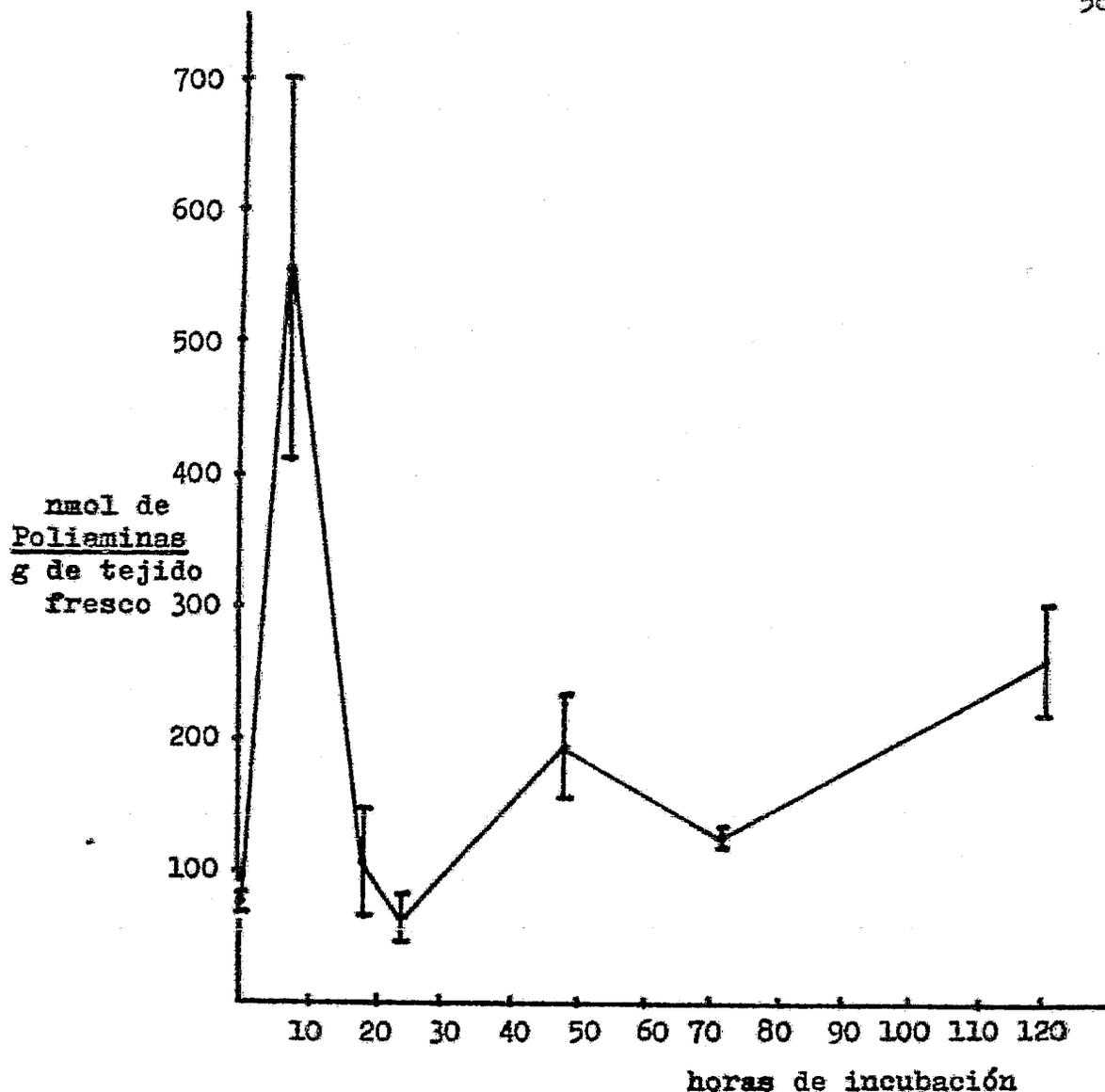


FIGURA 15. Contenido de poliaminas en tejido herido de Solanum tuberosum L.. El contenido de poliaminas eluido de una columna de intercambio catiónico Dowex 50W-X4 (0.5 por 9.0 cm) con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0-8.3 M de KCl y determinadas por el método de Ninhidrina se encuentra graficado a diferentes tiempos de incubación. El contenido se expresa como nmol de Espermina por gramo de tejido fresco.

TABLA 3. CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN TEJIDO HERIDO DE  
Solanum tuberosum L.

Tiempo de incubación (horas)	Contenido de Aminoácidos ( $\mu\text{mol/g}$ de tejido fresco)
0	12.11 $\pm$ 1.82
6	12.82 $\pm$ 0.90
18	8.23 $\pm$ 2.10
24	13.22 $\pm$ 0.35
48	19.31 $\pm$ 0.49
72	20.66 $\pm$ 0.79
120	17.25 $\pm$ 1.94

Un volumen equivalente a 100 D.O.  $\approx$  570 nm del sobrenadante ácido producto de la precipitación con ácido tricloroacético del homogenado de tejido herido fué aplicado a una columna de intercambio catiónico (Dowex 50W-X4, 0.5 por 9.0 cm) para separar aminoácidos de poliaminas. El contenido de aminoácidos eluido con 0.25 M de KCl en buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8,0 se determinó por Ninhidrina. El contenido se expresa como micromol de L-Leucina por gramo de tejido fresco.

