

PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO A PARTIR DEL LÁTEX DE *ARAUJIA ANGUSTIFOLIA*

El extracto crudo (EC) fue sometido a un proceso de purificación cromatográfica (FPLC), utilizando como intercambiador catiónico SP-Sepharose en buffer tris HCl 55 mM, de pH 7,4 y para la elución un gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M). Se obtuvieron dos fracciones no retenidas sin actividad proteolítica pero con muy buena actividad pectilmetilesterásica y seis fracciones retenidas, de las cuales tres mostraron actividad proteolítica, correspondientes a los picos aI, aII y aIII (Fig. 1).

Las fracciones proteolíticamente activas se denominaron araujaína aI, aII y aIII, respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura propuesta para nuevas proteasas vegetales (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991).

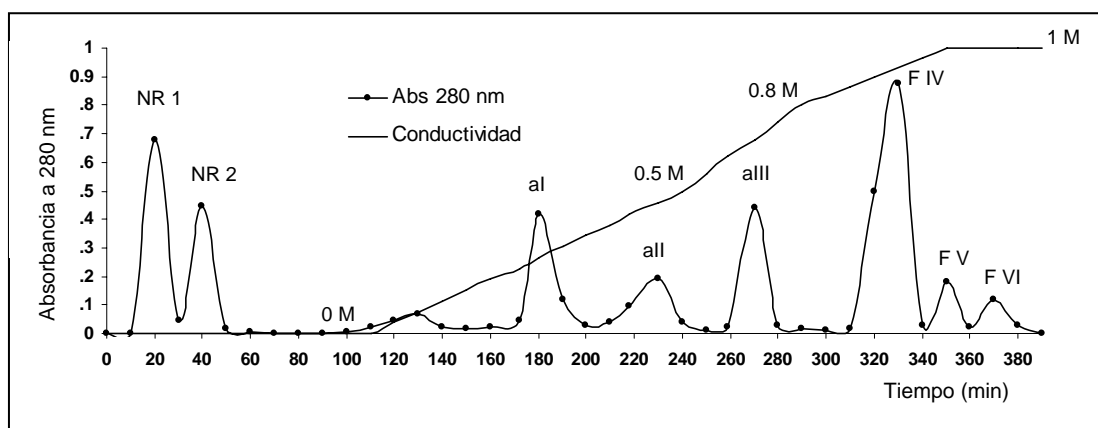


Figura 1. Cromatografía de intercambio catiónico (SP-Sepharose Fast Flow) del extracto crudo de *Araujia angustifolia* realizada en un sistema FPLC. Gradiente discontinuo de NaCl (0,0-0,5 M, 0,5-0,8 M y 0,8-1,0 M). Velocidad de flujo 0,5 mL/min. Se recogieron fracciones de 2 mL.

Además de actividad proteolítica, estas enzimas exhibieron actividad amidolítica y esterolítica. Las fracciones FIV-FVI probablemente son péptidos, ya que dieron positivo el ensayo del Biuret pero negativo el de Bradford. Por otra parte, las fracciones NR1 y NR2 muestran un bajo contenido de proteínas

(Bradford), por lo cual quizás también contenga una apreciable cantidad de pequeños péptidos.

Como se consigna en el esquema de purificación (Tabla 1), araujaína aII y araujaína aIII exhibieron los mayores valores de actividad específica, siendo araujaína aIII la de mayor rendimiento.

Muestra	Vol (ml)	Contenido en proteínas mg/ml	Proteína total (mg)	Actividad Caseinolítica Ucas/ml	Ucas totales	Actividad específica (Ucas /mg)	purificación (veces)	rendimiento (%)
EC	2	2,233	4,466	8,52	17,04	0,0038		
Araujaína a I	6	0,098	0,587	0,19	1,14	0,0019	0,5	13
Araujaína a II	5	0,055	0,277	0,17	0,85	0,0031	0,82	6,2
Araujaína a III	8	0,176	0,141	0,49	3,92	0,0027	0,71	31,2

Tabla 1. Esquema de purificación del extracto crudo de *Araujia angustifolia*.

