

## 6.- CYNARA SPP.

### 6.1 INTRODUCCIÓN

*Cynara scolymus* L. pertenece a la familia Asteraceae-Cardueae (Wiklund 1992). Es probablemente nativa del norte de África o del sudoeste de Europa.

Existe una controversia taxonómica respecto de las especies que integran el género *Cynara*. Linnaeus (1753) clasificó a *C. cardunculus* y *C. scolymus* como dos especies diferentes del género *Cynara*, mientras que Wiklund (1992) considera que el cardo y el alcaucil son cultivares de la misma subespecie (*C. cardunculus flavescens*) y Rottenberg & Zohary (1996) sostienen que el alcaucil, el cardo silvestre y el cardo cultivado constituyen una especie única: *C. cardunculus* L.

Varios estudios botánicos han sostenido que tanto el cardo como el alcaucil derivan de un antepasado común: *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori (= *C. sylvestris* Lamk) y que dichas especies se fueron diferenciando por selección de los horticultores. El alcaucil habría resultado de la elección de las plantas con capítulos más grandes y tiernos y el cardo por selección de las plantas de peciolo más anchos y gruesos (Avila, 1987).

### 6.2. CYNARA SCOLYMUS L.

El alcaucil es una planta perenne ampliamente distribuida en las regiones del Mediterráneo, siendo también muy cultivada en Estados Unidos, Argentina y Nueva Zelanda (Ordas *et al.*, 1990). Normalmente se propaga vegetativamente, aunque en los comienzos el cultivo fue por semillas (Ancora, 1986).

La parte comestible del alcaucil es la cabeza floral inmadura y la porción de tallo inmediatamente por debajo. Después de la papa, es considerado uno de los productos hortícolas con mayor valor energético, pues es rico en azúcares y proteínas y tiene alto contenido de calcio, magnesio e hierro. Por otra parte, el resto de la parte aérea de la planta, con alto valor nutritivo, puede utilizarse como alimento animal (Ancora, 1986).

Además de ser una planta alimenticia para el hombre, desde los comienzos de la era cristiana se reconocen en diversos órganos de esta hortaliza distintas propiedades terapéuticas, atribuyéndole acción diurética, de activación de la secreción biliar, con efecto sobre el metabolismo del colesterol y poseedora de propiedades antirreumáticas (Avila, 1987). Los principios activos de mayor aplicación clínica del alcaucil, son la *cinarina* (ácido 1,5-dicafeoilquínico) (Panizzi y Scarpati, 1954; Preziosi & Localzo, 1956; Cordeiro *et al.*, 1998) y varios flavonoides y poliacetilenos (Hammouda *et al.*, 1993; El-Negoumy *et al.*, 1987).

El resultado de investigaciones clínicas actuales muestran la eficacia y seguridad de usar extractos de hojas de alcaucil en el tratamiento de las disfunciones hepato-biliares y digestivas, atribuyendo el efecto hepatoprotector e hipolipidémico a los flavonoides y al ácido cafeoilquínico presentes en el alcaucil (Wegener & Fintelmann, 1999). Por otro lado Gebhardt (1998) demuestra que esos extractos inhiben la biosíntesis del colesterol en los cultivos de hepatocitos de rata y que el efecto no se debe a los ácidos cafeico ni dicafeoilquínico como había sido establecido por varios autores, sino a los flavonoides luteolina y cinarosida.

El alcaucil puede ser propagado satisfactoriamente por cultivo de meristemas y es razonable asumir que en el futuro la micropropagación puede sustituir a los métodos tradicionales de propagación, si se logra con costos adecuados. Esto permitiría mayores rendimientos con ventajas sanitarias y económicas derivadas de la reducción de los tratamientos químicos actualmente necesarios para controlar las plagas que lo atacan. Además, observaciones agronómicas han demostrado que las plantas micropropagadas son superiores en vigor y en rendimiento de número de cabezas florales que las controles. (Harbaoui *et al.*, 1982; Pecaut *et al.*, 1983).