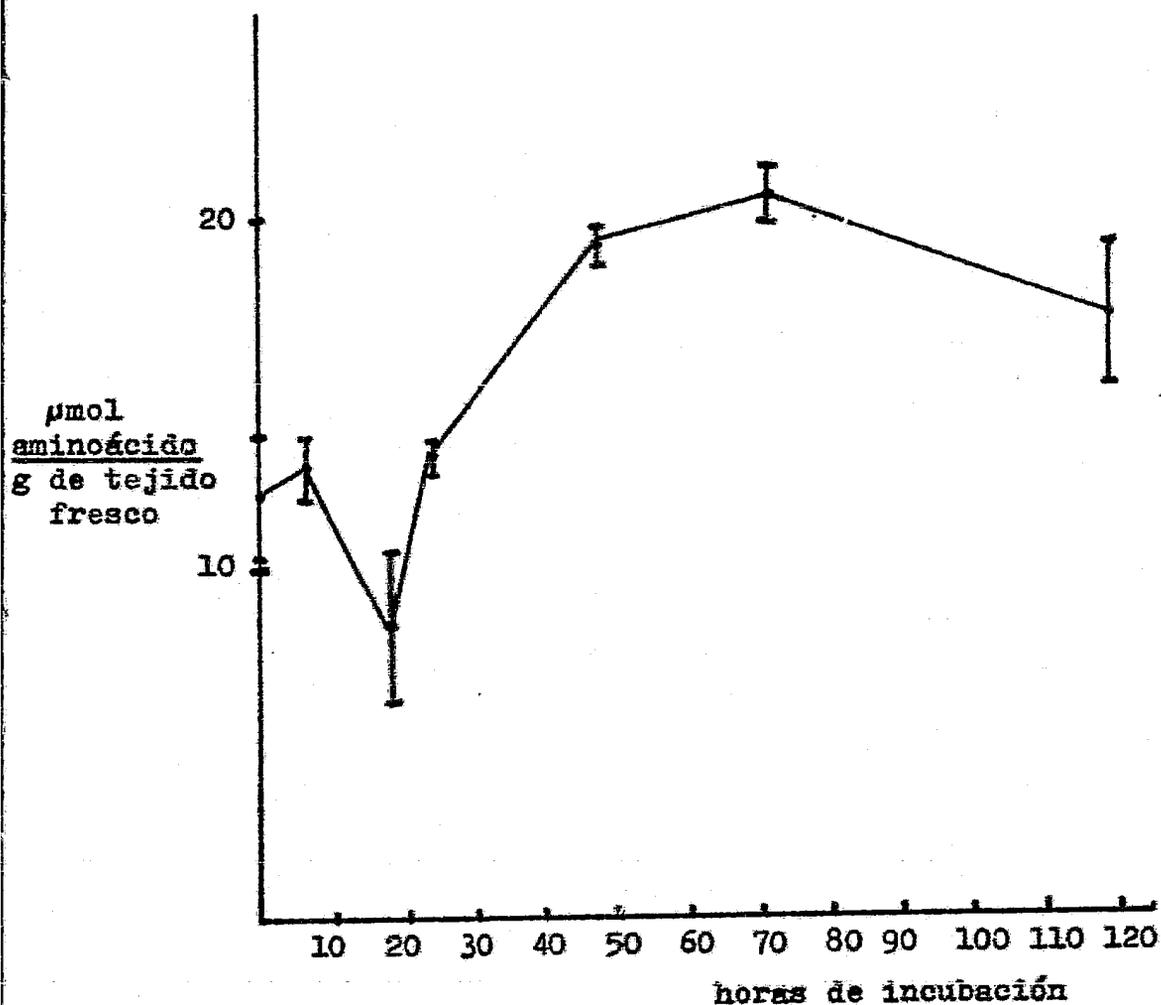


FIGURA IV. Contenido de aminoácidos en tejido herido de Solanum tuberosum L. El contenido de aminoácido eluido de una columna de intercambio catiónico Dowex 50W-X4 (0.5 por 9.0 cm) con buffer fosfato de potasio 20 mM pH 8.0- 0.25 M de KCl y determinados por el método de Ninhidrina se encuentran graficados a diferentes tiempos de incubación. El contenido de aminoácidos se expresa como  $\mu\text{mol}$  de L-Leucina por gramo de tejido fresco.

do herido de diferentes tiempos de incubación (figura 17), muestra que éste se mantiene a nivel basal hasta alrededor de las 24 horas. Al parecer durante estos tiempos la tendencia de la poza de aminoácidos es a mantenerse o a descender ligeramente; después de las 24 horas de incubación del tejido herido, el contenido de aminoácidos se incrementa y se mantiene a ese nivel hasta aproximadamente las 120 horas de incubación de tejido herido.

Estos resultados sugerían que podría existir una actividad proteolítica que se manifestase y que en cierta forma fuese concomitante con la reducción en el contenido de proteína alrededor de las 48 horas de incubación (figura 5) y con el incremento en el contenido de aminoácidos después de las 24 horas de incubación de tejido herido (figura 17).

#### 4.1.3 Niveles de actividad proteolítica en tejido herido de Solanum tuberosum L.

Las mediciones de actividad proteolítica se realizaron sobre extractos crudos dializados a una concentración equivalente de proteína (0.46 mg/ml de sistema de reacción) se observó durante el estudio que esta concentración de proteína era la óptima; concentraciones menores a este nivel reducían la sensibilidad de detección usando azocaseína como sustrato, mientras que concentraciones mayores hacían manifiesto un efecto inhibitorio que reducía notablemente la actividad específica hasta en un 50 % si se duplicaba esta concentración. Por otra parte se encontró -

que los extractos requerían de diálisis para medir actividad (figura 18), como se observó del hecho de que el tiempo 48 horas en donde se encontró el máximo de actividad - proteolítica en tejido herido, en ausencia de diálisis no se detectó actividad enzimática.

Se determinó la curva de saturación por sustrato usando azocaseína (figura 19), la cual mostró que la concentración empleada en las determinaciones de actividad proteolítica que se realizaron, 4 mg/ml de sistema de reacción, caía en el límite de concentraciones en donde comenzó a apreciarse un efecto inhibitorio por concentración de sustrato sobre la actividad proteolítica determinada; este efecto llegó a alcanzar un 10 % de inhibición.

Las figuras 20 y 21 representan las cinéticas de actividad proteolítica de extractos crudos de tejido herido a concentraciones equivalentes de proteína y bajo condiciones de saturación por sustrato (azocaseína). Estas gráficas muestran las velocidades iniciales de la actividad enzimática y por consiguiente reflejan el contenido de enzima presente en el tejido herido, las pendientes de estas gráficas difieren entre sí, de la misma manera que las escalas utilizadas dependen de los niveles de actividad encontrados en cada extracto.

En la tabla 4 se muestran las velocidades iniciales obtenidas de las pendientes de las curvas de las figuras 20 y 21, las unidades de actividad enzimática y la actividad específica de tejido herido incubado a diferentes tiempos. En esta tabla se puede observar de nuevo que la mayor

pendiente (tiempo 48 horas) define el mayor número de unidades de actividad enzimática así como a la mayor actividad específica  $125.52 \pm 0.59$ . La figura 22 muestra los resultados expresando la actividad específica (Unidades de actividad por mg de proteína), contra tiempo en horas de incubación de tejido herido usando azocaseína como sustrato bajo condiciones de saturación. Los resultados muestran que existen diferencias en tanto al contenido de enzimas proteolíticas en extractos de tejido de diferentes tiempos de incubación. Existe actividad proteolítica en tejido fresco, probablemente debida a una inmediata respuesta a herida o a una lisis de partículas semejantes a los lisosomas que liberarían enzimas de naturaleza proteolítica durante el proceso de extracción. Un enfriamiento a  $-2^{\circ}\text{C}$  no previene esta actividad durante el proceso de extracción. Esta actividad proteolítica se mantiene en las primeras horas de incubación, no así después de las 6 horas en que la actividad proteolítica se incrementa para tener un máximo a las 48 horas de incubación de tejido herido; y luego decaer y permanecer constante, un poco por arriba del nivel de actividad proteolítica del tejido fresco, alrededor de las 120 horas de incubación.

#### 4.1.4 Purificación Enzimática.

La purificación enzimática se realizó con un fraccionamiento de proteína por precipitación con sulfato de amonio de extractos de tejido herido de 48 horas de incubación, seleccionado porque en él se determinó el máximo de