La homogeneidad de araujaína aI, aII y aIII fue analizada por electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida, y posterior revelado por tinción con plata (Fig. 2). Las fracciones activas obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico (inhibidas y no inhibidas con iodoacetato de sodio) fueron sometidas a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en gradiente (14-20 %) para amplificar la resolución. Se utilizó un equipo Miniprotean III (Bio-Rad) con un amperaje de 30 mA para el stacking y 150 mA para el desarrollo de la corrida. El gel fue teñido con Coomassie brilliant blue R-250 y posteriormente con Plata, comprobándose la homogeneidad de las fracciones purificadas. Se observó que la ausencia de inhibidor no genera autodigestión de las mismas.

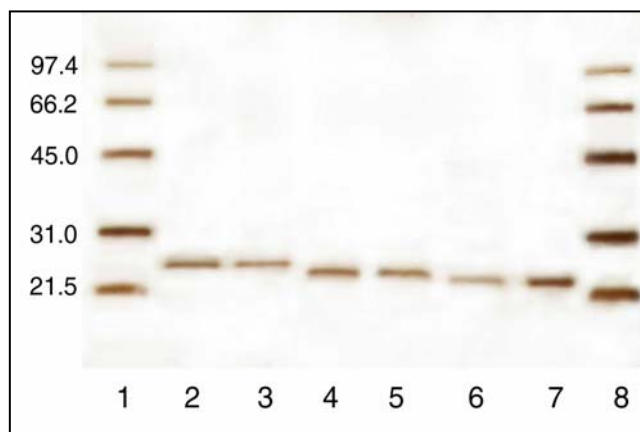


Figura 2. SDS-PAGE en gradiente de araujiaina aI, aII y aIII, en presencia y ausencia de inhibidor. Calles 1 y 8: Marcadores de peso molecular (Bio Rad): Fosforilasa b (97,4 kD), Seroalbúmina bovina (66,2 kD), Ovalbúmina (45,0 kD), Anhidrasa carbónica (31,0 kD), Inhibidor de tripsina (21,5 kD) y Lisozima (14,4 kD); Calles 2, 4 y 6: araujiainas aI, aII y aIII, respectivamente, inhibidas con iodoacetato; Calles 3, 5 y 7: araujiainas aI, aII y aIII, respectivamente, sin agregado de inhibidor.

En función de estos resultados, el peso molecular de araujiaina aI, aII y aIII se estimó en 23 kD, 21 y 23 kD; valores que son del mismo orden que los obtenidos para otras proteasas de *Asclepiadaceae*. Como las proteasas de *Asclepias syriaca* (Brockmank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980), *Asclepias glaucescens* (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991), las cuatro calotropinas aisladas a partir del látex de *Calotropis gigantea* (Abraham & Joshi, 1979a, 1979b; Pal & Sinha, 1980), las dos proteasas aisladas a partir de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998), las proteasas de *Morrenia odorata* (Arribére *et al.*, 1999), la proteasa de *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al.*, 2001) y la proteasa aislada a partir del látex de *Philibertia gilliessi* (Sequeiros *et al.*, 2005)

Las masas moleculares de las enzimas purificadas se determinaron luego con más exactitud utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF), que arrojó valores de 23465 D para araujiaina aI; 23528 D para araujiain aII y 23489 D para araujiaina aIII, confirmando los datos electroforéticos previos (Fig. 3).