### **6.2.1. Características botánicas y sistemática varietal**

Los cultivares actuales del alcaucil tienen una gran heterogeneidad, debido al alto porcentaje de alogamia. Además es común observar en esta hortaliza la manifestación de mutaciones de yema y variantes inestables.

El número de cultivares ha aumentado paulatinamente y resulta muy difícil clasificarlos, existiendo discrepancias entre distintos autores sobre el modo de hacerlo. Es frecuente la sinonimia, debido probablemente al intercambio de material de propagación entre diferentes regiones y países a través del tiempo.

En el campo experimental del *Cynar Studi Centre en Polignano a Mare* (Bari, Italia) se mantiene el germoplasma de 115 cultivares recolectados en todo el mundo, de los cuales 80 son de procedencia italiana, 21 de Francia, 2 de Argentina (Blanco y Ñato) y el resto de Egipto, Turquía, Estados Unidos, España, Túnez e Israel (Ancora, 1986; Avila, 1987)

Para realizar esta clasificación de cultivares existentes en el mundo se tuvieron en cuenta los caracteres morfológicos de la planta (altura, porte, aptitud gemífera), de las hojas (color, presencia de espinas, dimensiones, heterofilia) y del capítulo principal (forma, compactibilidad, dimensiones, longitud y espesor del pedúnculo y color, forma, espinas y dimensiones de las brácteas). Además se consideraron caracteres productivos

como el número de capítulos por planta, el peso y precocidad y la duración del ciclo productivo (Avila, 1987).

### **6.2.2. Aspectos económicos**

La producción mundial de alcauciles en 1993/1994 fue de 1.300.000 toneladas. Los países productores son: Italia, España, Francia, Argelia, Marruecos, Egipto, Turquía, Túnez, Estados Unidos y Grecia (Rodríguez *et al.*, 1996). Argentina ocupaba el quinto lugar con un volumen de 78.000 toneladas (Pécaut & Foury, 1992), pero el área cultivada de alcaucil ha disminuido en los últimos años, con solamente 6000 hectáreas sembradas en 1996 (Rodríguez *et al.*, 1996). Ello puede atribuirse a los inconvenientes encontrados en el arraigo de los hijuelos de diferentes cultivares, a los problemas sanitarios de la especie y a que la producción sólo se comercializa en el mercado interno.

En Argentina se realiza la explotación agrícola de los cultivares Ñato, Violeta, Blanco Temprano y Tardío, Francés Precoz y Tardío, Precoz Italiano, Green Globe y Platense. Casi el 80 % del total cultivado en nuestro país se encuentra en el cinturón hortícola de La Plata, seguida por el de Rosario (Avila, 1987).

## **6.3. CULTIVO IN VITRO DE CYNARA SPP.**

### **6.3.1. Micropropagación**

El primer registro sobre el cultivo *in vitro* de alcaucil fue publicado por Toponi (1960), quien reporta el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la proliferación celular y producción de callos a partir de brácteas (Ancora, 1986). Desde ese momento se han desarrollado varios protocolos de micropropagación de cultivares europeos de alcaucil (Ancora *et al.*, 1981; Debergh *et al.*, 1981; Moncousin, 1981; Pecaut *et al.*, 1983; Bigot & Foury, 1984; Rossi & De Paoli, 1992; Kanakis & Demetriou, 1993; Morzadec & Hourmant, 1997) y del cultivar Green Globe (Lauzer & Vieth, 1990). Todos los autores coinciden en indicar que la rizogénesis es la etapa crítica del cultivo *in vitro* del alcaucil. Recientemente se ha desarrollado en nuestro laboratorio de la UNLu una metodología para lograr la micropropagación del cultivar Francés Precoz de *Cynara scolymus* L. La adición de ciclodextrinas al medio de enraizamiento permitió triplicar el porcentaje de enraizamiento y duplicar el número de raíces diferenciadas por explanto que se producían en el medio de cultivo con auxinas y sin ciclodextrinas (Brutti *et al.*, 2000).