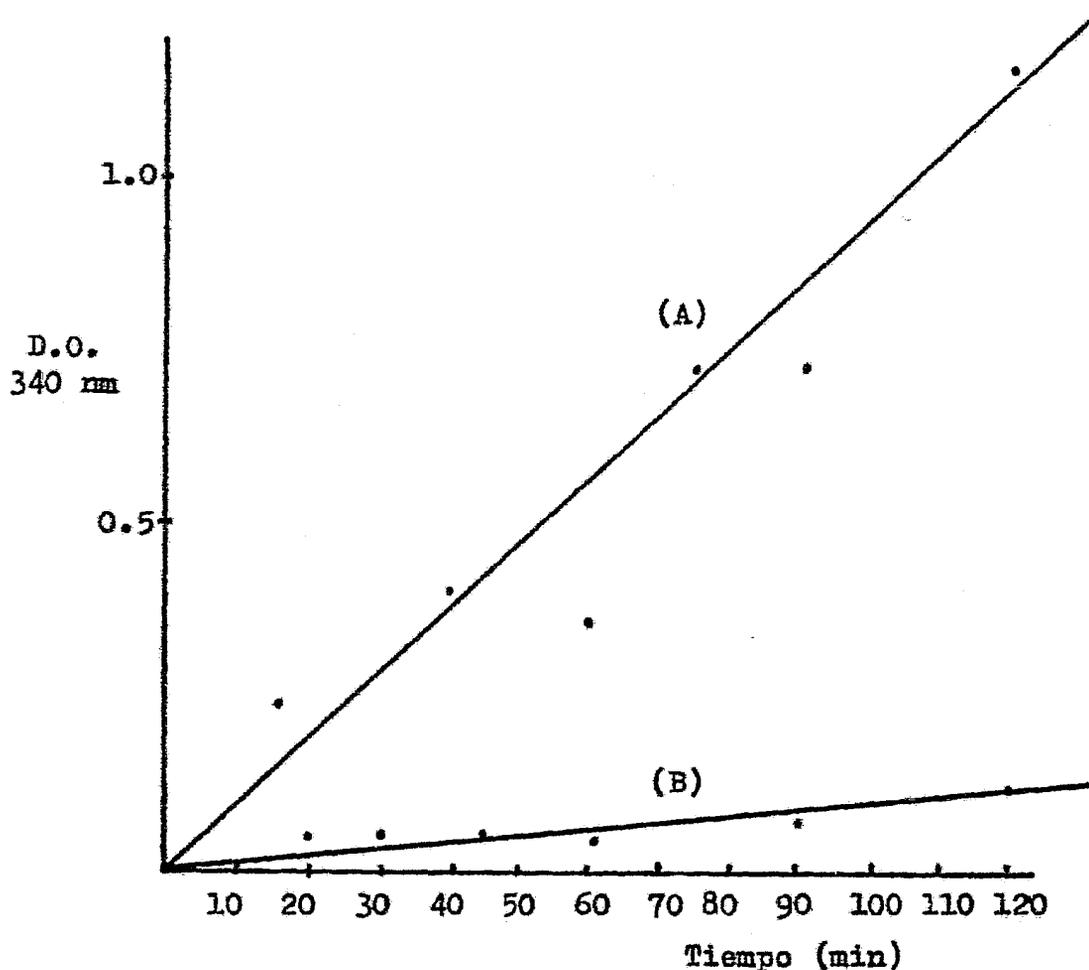


FIGURA 18. Efecto de diálisis sobre la Actividad proteolítica en extractos de tejido herido de 48 horas de incubación. Se determinó el efecto de diálisis sobre la actividad proteolítica medida a concentraciones equivalentes de proteína (0.46 mg/ml de sistema de reacción) usando *-*azocaseína como sustrato, bajo condiciones de saturación: (A) extracto crudo dializado, (B) extracto crudo sin dializar.

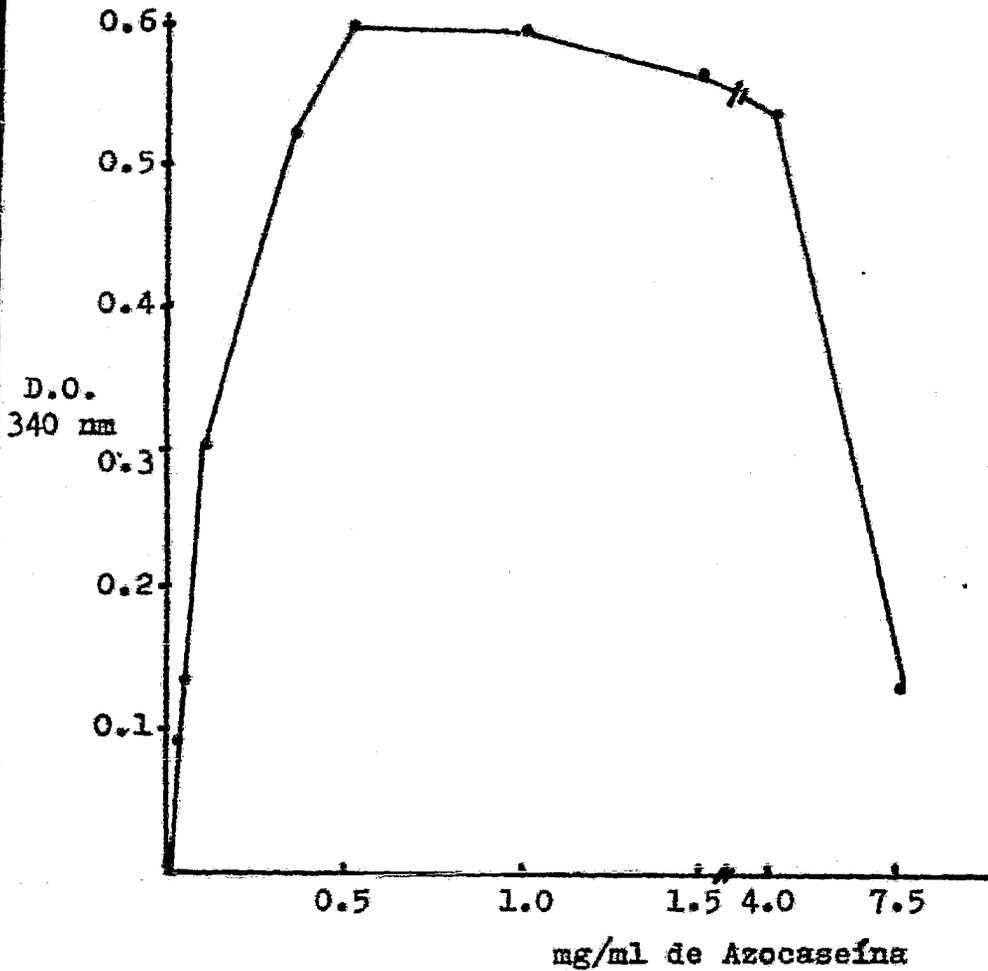


FIGURA 19. Actividad Proteolítica a diferentes concentraciones de azocaseína. La figura muestra la curva de saturación por sustrato; se midió la actividad proteolítica en un extracto de tejido herido de 48 horas de incubación con 0.46 mg de proteína por ml de sistema de reacción empleando diferentes concentraciones de Azocaseína