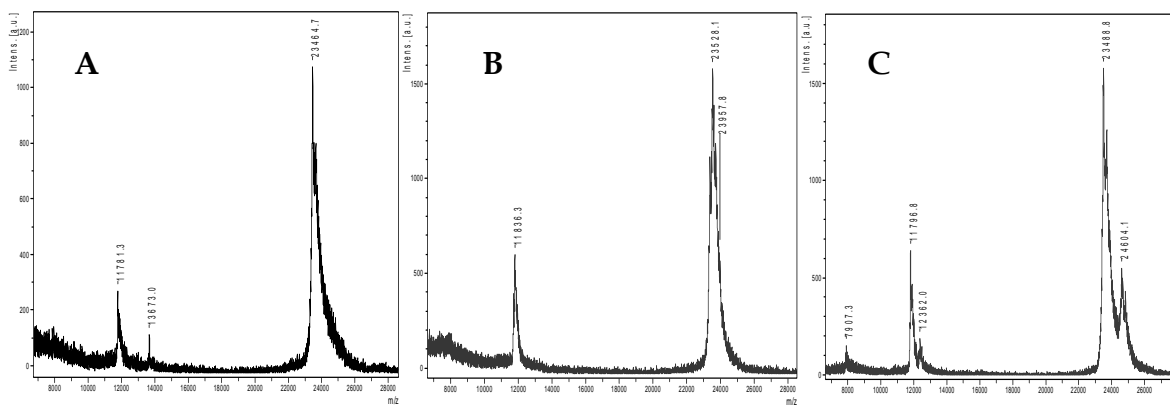


Figura 3. Espectrometría de masas (MALDI-TOF) de araujiaina aI (A), aII (B) y aIII (C).

A continuación se estudió el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las enzimas purificadas. El rango de pH óptimo para araujiaina aI y aII fue bastante estricto, entre 9 y 9,5 y entre 8 y 8,5, respectivamente, mientras que para araujiaina aIII el rango de pH óptimo fue más amplio, entre 7 y 9,5 (Fig. 4).

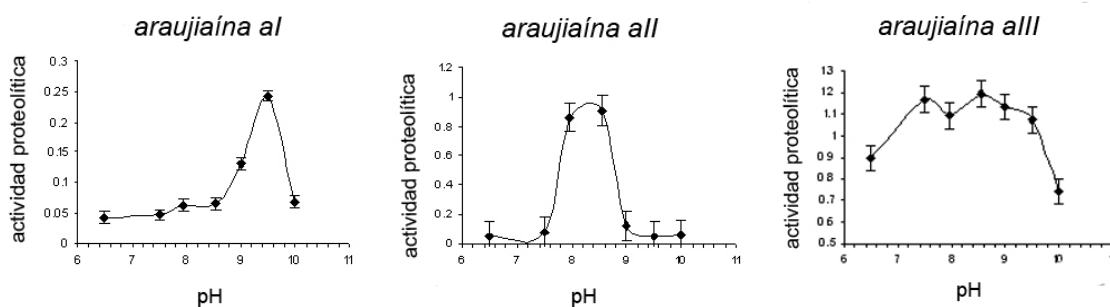


Figura 4. Perfil de pH de araujiaina aI, aII y aIII.

Teniendo en cuenta los resultados observados en el perfil de pH del extracto crudo (pH óptimo 6,7-8,5), puede inferirse que las araujiainas aII y aIII son las enzimas que prevalecen y que más aportan en la actividad proteolítica de la preparación enzimática cruda.

La acción de diversos inhibidores de proteasas cisteínicas (iodoacetato de sodio 50 mM, idoacetamida 50 mM y E64 100 μ M) produjo una inhibición total e irreversible sobre la actividad enzimática en todos los casos.

Determinación de parámetros cinéticos usando PFLNA como sustrato.