### 6.3.2. Callos y suspensiones

A partir de segmentos de hipocótilos y de hojas de *C. cardunculus* L., Figueredo *et al.* (1987) obtuvieron callos friables que se utilizaron para establecer suspensiones celulares en el medio B5 de Gamborg (1968) suplementado con 2,4-D y BA y en el medio TNO<sub>3</sub> (Behrends & Mateles, 1975) con 2,4-D y cinetina. Se obtuvieron diferentes patrones de crecimiento en estos dos medios con un buen desarrollo de la biomasa en el B5, en donde el tiempo de duplicación fue de 33,6 horas.

La formación de callos de alcaucil se ha realizado a partir de varios tejidos y bajo diferentes condiciones de cultivo. El cultivo de brácteas en un medio con 2,4-D y agua de coco produjo una gran masa de callos, mientras que el AIA no fue efectivo si se usaba sólo, pero resultó activo cuando se suplementó con cinetina (Toponi, 1960). Al cultivar el receptáculo en un medio con 2,4-D y BA o Zea también se promovió una profusa formación de callos (Devos *et al.*, 1975). Ordas *et al.* (1991) obtuvieron callos y lograron establecer suspensiones celulares de *Cynara scolymus* L. cv. Romanesco en medio MS con ANA y BA. De las suspensiones aislaron protoplastos que formaron callos, pero no lograron generar plántulas.

### 6.4. PEPTIDASAS DE *CYNARA SPP.*

De las 8 especies diferentes del género *Cynara* clasificadas en la revisión taxonómica realizada por Wiklund (1992), la especie más utilizada para fabricar quesos es *C. cardunculus* L. (cardo silvestre), aunque en España se usan flores de *C. humilis* en la manufactura de varios quesos (Serena, Torta del Casar, Pedroches, Grazalema). Cordeiro *et al.* (1994a) cita que otros miembros de la familia Asteraceae, como *C. scolymus* L., *Centaurea calcitrapa*, *Sylibum marianum* y *Onopordum turcicum* también poseen actividad coagulante.

#### 6.4.1. Peptidasas de *Cynara cardunculus* L.

Los extractos acuosos de las flores de cardo son tradicionalmente utilizadas en Portugal para hacer quesos de oveja tales como Serra, Serpa, Azeitão y Castelo Branco, con características organolépticas diferentes de los que se obtienen con quimosina bovina o reninas microbianas. Estos quesos presentan características distintivas en aspecto y sabor dependiendo de la región en la que son elaborados y a las condiciones de recolección y almacenamiento de las flores y de maduración del queso. Así, el queso Serra es blando, cremoso y presenta un sabor débilmente amargo y picante, mientras que el queso Serpa presenta mayor firmeza y un fuerte sabor (Cordeiro *et al.*, 1998). Las propiedades reológicas de los coágulos producidos por estos extractos sobre diferentes

tipos de leche fueron investigadas por Sá y Barbosa (1972), quienes concluyen que los extractos de flores de cardo son sustitutos satisfactorios del cuajo bovino en la preparación de quesos blandos. La actividad coagulante de los extractos florales es debida a enzimas proteolíticas presentes en los pistilos, descritas por Faro *et al.* (1987) como peptidasas ácidas. Estudios posteriores revelaron la heterogeneidad de estas enzimas. Por un lado, Heimgartner *et al.* (1990) purifican y caracterizan parcialmente tres peptidasas aspárticas heterodiméricas coagulantes de la leche: cynarasas 1, 2 y 3 (actualmente llamadas ciprosinas) en extractos acuosos a pH 8,3 de flores secadas al aire. En estas condiciones se previene la autohidrólisis durante la purificación (Cordeiro *et al.*, 1998). Por otro lado, Faro *et al.* (1995) y Veríssimo *et al.* (1995, 1996) aíslan dos nuevas peptidasas aspárticas de estigmas frescos (cardosinas A y B) al realizar la extracción a pH 3,0. A este pH las enzimas están muy activas y es posible que se produzca autohidrólisis (Cordeiro *et al.*, 1998).