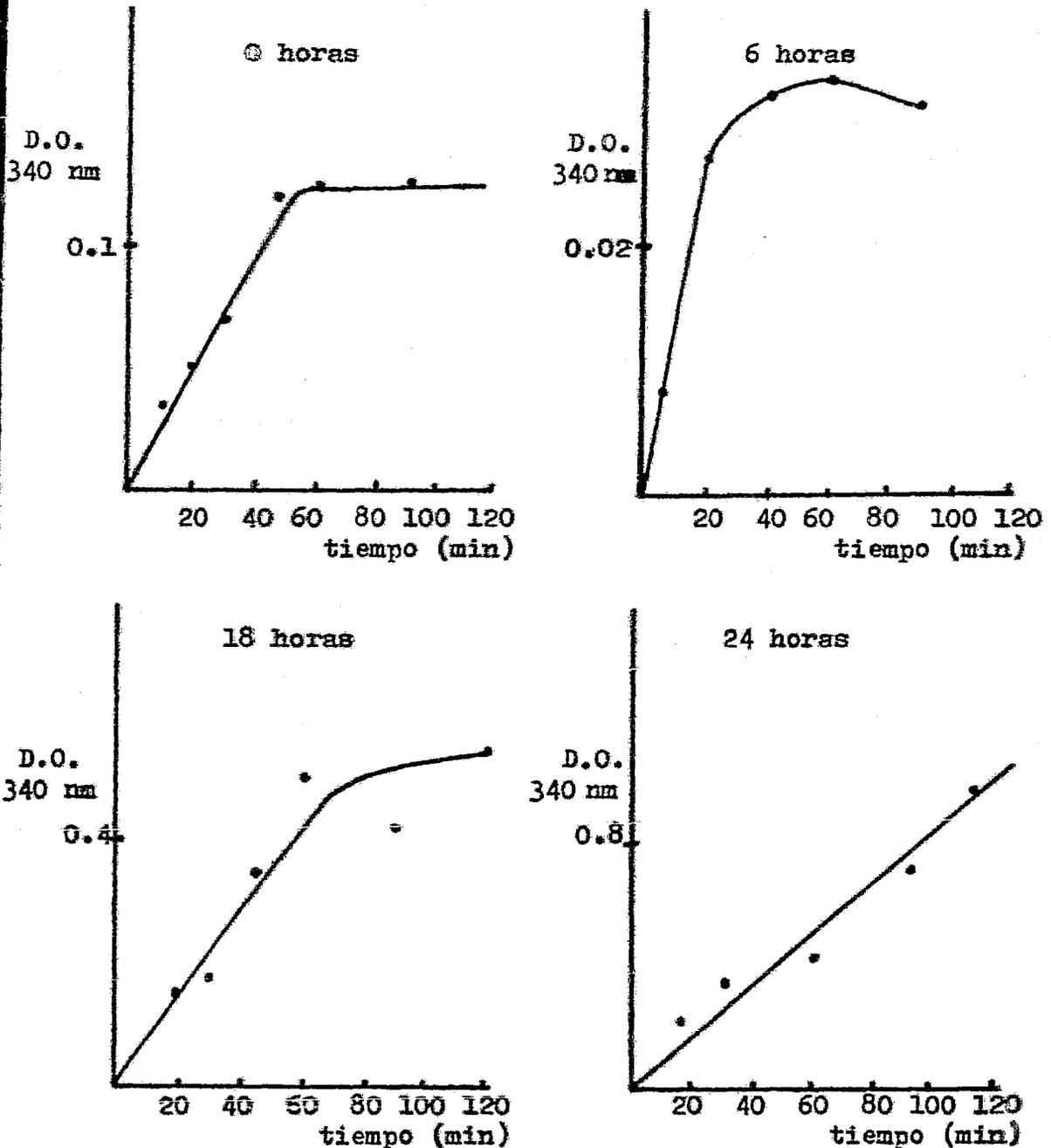


FIGURA 20. Cinéticas de actividad proteolítica de tejido fresco y herido de Solanum tuberosum L. Cinéticas de actividad proteolítica de extractos crudos dializados de tejido herido a diferentes tiempos de incubación; medidas - en todos los casos usando una concentración de proteína de 0.46 mg por ml de sistema de reacción con azocaseína como sustrato, bajo condiciones de saturación del mismo.

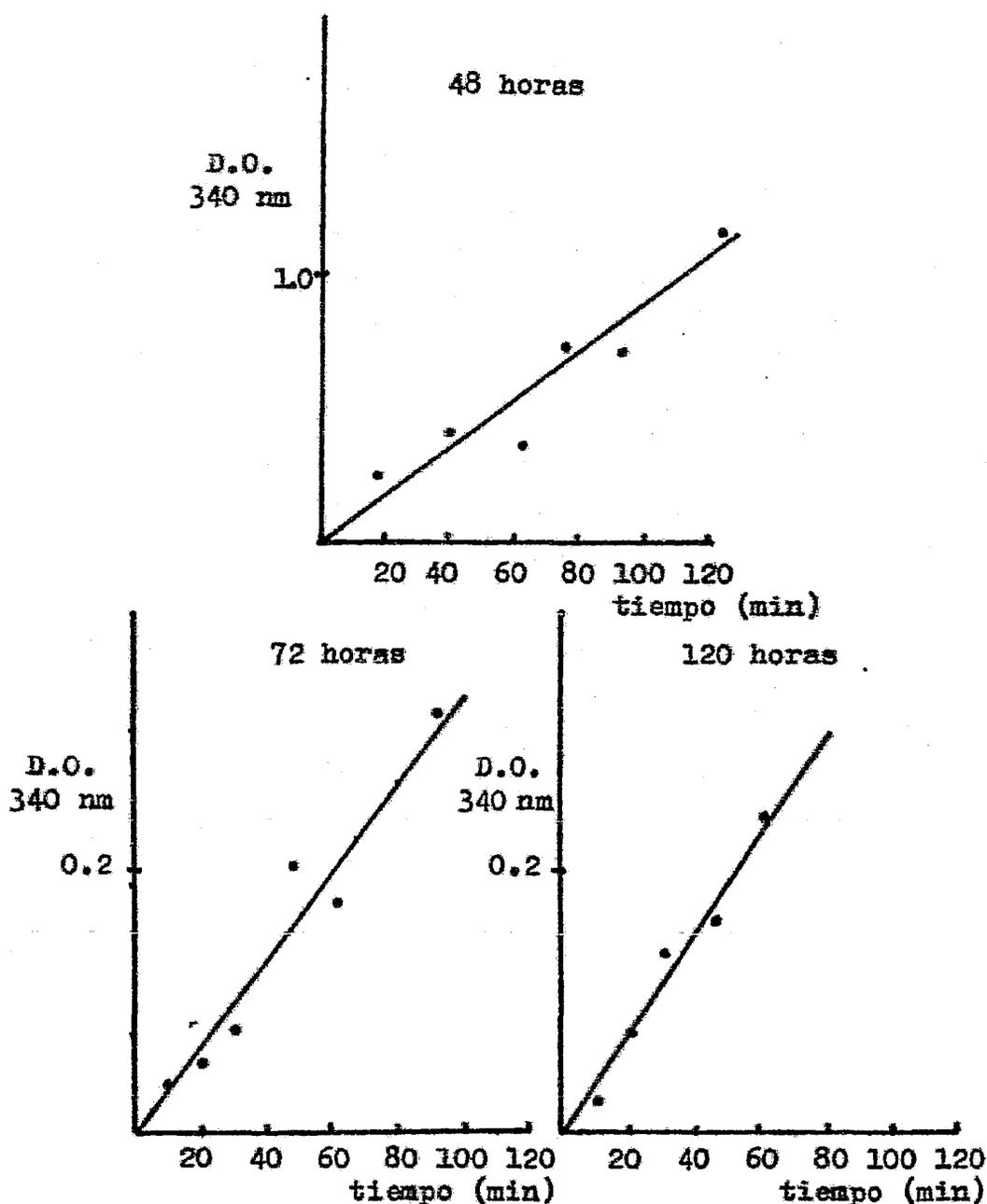


FIGURA 21. Cinéticas de actividad proteolítica de tejido herido de Solanum tuberosum L. Cinéticas de actividad proteolítica de extractos crudos dializados de tejido herido a diferentes tiempos de incubación; medidas en todos los casos usando una concentración de proteína de 0.46 mg/ml de sistema de reacción con  $\alpha$ -zocaseína como sustrato, bajo condiciones de saturación del mismo.

TABLA 4. NIVELES DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN TEJIDO  
HERIDO DE Solanum tuberosum L.

Tiempo de incubación (horas)	Velocidad inicial ( $\Delta$ D.O./min)	Unidades de Actividad enzimática (U)	Actividad específica (U/mg de proteína).
0	0.0025	150.00	46.87 $\pm$ 4.36
6	0.0015	139.94	43.73 $\pm$ 19.70
18	0.0047	264.99	82.81 $\pm$ 4.83
24	0.0053	332.06	103.77 $\pm$ 3.10
48	0.0055	401.66	125.52 $\pm$ 0.59
72	0.0029	168.32	52.60 $\pm$ 3.24
120	0.0037	225.69	70.53 $\pm$ 8.74

Las determinaciones se realizaron sobre extractos - crudos dializados de tejido herido a diferentes tiempos de incubación, a una misma concentración de proteína (0.46 mg/ml) en un sistema de reacción usando azocaseína como - sustrato, bajo condiciones de saturación del mismo. Las velocidades iniciales se obtuvieron de las pendientes de las curvas de cinéticas de actividad proteolítica de las figuras 20 y 21 para cada tiempo. Las unidades de enzima se expresan como el cambio en 0.001 D.O. a 340 nm por hora. Otras condiciones ver capítulo de metodología punto 3.2.4 .