Se utilizó una solución 1 mM del sustrato L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) en buffer fosfatos 0,1M de pH 6,5 con KCl 0,3 M, EDTA 10⁻⁴ M y DTT 0,003 M a 37 °C. La actividad enzimática se expresó en unidades PFLNA, definidas como la cantidad en micromoles de enzima que libera un micromol de *p*-nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo. Los parámetros cinéticos para araujaína aII y aIII fueron calculados por un análisis de regresión lineal utilizando las ecuaciones de Hanes y de Hofstee, derivaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis Menten, observándose un comportamiento michaeliano. En las condiciones del ensayo no se detectó actividad sobre PFLNA en el caso de araujaína aI. Como puede observarse en la tabla 2, el valor de Km para araujaína a II (0,18 mM) es más bajo que el que se obtuvo para papaína (0,34 mM), bromelina (0,30 mM) y ficina (0,43 mM) (Filippova *et al.*, 1983). Sin embargo, el Km calculado para araujaína aIII (5,14 mM) es mucho más alto que los ya mencionados, demostrando una afinidad más baja para este sustrato. La relación kcat/Km a su vez fue más alta para araujaína aII (5,99 seg⁻¹ mM⁻¹) que para araujaína aIII (2,38 seg⁻¹ mM⁻¹), dato aún más significativo de la mayor eficiencia de araujaína aII sobre este sustrato.

	Km (mM)	V _{máx} mM/seg)	Kcat seg ⁻¹	V _{máx} /km seg ⁻¹	kcat/km seg ⁻¹ mM ⁻¹
Araujaína aII	0,18	9,3×10 ⁻⁵	1,078	5,188×10 ⁻⁴	5,99
Araujaína aIII	5,14	1,86×10 ⁻³	12,260	3,619 ×10 ⁻⁴	2,38

Tabla 2. Determinación de parámetros cinéticos usando PFLNA

Los resultados de la determinación de actividad esterolítica utilizando sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster para cada una de las enzimas purificadas se muestra en la Fig. 5. Araujaína aI mostró una gran preferencia por el derivado de Ala, seguida por Phe, Gln, Asp, Tyr y Gly, que fueron hidrolizados en mucho menor grado. En el caso de araujaína aII, los derivados

de Gln y Ala fueron los preferidos, seguidos por los de Gly, Tyr, Phe y Asp, con menor velocidad de hidrólisis que los derivados anteriores. En el caso de araujaína aIII, al igual que en araujaína aI, la enzima mostró mayor preferencia por el derivado de Ala, seguido en menor medida por los correspondientes a Gln, Asp, Gly, Asn, Phe y Tyr.