#### 6.4.1.1. *Cynarasas o Ciprosinas*

Las ciprosinas 1, 2 y 3 descritas por Heimgartner tienen una masa molecular nativa de 49-50 kDa y cada peptidasa está formada por una subunidad mayor y otra menor.

Las 3 ciprosinas presentan características comunes y diferenciales. Tienen en común el hecho de ser endopeptidasas glicosiladas (N ligado a glicanos de alta manosa), exhibir máxima actividad proteolítica a pH 5,1 (usando caseína como sustrato), cortar preferencialmente enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos con cadenas hidrofóbicas y ser fuertemente inhibidas por pepstatina A. Entre las principales características diferenciales (*Tabla 7*) puede señalarse que son eluidas con distintas concentraciones de cloruro de sodio en las columnas de intercambio iónico (lo que hace presumir diferentes valores de pI), presentan subunidades de tamaños ligeramente diferentes, difieren en el patrón de glicosilación y muestran notables diferencias en la actividad proteolítica específica y coagulante de la leche.

Al comparar la actividad coagulante de la leche y la actividad proteolítica de las ciprosinas con las de la quimosina, Cordeiro *et al.* (1992) observan que la ciprosina 3 es la que presenta mayor actividad proteolítica específica y coagulante sobre leche de vaca (*Tabla 7*) y que ella es superior a la de quimosina.

**Tabla 7.-** Características diferenciales de las cipsosinas (adaptado de Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1992)

	[NaCl] en intercambi o iónico (M)	PM PAGE (kDa)	PM Gel Filtració n (kDa)	PM subunida d mayor (kDa)	PM subunidad menor (kDa)	Actividad proteolític a relativa (%)	Actividad coagulante relativa (%)
<b>Ciprosina 1</b>	0,2	49	41	32.5 ± 1.0	16.5 ± 0,5	10,1	14.3
<b>Ciprosina 2</b>	0,3	49	42	33.5 ± 1.0	16.5 ± 0,5	9.5	7.4
<b>Ciprosina 3</b>	0,5	49	45	35.5 ± 1.0	13.5 ± 0,5	100	100

La cipsosina 3 también muestra una actividad coagulante de la leche de oveja marcadamente mayor que la quimosina, presentando más especificidad hidrolítica sobre estas caseínas que sobre las de vaca. En el último sustrato hidroliza, además de la  $\kappa$ -caseína, las  $\alpha_{s-1}$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - caseínas, produciendo al menos 5 nuevos péptidos. Estos péptidos serían los responsables del marcado sabor amargo de los quesos obtenidos con leche de vaca y permite explicar por qué en la manufactura de quesos típicos portugueses se utiliza empíricamente leche de oveja en lugar de leche de vaca (Cordeiro *et al.*, 1992).

Estudios posteriores de Cordeiro *et al.* (1994a, 1998) revelan que las cipsosinas 2 y 3, aparentemente puras, descritas por Heimgartner presentan microheterogeneidad. Así, la cipsosina 3 puede ser separada en 3 isoenzimas con puntos isoeléctricos 3,85 ( $3\alpha$ ), 4,00 ( $3\beta$ ) y 4,15 ( $3\gamma$ ) al realizar una electroforesis bidimensional (IEF y SDS-PAGE).