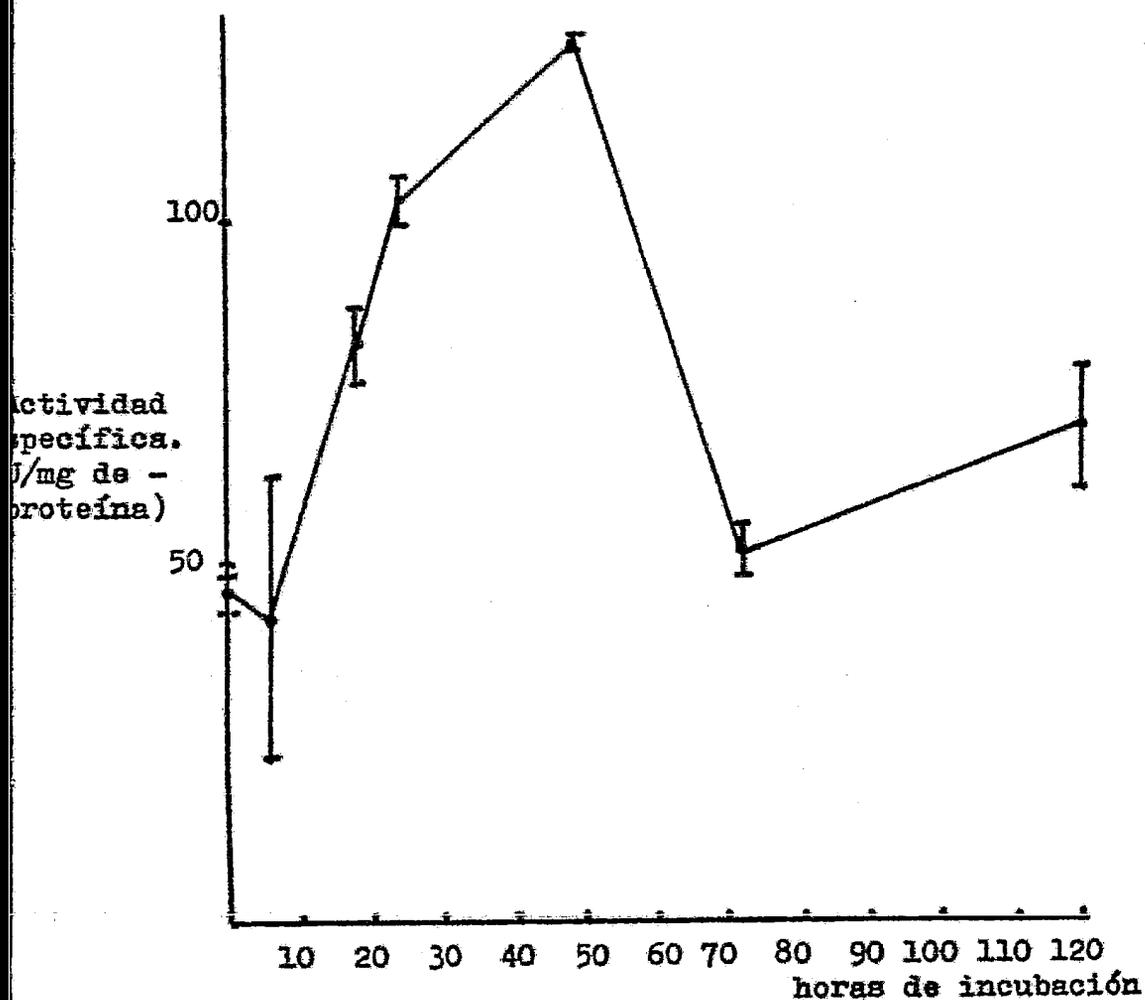


FIGURA 22. Niveles de actividad proteolítica en tejido herido de Solanum tuberosum L. La actividad proteolítica de extractos crudos dializados de tejido herido se determinó en un sistema de reacción usando  $\alpha$ -zocaseína como sustrato. La actividad proteolítica específica se expresa como unidades de actividad (U) por mg de proteína.

actividad proteolítica de tejido herido.

Se realizó un estudio previo secuencial para definir las condiciones que se utilizaron para realizar esta primera etapa de purificación enzimática; el cual consistió en determinar donde cortar el fraccionamiento de proteína por precipitación con sulfato de amonio sólido, así como determinar el efecto del ajuste entre 5 y 6 unidades de pH. La selección de este pH se debió a que en ensayos previos la determinación de actividad proteolítica a pH 4.5, 7.5 y 8.7 en extractos de tejido de tiempos 0, 6 y 18 horas de incubación, era muy inferior a la que se detectaba midiendo a pH 5.7. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos de este estudio que se ha identificado de la siguiente manera dependiendo del procedimiento seguido:

(a) Condiciones de ajuste de pH inicial sobre los extractos crudos de tejido herido.

Se ajustó entre 5-6 unidades de pH y se fraccionó de 0-35 % y de 0-30% de saturación con sulfato de amonio sólido (experimento 1 y 2 respectivamente), se centrifugó - (ver punto 3.2.5 de la Parte Experimental) y se continuó fraccionando. En cada una de las fracciones se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry y la actividad proteolítica usando azocaseína como sustrato.

(b) Condiciones de ajuste de pH final sobre los extractos crudos de tejido herido.

Se fraccionó de 0-10 % y de 0-25 % de saturación con sulfato de amonio sólido (experimentos 3 y 4 respectivamente), se centrifugó y al sobrenadante se le ajustó el pH entre 5 y 6 unidades y se continuó fraccionando.

TABLA 5. FRACCIONAMIENTO DE PROTEINA DEL EXTRACTO CRUDO  
DE TEJIDO HERIDO POR PRECIPITACION CON SULFATO  
DE AMONIO.

Condiciones <sup>+</sup>	Fracción	% Proteína <sup>++</sup>	% Actividad Proteolítica <sup>++</sup>
(a) pH inicial			
Experimento 1	0-35%	46.82	92.95
	35-70%	49.93	7.04
	70-80%	3.25	+++
Experimento 2	0-30%	46.71	37.46
	30-70%	46.57	48.31
	70-80%	6.71	14.23
(b) pH final			
Experimento 3	0-10%	3.77	+++
	10-20%	8.02	27.12
	20-40%	59.49	39.46
	40-50%	28.72	33.42
Experimento 4	0-25%	10.18	27.06
	25-55%	72.52	31.86
	55-80%	17.29	41.07
(c) condiciones seleccionadas			
Experimento 5	0-10%	1.62	0.40
	10-40%	58.07	81.29
	40-80%	20.10	18.70
	80-100%	19.07	+++

+ Especificadas en punto 4.1.4 de este capítulo.

++ Se consideró el contenido total acumulado a la fracción indicada, para los cálculos.

+++ No se detectó actividad proteolítica.

Se realizó un fraccionamiento de proteína por precipitación con sulfato de amonio sólido sobre extractos crudos de tiempo 48 horas, según el procedimiento especificado para cada experimento; la actividad proteolítica fué medida según las condiciones especificadas en el punto 3.2.4 de la Parte Experimental usando azocaseína como sustrato bajo condiciones de saturación por el mismo.

(c) Condiciones seleccionadas para fraccionar la proteína de extractos crudos de tejido herido (pH final).