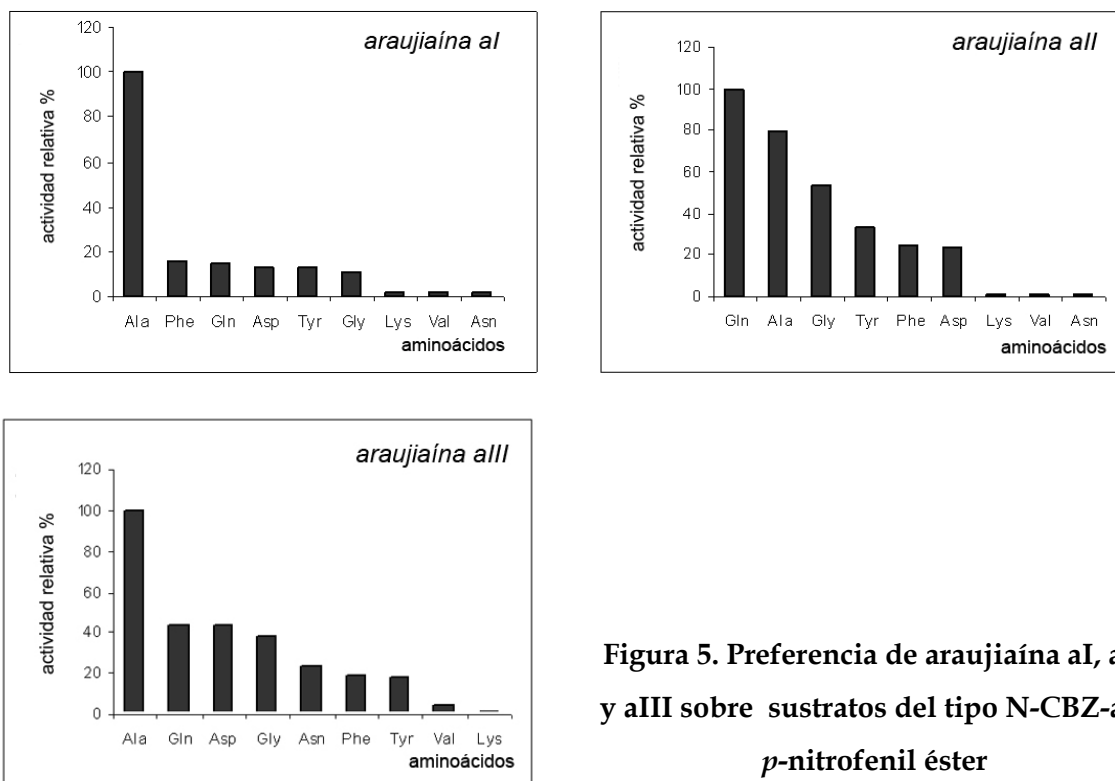


Figura 5. Preferencia de araujaína aI, aII y aIII sobre sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster

Como consecuencia del comportamiento de las tres enzimas frente a sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster pudo apreciarse que araujaína aI y aIII demostraron tener mayor afinidad por el derivado de Ala, comportamiento que también fue observado para otras peptidasas cisteínicas purificadas a partir de látex de especies que pertenecen a la familia de *Asclepiadaceae*. La actividad demostrada por araujaína aII fue significativamente diferente, ya que hidroliza al derivado de Gln con mayor preferencia que el de Ala, hecho que podría explicar la mayor afinidad del EC sobre este sustrato, sobre el que la actividad de araujaína aII es sensiblemente mayor. Finalmente, la notoria preferencia de araujaína aI por el derivado de Ala en relación al resto

de los derivados de aminoácidos ensayados justificaría la baja actividad caseinolítica de esta enzima, hecho reafirmado por su casi nula actividad sobre PFLNA. El alto grado de especificidad demostrado por araujaína aI podría constituir una ventaja para procesos biotecnológicos que requieran alta especificidad de clivaje.

Los derivados de mayor afinidad fueron elegidos para calcular las constantes cinéticas (Ala para araujaína aI y aIII y Gln para araujaína aII), pero a diferencia de lo que sucede con PFLNA, no mostraron un comportamiento michaeliano, sino que las curvas fueron sigmoideas, pareciendo comportarse de manera alostérica frente a estos sustratos.

Análisis de la secuencia N-terminal.

La comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con la de otras proteasas se muestra en las tablas 3, 4 y 5, respectivamente. Las tres enzimas muestran alta semejanza con proteasas cisteínicas de plantas en general y especialmente con las que pertenecen a especies del género *Asclepias*. Un importante porcentaje de identidad fue encontrado con las peptidasas cisteínicas de *Caricaceae* (caricaína y cisteínproteínasa CC-III mostraron un 86% y 85% de identidad con araujaína aI y un 73% y 72% con araujaína a II, mientras que caricaína y papaína mostraron un 83% and 79% de identidad con araujaína a III. Cabe destacar que papaína, considerada como la enzima arquetipo de las peptidasas cisteínicas, muestra un alto grado de identidad con araujaína a I, a aII y a aIII : 81%, a 69% y 79% respectivamente (Tabla 7).

Los motivos conservados DWR, QG, K, V, P son claramente distinguibles para los tres proteinasas aisladas del látex de *A. angustifolia*.; estos motivos o dominios se comparten con papaína (como puede verse en las secuencias N terminales, tabla 6), y con muchas otras endopeptidasas del tipo de la papaína.