La acumulación órganoespecífica de las cipsosinas ha sido estudiada en yemas florales y en flores de distinto grado de desarrollo, en estilos, corolas, hojas y semillas (Cordeiro *et al.*, 1994a). La inmunocoloración del Western blot realizado con anticuerpos contra la subunidad mayor de las cipsosinas 1, 2 y 3 revela baja cantidad de cipsosinas en flores muy jóvenes, con un incremento en los estados posteriores de desarrollo y acumulación de estas enzimas en las partes violetas de estilos y corolas. La presencia de la subunidad mayor de cipsosina 3 se detecta al comienzo del desarrollo floral, mientras que las subunidades mayores de cipsosinas 1 y 2 se visualizan en estadios más avanzados. Estos autores no detectan la enzima en hojas, nervaduras y semillas. Si bien la concentración de proteínas totales no muestra diferencias significativas durante el desarrollo floral, en el SDS-PAGE se visualiza un patrón dinámico de dichas proteínas. La

aplicación de técnicas inmunohistológicas, usando anticuerpos contra la subunidad mayor de cipsosina 3, muestra que la enzima se localiza en la capa de células epidérmicas de los estilos.

Con la finalidad de estudiar la expresión y regulación del gen de la cipsosina, Cordeiro *et al.* (1994b) aislaron el mRNA de yemas florales de *C. cardunculus* L. y prepararon una librería de cADN de la que seleccionaron los clones que reaccionaron contra el anticuerpo contra la subunidad mayor de cipsosina 3. Usando uno de estos clones (*cypro 1s*) como sonda en un análisis Northern blot, observaron un incremento de la intensidad de hibridización desde los estadios tempranos de las flores hasta botones florales de 4 cm. En las flores de 5 cm y en los estilos de dichas flores no visualizaron señales de hibridización, lo que indica que la síntesis del mRNA que codifica la cipsosina comienza en estadios tempranos del desarrollo floral y termina en la flor madura.

Luego Cordeiro *et al.* (1998) aislaron y caracterizaron dos cADN que codifican la cipsosina (*cypro1s* y *cypro11*). El *cypro1s* codifica para 505 aminoácidos que producen una proteína madura, la cipsosina A, de 440 aminoácidos. El *cypro11* codifica los 509 aminoácidos que generan la cipsosina B, de 441 aminoácidos. Las secuencias deducidas de aminoácidos para cipsosina A y cipsosina B presentan una homología del 92 %.

Además, la secuencia de aminoácidos codificada por *cypro 1s* muestra un 95 % de homología con la aspartil peptidasa de cebada (HvAP; Cordeiro *et al.*, 1994b) y un 73 % con la secuencia de la peptidasa aspártica de arroz (OsAP; Asakura *et al.*, 1997). Si se omite la secuencia de aminoácidos de la región específica de plantas (PSI), la homología de la cipsosina con las peptidasas aspárticas de mamíferos resulta relativamente alta: 92 % con catepsina D humana y 85 % con quimosina bovina, teniendo mayor homología aún con las APs de plantas: 98,8 % con HvAP y 94,1% con OsAP (Cordeiro *et al.*, 1994b). El PSI se conserva en un 43 % en las tres enzimas vegetales mencionadas. El hecho de que durante la evolución esta región haya divergido en un grado mayor que las regiones N- y C- terminales parece indicar que es de menor importancia en la estructura y función de estas enzimas, aunque en ella se conservan los seis residuos de cisteína que forman puentes disulfuro. Esto podría indicar que se mantiene la estructura terciaria de esa región.

Además, el cADN codificante del precursor de la cipsosina fue expresado en la levadura *Pichia pastoris* y la cipsosina recombinante expresada en el medio de cultivo presenta microheterogeneidad con cadenas pesadas glicosiladas de 34 o 32 kDa y cadenas livianas con pesos moleculares entre 14 y 18 kDa. Esta heterogeneidad se produce por la escisión de muchos, pero no de todos, los residuos del PSI (White *et al.*, 1999).