Se fraccionó de un 0-10 % de saturación con sulfato de amonio sólido; se centrifugó, el sobrenadante se ajustó a un pH entre 5 y 6 (ver punto 3.2.5 de la Parte Experimental) y se continuó fraccionando.

Analizando comparativamente los experimentos 1 y 2, (tabla 5) realizados siguiendo el fraccionamiento bajo las condiciones establecidas en el inciso (a) pH inicial; se puede observar que no existen variaciones significativas en cuanto a la distribución de la proteína en las fracciones reportadas, mientras que un 5 % de más en saturación con sulfato de amonio de la primera fracción en el experimento 1, produce un incremento hasta de 3 veces en la actividad específica determinada con respecto a la primera fracción del experimento 2.

Las condiciones del inciso (b) pH final aplicadas a los experimentos 3 y 4 muestran una distribución de proteína diferente a la obtenida en los experimentos 1 y 2, el corte de 20-40 % y de 25-55 % produjo ahora las fracciones con mayor contenido en proteína y en enzima, como se aprecia de los % de proteína y de la actividad específica reportada.

Estos experimentos sirvieron para definir el intervalo de saturación sobre el cual trabajar para reducir el contenido de proteína y enriquecer en enzima en la fracción a seleccionar. Los experimentos 3 y 4 mostraban una distribución de proteína más definida; se podía eliminar

proteína por un mayor fraccionamiento entre un 10 y 50 % de saturación por sulfato de amonio, además de que el ajuste de pH final era el mejor en tanto a la distribución de la actividad específica de la proteasa que se había logrado siguiendo estas condiciones, inciso (b), en tanto al ajuste de pH se refiere.

Considerando que el objetivo de este estudio preliminar para fraccionar proteína con sulfato de amonio, era el definir si era posible mejorar la sensibilidad en la determinación de actividad proteolítica en ciertos tiempos de incubación de tejido herido, principalmente en las primeras horas de incubación; así como mejorar las cinéticas de actividad proteolítica con respecto a otros sustratos, hemoglobina y albúmina bovina, se optó por una fracción concentrada en proteína y con actividad proteolítica alta. Estas características las reunía el fraccionamiento descrito en el inciso (c), experimento (5); donde se observó que se eliminaba aproximadamente un 40 % del contenido de proteína del extracto de tejido, fraccionando de la manera descrita. En la fracción del 10-40 % de saturación con sulfato de amonio se logró retener el 81 % de la actividad proteolítica determinada.

La tabla 6 muestra la distribución de la actividad específica de proteasas por fraccionamiento de proteína por saturación con sulfato de amonio sólido sobre extractos de tejido herido de tiempo 48 horas de incubación siguiendo el procedimiento enunciado anteriormente en el inciso (c), experimento (5).

TABLA 6. DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PROTEASAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO SOLIDO.

Fuente de enzima	Concentración de proteína total (mg)	Unidades de actividad por mililitro (U/ml)	Unidades totales	Actividad específica (U/mg)	Veces de Purificación <sup>+</sup>
Extracto crudo: - no dializado.	27.88	174.25	348.50	12.5	
-dializado.	"	1743.90	3487.79	125.1	
Fracción:					
0-10%	0.41	16.83	10.00	24.4	-
10-40%	14.89	3387.47	3387.47	227.5	1.8
40-80%	5.15	779.18	701.53	136.2	1.1
80-100%	4.89	++	++	++	-
			Total	4099.00	

Recuperación de proteína = 91 %.

+ Las veces de purificación fueron calculadas con respecto al extracto crudo dializado.

++ No se detecto actividad proteolítica.

La actividad proteolítica fue medida según condiciones - especificadas en el punto 3.2.4 de la Parte Experimental - en extractos crudos no dializados, extractos crudos dializados y fracciones de proteína obtenidas por precipitación con sulfato de amonio sólido de tejido herido por un tiempo de incubación de 48 horas. La actividad específica se - definió como el cambio en 0.001 D.O. a 340 nm por hora por mg de proteína.

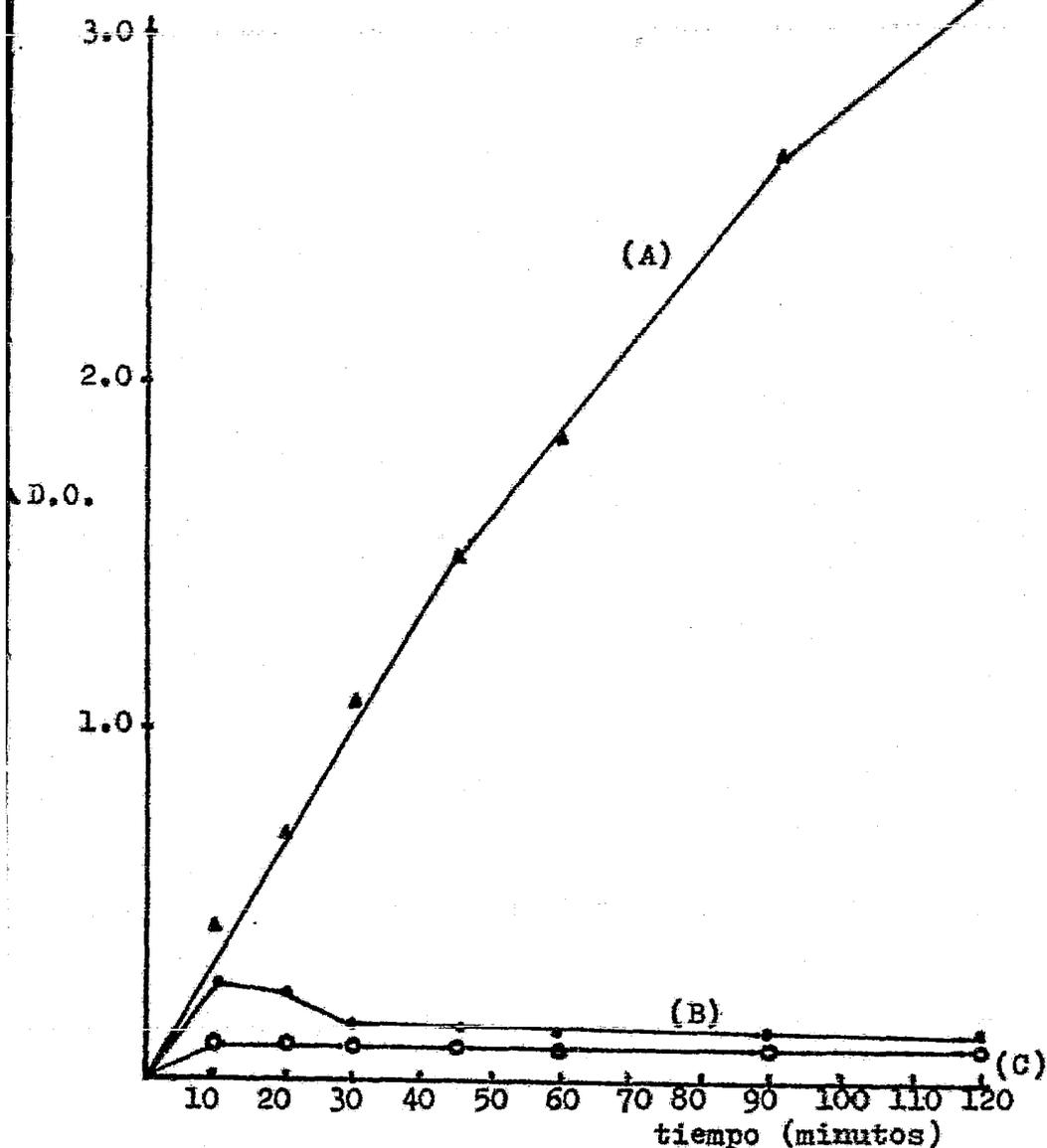


FIGURA 23. Determinación de la especificidad de la enzima a varios sustratos. Cinéticas de actividad proteolítica de una fracción obtenida por precipitación del 10-40% de saturación con sulfato de amonio sólido con diferentes sustratos: (A) Azocaseína D.O. 340 nm, (B) Hemoglobina (sustrato para proteasa) D.O. 750 nm, y (C) Albúmina bovina D.O. 750 nm. La actividad proteolítica se determinó según el punto 3.2.4 de la Parte Experimental.