El aminoácido Pro en la posición 2 del N-terminal (residuo Pro2 en la numeración de papaína) se encuentra frecuentemente conservado en la mayoría de las peptidasas maduras de la familia C1, y se sugiere que éste previene el ataque de otras enzimas, especialmente aminopeptidasas, puesto que el enlace

Xaa - Pro X resulta inaccesible para este tipo de enzimas, formando una unión resistente que previene la hidrólisis o proteólisis del extremo amino. Esto fue observado también en gran cantidad de proteasas de la familia *Bromeliaceae* (Carter *et al.*, 2000).

Proteasa/ Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
Araujiaína aI <i>Araujia angustifolia</i>	1 VPDSIDWREKDAVLPIRNQGQC 22		
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGA VAPVKNQGQC 23 +P+SIDWREK AV P++NQGQC	16/22 (72%)	20/22 (90%)
cisteínproteína GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGA VVPVKNQGGC 24 +PDSIDWREK AV+P++NQG C	16/22 (72%)	20/22 (90%)
cisteínproteína GP-II <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWRENGA VVPVKNQGGC 24 +PDSIDWRE AV+P++NQG C	15/22 (68%)	19/22 (86%)
cisteínproteína CC III <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGS C 22 P+SIDWR+K AV P++NQG C	14/21 (66%)	18/21 (85%)
quimopapaína <i>Carica papaya</i>	2 PQSIDWRAKGA VTPVKNQGC 22 P SIDWR K AV P++NQG C	14/21 (66%)	16/21 (76%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGA VTPVKNQGS C 22 +P+ +DWR+K AV P++NQG C	12/22 (54%)	18/22 (81%)
mexicaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWREKGA VTPVKNQNPC 22 P+SIDWREK AV P++NQ C	14/21 (66%)	17/21 (80%)
ervatamina <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGS C 22 +P+ IDWR+K AV P++NQG C	13/22 (59%)	18/22 (81%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGS C 22 +P+++DWR+K AV P+R+QG C	12/22 (54%)	19/22 (86%)
quimomexicaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWRDKGA VTPVKNQNPC 22 P+SIDWR+K AV P++NQ C	13/21 (61%)	17/21 (80%)
philibertaína gI <i>Philibertia giliesii</i>	1 LPASVDWRKEGA VLPPIRHQGQC 22 +P S+DWR++ AVLPIR+QGQC	15/22 (68%)	20/22 (90%)
cisteínproteína <i>Vanconcellea cundinamarcensis</i>	2 PQRMDWRKKGAVTPVKNQGGC 22 P +DWR+K AV P++NQG C	12/21 (57%)	16/21 (76%)
macrodomaína I <i>Pseudonanas macrodotes</i>	2 VPQSIDWRDYGAVNEVKNQGPC 23 VP SIDWR+ AV ++NQG C	13/22 (59%)	16/22 (72%)

Table 3. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI con la de otras proteasas.