#### 6.4.1.2. *Cardosinas*

Las enzimas obtenidas de estigmas de flores frescas de cardo por extracción a pH 3 han sido denominadas cardosina A y cardosina B (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1995,1996). La extracción a bajo pH elimina gran parte de las proteínas y produce una preparación enzimática con alta actividad específica (5 veces mayor que la obtenida por extracción a pH 7,6). Esta extracción a bajo pH les permite realizar la purificación en sólo 2 pasos:

- 1.- filtración en gel (Superdex 200 o Superosa 6) que elimina fenoles y pigmentos, obteniéndose un único pico con actividad proteolítica, y

- 2.- HPLC de intercambio iónico (MonoQ) del pico anterior, que permite obtener dos picos proteolíticamente activos (cardosinas A y B). Cada uno de ellos presentan en SDS-PAGE dos bandas de cardosina A (31 y 15 kDa) y 2 bandas de cardosina B (34 y 14 kDa).

Las bandas de 34, 31 y 15 kDa se tiñen con reactivo de Schiff, lo que indica que están glicosiladas. Esto también lo comprueban realizando el SDS-PAGE después de deglicosilar; allí la cardosina A presenta dos cadenas de 28 y 14 kDa y la cardosina B muestra cadenas de 30 y 14 kDa. La diferencia en el peso molecular está dada por las cadenas glicosídicas presentes en las dos subunidades de cardosina A y de la subunidad mayor de cardosina B.

Las cardosinas son activas entre pH 2 y 7, con máxima actividad a pH 5,0-5,5. Son inhibidas por pepstatina A y diazoacetil metil éster, indicando que pertenecen al grupo de las peptidasas aspárticas. Aunque presentan actividad a temperaturas superiores a los 65°C son relativamente inestables a altas temperaturas (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1996). Además son estables en presencia de urea  $\geq$  6M, sugiriendo que existe una fuerte interacción entre las dos cadenas de cada cardosina (Veríssimo *et al.*, 1996). Barros *et al.* (1992) determinaron que la peptidasa extraída a pH 3 es muy estable en sistemas bifásicos acuoso-orgánicos, principalmente con n-hexano y que puede ser usada para producir dipéptidos con el enlace Phe-Met.

La actividad proteolítica del extracto ácido (pH 3,0) de *C. cardunculus* L. sobre la insulina oxidada y la  $\kappa$ -caseína bovina fue estudiada por Faro *et al.* (1992) y Macedo (1993). El clivaje sobre  $\kappa$ -caseína se realiza en la unión Phe105-Met106, al igual que el producido por otras peptidasas ácidas tales como quimosina y pepsina. Al comparar los sitios de clivaje de varias peptidasas ácidas sobre la cadena B de insulina oxidada, observan que la cardosina A de *C. cardunculus* L. tiene mayor especificidad, mientras que la cardosina B produce mayor cantidad de péptidos, es mucho menos selectiva y



rompe los enlaces peptídicos a mayor velocidad que la cardosina A (Veríssimo *et al.*, 1995).

El análisis por Western blotting usando antisuero contra la cadena de 31 kDa (Faro *et al.*, 1995; Veríssimo *et al.*, 1996) muestra que no hay inmunoidentidad entre cardosina A y B. Esto se confirma con el análisis de los N-terminales y de la secuencia interna de aminoácidos de cada una de las cadenas de las cardosinas, que demuestran que si bien ambas son similares, no son idénticas y difieren también de las ciprosinas.

Las diferencias en las secuencias de aminoácidos y en las reacciones inmunológicas indican que la cardosina A, la cardosina B y las ciprosinas son productos de genes diferentes (Veríssimo *et al.*, 1996).

La secuencia de aminoácidos deducida del cADN de la cardosina A muestra un 77 % de similitud con ciprosina1, 75 % con HvAP, 70 % con OsAP y 40 % con catepsina D humana (Faro *et al.*, 1998).

La especificidad y los parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_m$  de esta enzima sobre  $\kappa$ -caseína bovina fueron determinados por Macedo *et al.* (1993), quienes hallaron que si bien el coeficiente proteolítico  $k_{cat}/K_m$  es del mismo orden de magnitud que los obtenidos con otras enzimas coagulantes de la leche, el valor de  $K_m$  es significativamente menor que el de quimosina y pepsina, lo que refleja la mayor afinidad de la peptidasa de cardo por la  $\kappa$ -caseína (Tabla 8).