Con el fraccionamiento seleccionado se obtuvo una purificación de aproximadamente 2 veces, con respecto al extracto crudo dializado. En esta tabla 6, también se observó que la diálisis tenía un efecto promotor sobre la actividad proteolítica hasta de 10 veces aproximadamente.

El rendimiento de recuperación protéica alcanzó el 91 % aproximadamente.

Cuando se determinó la actividad proteolítica de extractos crudos dializados frente a otros sustratos como hemoglobina (sustrato para proteasa) y albúmina bovina - desnaturalizada se encontró una completa incapacidad para determinar actividad proteolítica. Se procedió entonces a determinar la actividad proteolítica ahora empleando una fracción 2 veces más rica en enzima, la fracción obtenida fraccionando del 10-40 % por saturación con sulfato de amonio sólido de un extracto de tejido herido de 48 horas de incubación; obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 23.

Esta figura muestra que definitivamente la actividad proteolítica es mucho mayor midiendo con azocaseína como sustrato, y que las enzimas muestran baja especificidad hacia los otros dos sustratos.

4.1.5 Efecto de los componentes de la reacción en el sistema de medición de actividad proteolítica.

La tabla 7 muestra los resultados del estudio realizado para definir posibles efectos de los componentes de la reacción en el sistema de medición de actividad proteolítica.

Los resultados muestran que la enzima requiere de a-

TABLA 7. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA REACCION EN EL SISTEMA DE MEDICION SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.

Condiciones	Actividad específica	%
a) Sistema completo dializado	806.2	100
b) Sistema completo no dializado	80.6	10
c) - Agentes reductores	562.5	70
d) - K-EDTA	862.5	107
e) + 5 mM K-EDTA	146.9	18
f) 100 mM $PO_4^{=}$	1406.2	174

La actividad proteolítica se midió utilizando una fracción de enzima obtenida de fraccionar del 10-40 % con sulfato de amonio sólido un extracto crudo de tejido herido por 48 de incubación. El sistema de medición completo contiene: 4 mg/ml de azocaseína, buffer fosfato de potasio 50 mM pH 5.7, K-EDTA 1 mM, mercaptoetanol 4 mM, ditiotreitól 1 mM.

gentes reductores,  $\beta$ -mercaptoetanol y ditioneitol, ya que la actividad proteolítica medida se reduce en un 30 % aproximadamente en ausencia de ambos (tabla 7, (c)).

No se detecta efecto significativo al eliminar K-EDTA del sistema de medición de actividad proteolítica; no sucediendo así cuando se ajusta a 5 mM la concentración de K-EDTA en el sistema de reacción que provoca una reducción del 80 % en la actividad proteolítica determinada con respecto al sistema completo dializado, (tabla 7 (d) y (e) - respectivamente).

Con respecto al efecto de la concentración de iones fosfato se observó que existe un efecto promotor sobre la actividad proteolítica, con un incremento del 100 % en la concentración milimolar de este ion (tabla 7 (f)).

Nuevamente se observó el efecto promotor por diálisis sobre la actividad proteolítica de extracto enzimático, (tabla 7 (b)).

#### 4.2 Discusión.

Los resultados muestran que el contenido de proteína de tejido herido de papa tiene un incremento en las primeras horas de incubación, decayendo en horas subsecuentes.

El contenido de poliaminas muestra que hay un incremento en las primeras horas de incubación decayendo en horas posteriores al final de las cuales permanece a un nivel constante. El contenido de aminoácidos varía poco en las primeras horas de incubación, aumentando en horas posteriores hasta estabilizarse.

Estos resultados hacen manifiesto que los cambios en el contenido de poliaminas son concomitantes al incremento en el contenido de proteína en las primeras horas de incubación de tejido herido de papa hablando de un estado de pleno anabolismo en el que el tejido responde a herida, quizá restableciéndose al daño por herida. El cambio en el contenido de aminoácidos libres indicaba la posibilidad de la existencia de actividad proteolítica en tejido herido.

La actividad proteolítica se hace manifiesta en tejido herido de papa, de tal manera que la actividad proteolítica de tejido fresco se mantiene hasta alrededor de las 6 horas de incubación de tejido herido, incrementándose en horas posteriores hasta llegar a un máximo de actividad proteolítica alrededor de las 48 horas de incubación de tejido herido, decayendo y permaneciendo constante después.

El tiempo en que existe un cambio de incremento en

el contenido de aminoácidos corresponde también al incremento en la actividad proteolítica, y con la reducción en el contenido de proteína y poliaminas; el estado ahora - tiende al catabolismo protéico en el tejido herido, sin embargo el tejido no decae totalmente, la reducción se - vuelve a los niveles basales, y sería aventurado hablar de su muerte ó de que ha entrado a un estado de plena senescencia.

Los cambios metabólicos observados muestran que el tejido herido está sujeto a una regulación bien definida; en la cual las poliaminas y un sistema degradativo de proteínas deben estar involucrados.

La metodología empleada permitió la separación adecuada de poliaminas y aminoácidos; no obstante la posibilidad de que existiese competencia entre ambas especies debido a su naturaleza catiónica, especialmente en el caso de arginina. El estudio también muestra que es factible con metodologías adicionales realizar una separación - más meticulosa, con el propósito de definir qué o quiénes son las especies de poliaminas que quizá sean las - que particularmente son inducidas por herida de tejido de papa; ó que mantengan el tejido viable aún en prolongados tiempos de incubación.

Resultaría también interesante analizar si las variaciones en el contenido de las especies que son recolectadas con el lavado con HCl 0.05 M, fracción no unida a la columna, de extractos de tejido herido en ciertos tiempos de incubación, representan únicamente las variaciones por

muestra aplicada o bien sí es de alguna naturaleza especial.

La primera etapa de purificación a la que se llegó en este estudio, podría ser el inicio de los estudios encaminados a definir el mecanismo de acción del sistema degradativo de proteína detectado. Se desconoce si se trata de enzimas endo o exoproteolíticas, de su especificidad, número de enzimas involucradas, etc..

Podría pensarse que hay indicios que hablan de la presencia de un inhibidor proteolítico, que se hace manifiesto en la caída de las cinéticas de actividad proteolítica a concentraciones de proteína superiores a 0.46 mg/ml de sistema de reacción, y que curiosamente la intensidad de la caída de estas cinéticas varía con los tiempos de incubación de tejido herido; en conjunto con la observación del efecto promotor por diálisis sobre la actividad proteolítica, lo que sugiere que de existir este inhibidor también sus concentraciones varían dependiendo del tiempo de incubación.

Esta información podría ser el inicio de investigaciones sobre mecanismos de regulación a través de procesos de inducción y activación proteolítica descritos por Kahl, donde se hace referencia a que la herida induce cambios en la permeabilidad de la membrana, los cuales pueden ser transmitidos a células lejanas del sitio de herida y que pueden ser los que faciliten los flujos iónicos extensivos a la liberación de factores de enlace de membrana de células no dañadas que recibiesen la señal de herida. Los productos de células heridas pueden

enlazarse por receptores específicos del plasma-membrana o receptores del citoplasma de células lejanas del sitio de herida. Se desconoce por completo como es que estos factores u otros son transferidos al genoma; sin embargo una consecuencia de herida es la activación de genes, la síntesis de novo de mensajeros de peroxidasa, fenilalanina-amoniya liasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa los cuales después de su transporte al citoplasma son transportados por polisomas ya sea para obtener la enzima activa o un precursor inactivo el cual en turno puede activarse por proteólisis limitada.