**Tabla 8.-** Parámetros cinéticos de la hidrólisis del enlace Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína por cardosina, quimosina y pepsina A.

Enzima	pH	Kcat (s <sup>-1</sup> )	Km ( $\mu$ M)	kcat/Km ( $\mu$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Sustrato	Cita
Cardosina	6,4	1,04	0,16	6,5	$\kappa$ -caseína intacta	Macedo <i>et al.</i> (1993)
Quimosina	6,6	93,3	31,8	2,9	$\kappa$ -caseína B	Vreesman <i>et al.</i> (1985)
Quimosina	6,2	68,7	4,9	1,4	$\kappa$ -caseína B	Carles y Martin (1985)
Pepsina A	6,2	45,6	1,9	2,4	$\kappa$ -caseína B	Carles y Martin (1985)

Los parámetros cinéticos de la hidrólisis del hexapéptido cromofórico Leu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-oMe muestran similitud entre cardosina A y quimosina y entre cardosina B y pepsina porcina (Tabla 9). Lo mismo observan Veríssimo *et al.* (1996) al estudiar las constantes cinéticas de otros dos péptidos sintéticos. Esto lleva a los autores a afirmar que la composición de la “renina de cardo” recuerda a la “renina bovina”.

El aislamiento y caracterización de enzimas del tipo cardosina de otras dos especies de *Cynara*, *C. humilis* y *C. scolymus* L. y su comparación con las cardosinas fue

estudiado por Veríssimo *et al.* (1998). En el extracto (pH 3) purificado de los pistilos de ambas especies obtienen peptidasas aspárticas que en el SDS-PAGE muestran similitud con las cardosinas pero el estudio de los parámetros cinéticos de las APs de las tres especies de *Cynara* revela diferencias que sugieren que probablemente exista disparidad en los sitios activos.

**Tabla 9.-** Parámetros cinéticos de la hidrólisis del péptido sintético Leu-Ser-Phe(NO<sub>2</sub>)-Nle-Ala-Leu-oMe por cardosina A y B, quimosina y pepsina (adaptado de Veríssimo *et al.*, 1995; Faro *et al.*, 1995; Martin P, 1984)

Enzima	Km (mM)	Kcat (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Cardosina A	1,08	23,6	21,87
Quimosina	0,98	25,1	25,6
Cardosina B	0,08	85,5	1057
Pepsina	0,03	54	1640

#### 6.4.2. Localización celular e hipótesis sobre el rol fisiológico

Las cardosinas A y B se expresan específicamente en la parte femenina de las flores (pistilo) desde estadios tempranos del desarrollo floral hasta estadios senescentes. La localización celular de cardosina A fue realizada por Ramalho-Santos *et al.* (1997) utilizando técnicas inmunohistoquímicas, observando que se acumula principalmente en vacuolas que almacenan proteínas de las papilas estigmáticas y en las células epidérmicas de la parte superior del estigma. En mucho menor cantidad se localizan en las vacuolas de las células de la epidermis de los estilos. Por otro lado, la cardosina B se encuentra en la matriz extracelular de los estigmas (Faro *et al.*, 1998). Esta localización diferencial parece indicar que las dos cardosinas cumplirían diferentes funciones en la flor, aunque no excluyen que estén involucradas en el mismo proceso fisiológico.

Ramalho-Santos *et al.* (1997) proponen que la cardosina A tendría una función primaria en la interacción de las flores de *C. cardunculus* L. con patógenos y/o con el polen y una función secundaria en la senescencia anual de la flor. El rol en mecanismos de reconocimiento del polen es avalado por la identificación de la tríada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de aminoácidos deducida del cADN y su interacción con una proteína de 100 kDa del polen (Faro *et al.*, 1999), como se expuso en el apartado 3.3.