Se podría pensar por otra parte, que el papel de las poliaminas en esas primeras horas después de herida sería el mantener el sistema metabólico en tejido herido hacia el anabolismo, a través de su posible papel en la estabilización de organelos, su papel definitivo en la estabilización y metabolismo de ácidos nucleicos y en la síntesis de proteínas, como se refleja parcialmente en el incremento en el contenido de proteína observado en las primeras horas de incubación de tejido herido.

En otros estudios, se ha observado que las partículas semejantes al lisosoma son sensibilizadas después de herida en células parenquimatosas de papa, dando lugar a que se secreten proteasas, las cuales hipotéticamente podrían destruir inhibidores de origen protéico, dentro de los cuales podría incluirse alguno de los posibles inhibidores detectados parcialmente en este estu-

dio; o proteínas inhibidoras y consecuentemente activar las enzimas latentes; en el que las enzimas proteolíticas, que se han detectado, podrían jugar un papel significativo, además de los que se le han buscado, sin grandes logros, como grupos de enzimas desactivantes de la actividad de las enzimas inducidas por herida, ya mencionadas, a un cierto tiempo de incubación de tejido herido.

## 5. CONCLUSIONES .

De los resultados obtenidos puede concluirse:

- Que existe correlación entre el incremento en el contenido de proteína y el contenido de poliaminas durante los tiempos de incubación de tejido herido de papa (Solanum tuberosum L.).
- Que existe correlación entre el incremento en el contenido de aminoácidos y el tiempo en que aparece la actividad proteolítica de el tejido herido.
- Que la aparición de la actividad proteolítica de el tejido herido es posterior al incremento del contenido de poliaminas.

Por lo tanto se podría concluir que el incremento observado, en tanto a los contenidos de proteína y poliaminas, fuese consecuencia de una fase primaria de diferenciación celular en el tejido herido de papa, en las primeras horas de incubación; mientras que la aparición de la actividad proteolítica podría representar la inducción de un probable sistema inactivante de todo un grupo de enzimas o una enzima en particular en horas más prolongadas de incubación de tejido herido.

## 6. BIBLIOGRAFIA .

- (1) Kahl, G.: Biochemistry of Wounded Plant Tissue. Walter de Gruyter, Berlin, 1-30, 1978.
- (2) Kahl, G.: Synthesis of r-RNA, t-RNA and other RNA-species concomitant with polyribosome formation in aging potato tuber slices. Z. Naturforsch, 266, 1058-1064, 1971.
- (3) Kahl, G.: Activation of protein synthesis in aging potato tuber tissue. Z. Naturforsch, 266, 1064-1067, 1971
- (4) Sparkhul, J., Gare, R.: Metabolism of free and membrane bound ribosomes during aging of Jerusalem artichoke tuber slices. Planta, 129, 97-104, 1976.
- (5) Stumpf, P., Conn, E.: Plant Proteinases. The Biochemistry of Plants. Vol. 6, cap. 8, 321-349, 1978.
- (6) Stark, G.R.: Enzymes function and regulation. Mc Graw Hill, 14-21, 1978.
- (7) Reithel, F.: The Dissociation and Association of Protein Structures, Adv. Protein Chem. 115-124, 1963.
- (8) Stadtman, E.: Mechanisms of Enzyme Regulation in Metabolism. Ann. Rev. Biochem., 37, 197-459, 1968.
- (9) Tanaka, Y., Matsushita, K.: Some investigations on inactivation of phenylalanine ammonia lyase in cut injured sweet potato root tissue. Plant Cell Physiol. 89, 1209-1216, 1977.
- (10) Pitt, D.: Increase in ribonuclease activity following mechanical damage to leaf and tuber tissues of Solanum tuberosum L. Planta, 101, 317-332, 1971.

- (11) Asahi, T., Wajima, R.: Effect of Antibiotics on biogenesis of mitochondria during aging of sliced sweet potato tissue. *Plant Cell Physiol.* 10, 317-323, 1969.
- (12) Aprees, T., Beevers, H.: Pentose phosphate pathways a major component of induced respiration of carrot and potato slices. *Plant Physiol.* 35, 839-847, 1960.
- (13) Minamikawa, T., Uritani, I.: Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced of black-rot infected sweet potato roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 573-574, 1964.
- (14) Zucker, M.: Sequential induction of phenylalanine ammonia lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiol.* 43, 365-374, 1968.
- (15) Smith, A.: Recent Advances in the Biochemistry of - Plant amines. *Phytochemistry*, 14, 865-890, 1975.
- (16) Tabor H., Tabor C.: Spermidina, Spermine and related amines. *Pharmacol. Rev.*, 16, 254-300, 1964.
- (17) Galston, W., Kaur-Sawhney, R.: Polyamines and Plant Cells, What's new in *Plant Physiology*, 11, 5-8, 1980.
- (18) Jakubowski, H.: Polyamines and Yellow Lupin aminoacyl-t-RNA synthetases. *FEBS-Letters*, 109,1, 63-66, 1980.
- (19) Algaranti, I., Goldemberg, S.: Polyamines and their role in protein synthesis. *Trends in Biochemical - Sciences*, 2, 272-274, 1977.
- (20) Kaur-Sawhney, R., Altman, A: Dual mechanisms in Polyamines mediated control of Ribonuclease activity in Oat leaf protoplasts. *Plant Physiol*, 62, 158-160 ,

1978.

- (21) Fracassini, S., Bagni, N.: Polyamines and Nucleic - Acids during the first cell cycle of Helianthus tuberosus tissue after the dormancy break. *Planta*, 148, 332-337, 1980.
- (22) Kaur-Sawhney, R., Shih, L.: Relation of Polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol.*, 69, 405-410, 1982.
- (23) Van Steveninck, R.: The "washing" or "aging" phenomenon in plant tissues. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 237-258, 1975.
- (24) Ryan, J.: Difussional factors in wounded phenomenon in plant tissues. *Biochim Biophys Acta*, 249, 177-180, 1972
- (25) Chapman, J., Edelman, J.: Mycrosomal fractions and protein synthesis in wounded tissue. *Plant Physiol.*, 42, 1140-1146, 1967.
- (26) Kominami, L., Kobazachi, S.: Properties of a specific protease for pyridoxal enzyme and its biological role *J. Biol. Chem.* 247, 6843-6855, 1974.
- (27) Kahl, G., Schäfer, W.: Changes in non-histone chromosomal proteins during the development of potato tuber their involvement in wounded- and hormone induced-process. *Plant and Cell Physiol.*, 20, 1217-1228, 1979.
- (28) Lowry, O., Rosebrough, N.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 1951.
- (29) Raymondjean M., Bogdanovsky, D.: Improved and easy - technique for polyamine determination in biological -

- samples. *J. Chromatography*, 162, 547-559, 1979.
- (30) Rosen, H.: A modified ninhydrin colorimetric analysis for aminoacids. *Archives of Biochem and Biophysics*, 67, 10-15, 1957.
- (31) Miller, B.: Partial Purification and Characterization of Endoproteinases from senescing Barley leaves. *Plant Physiol.*, 68, 930-936, 1981.
- (32) Green, A., Hughes, W.: Ammonium sulphate table, *Methods Enzymol.*, 1, 67-90, 1955.