Por otro lado, Cordeiro *et al.* (1994a) describen que las ciproquinas se acumulan en la capa epidérmica de los estilos, pero no proporcionan datos de su localización subcelular.

### 6.4.3. Genes

**Ciproquinas.** Al analizar los datos mostrados en la *Tabla 7*, Heimgartner *et al.* (1990) postularon que las tres ciproquinas son los productos de diferentes procesamientos de un precursor común.

Por otro lado, Cordeiro *et al.* (1994a) proponen el siguiente modelo para explicar la microheterogeneidad de la población de ciproquinas: a) al menos tres genes codifican para los zimógenos de ciproquina, b) la remoción del propeptido N-terminal produce las tres ciproquinas maduras, c) la hidrólisis de las cadenas peptídicas, con o sin remoción de pequeños péptidos o por cortes de la cadena en diferentes posiciones, produce tres ciproquinas heterodiméricas y d) el procesamiento proteolítico de las enzimas maduras produciría isoenzimas de cada una de ellas.

Los datos anteriores permiten suponer a Cordeiro *et al.* (1994b) que todas las peptidasas aspárticas derivan de la misma proteína ancestral y que la región específica de plantas (PSI) fue introducida durante la evolución por un proceso de intercambio intrón-exón o por la inserción de un nuevo exón. Además, la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y el patrón de hibridización en el Southern blot que muestra varias bandas lleva a estos autores a sugerir que los genes de ciproquina están organizados como una familia multigénica y que la simultánea expresión de genes distintos podría explicar la heterogeneidad del producto génico.

**Cardosinas.** Veríssimo *et al.* (1998) sugieren que la cardosina A podría ser una forma ancestral de las cardosinas y que la cardosina B pudo haber surgido por duplicación génica a lo largo de la evolución, representando una especialización para un rol particular en el pistilo vinculado con la reproducción sexual.

### **6.5. PRODUCCIÓN DE PEPTIDASAS POR CULTIVO *IN VITRO* DE *CYNARA CARDUNCULUS* L.**

La producción de peptidasas por suspensiones celulares de *Cynara cardunculus* L. ha sido estudiada (Cordeiro *et al.*, 1993) en los medios B5 de Gamborg (1968) y TNO<sub>3</sub> de Behrend & Mateles (1975), encontrándose que el primer medio fue adecuado para la producción de biomasa, mientras que el segundo promovió la síntesis de peptidasas. Las peptidasas obtenidas presentaron una alta heterogeneidad y propiedades diferentes a las cipsosinas extraídas de flores, ya que mientras estas últimas son inhibidas por pepstatina, las producidas en cultivos celulares resultaron sensibles a inhibidores de peptidasas cisteínicas (cistatina y leupeptina). Además, los Western y Northern blots mostraron que las cipsosinas específicas de flores no fueron expresadas en las condiciones de cultivo de esas suspensiones celulares.

El crecimiento de suspensiones celulares de *C. cardunculus* L. y la producción de peptidasas y fenoles fue estudiado por Lima Costa *et al.* (1996). Observaron que la síntesis de peptidasas está asociada a la fase de crecimiento exponencial, lo que indica su vinculación al metabolismo primario. Los cultivos en fermentador con limitada concentración de sacarosa presentaron mayor productividad y estabilidad que los cultivos en "batch". No observaron la producción de fenoles en la fase estacionaria de los cultivos de *C. cardunculus* L. en fermentador, en tanto que ellos se acumularon en los cultivos en "batch". El bajo contenido de fenoles sugiere a los autores que las condiciones del fermentador no producen estrés celular y por lo tanto el metabolismo secundario estaría reprimido, favoreciendo el metabolismo primario y la expresión de las peptidasas. En este trabajo se midió la actividad proteolítica total sobre azocaseína y las peptidasas producidas no fueron caracterizadas.