Proteasa/ Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
araujaína aII <i>Araujia angustifolia</i>	1 LPDSVDWRDKGVVFPVRRQKCG 23		
cisteínproteína GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGA VVPVKNQGGCG 25 LPDS+DWR+KG V P + QG CG	15/23 (65%)	18/23 (78%)
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGA VAPVKNQGGCG 24 LP+S+DWR+KG V P + QG+CG	14/23 (60%)	19/23 (82%)
cisteínproteína GP-II <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWRENGA VVPVKNQGGCG 25 LPDS+DWR+ G V P + QG CG	14/23 (60%)	17/23 (73%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCG 23 LP++VDWR KG V P R QG CG	15/23 (65%)	17/23 (73%)
ervatamina-C <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGGSCG 23 LP+ +DWR KG V P + QG CG	13/23 (56%)	16/23 (69%)
cisteínproteína CC-III <i>Vanconcellea cundinamarcensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGGSCG 23 P+S+DWR KG V P + QG CG	13/22 (59%)	16/22 (72%)
quimomexicanaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWRDKGAVTPVKNQNPCG 23 P+S+DWRDKG V P + Q CG	13/22 (59%)	16/22 (72%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGA VTPVKNQGGSCG 23 +P+ VDWR KG V P + QG CG	13/23 (56%)	16/23 (69%)
quimopapaína isoforma V <i>Carica papaya</i>	2 PQSIDWRAKGA VTPVKNQGGACG 23 P S+DWR KG V P + QG CG	13/22 (59%)	15/22 (68%)
mexicanaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWREKGA VTPVKNQNPCG 23 P+S+DWR+KG V P + Q CG	12/22 (54%)	16/22 (72%)
philibertaína gI <i>Philibertia giliesii</i>	1 LPASVDWRKEGAVLPIRHQGGCG 23 LP SVDWR +G V P R QG+CG	15/23 (65%)	17/23 (73%)
cisteínproteína (s/n) <i>Vasconcellea stipulata</i>	4 SIDWRQKGA VTPVRNQGGSCG 23 S+DWR KG V P R QG CG	13/20 (65%)	14/20 (70%)

Table 4. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aII con la de otras proteasas.

El aminoácido N-terminal de araujaína aI es valina, mientras que araujaína aII y aIII tienen como aminoácido N-terminal leucina. La secuencia N-terminal de araujaína aI tiene 69% de identidad con araujaína aII. La identidad entre araujaína aI y aIII es del 79%, mientras que entre aII y aIII la identidad hallada es del orden del 74%. Cuando se comparan las secuencias N-terminales de las tres enzimas en estudio se observa que presentan un 50 % de aminoácidos coincidentes, muchos de ellos están conservados en la mayoría de las proteasas cisteínicas del tipo papaína, y otros conservados en la misma familia o género.

Proteasa / Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
araujaína aIII <i>Araujia angustifolia</i>	1 LPESVDWRKKNLVFPVIRNQGQCGS 24		
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGA VAPVKNQGQCGS 25 LPES+DWR+K V P++NQGQCGS	17/24 (70%)	21/24 (87%)
cisteínproteínasa CC III <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGS 24 PES+DWRKK V P++NQG CGS	16/23 (69%)	19/23 (82%)
ervatamina <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGS CGS 24 LPE +DWRKK V P++NQG CGS	16/24 (66%)	19/24 (79%)
proteasa Omega <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGS CGS 24 LPE+VDWRKK V P+R+QG CGS	17/24 (70%)	20/24 (83%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGS CGS 24 LPE+VDWRKK V P+R+QG CGS	17/24 (70%)	20/24 (83%)
cisteínproteínasa GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGA VVPVKNQGGCGS 26 LP+S+DWR+K V P++NQG CGS	15/24 (62%)	20/24 (83%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGS CGS 24 +PE VDWR+K V P++NQG CGS	15/24 (62%)	19/24 (79%)

Tabla 5. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aIII con la de otras proteasas.

Estos resultados concuerdan y suman a otros parámetros característicos observados para este tipo de proteasas, tales como valores del pI, el pH óptimo, los patrones endoesterolíticos. Estas similitudes están de acuerdo con su función biológica, dado que las tres enzimas están situadas en el mismo compartimiento histológico, entonces debería esperarse las mismas funciones específicas para cada uno de ellas. La función más importante que se le atribuye es la de defensa y las sutiles variaciones que se observan entre ellas serían adecuadas para ejecutar una defensa efectiva contra diferentes organismos.

Las tres secuencias N-terminal fueron analizadas mediante el BLAST. El análisis demostró que las tres proteínas pertenecen al grupo de las peptidasas cisteínicas de la familia C1A, (nomenclatura de la base de datos de MEROPS). Este grupo incluye peptidasas cisteínicas de mamíferos (catepsinas B, C, F, H, L, K, O, S, V, X y W) y es representado por la papaína como la proteínasa arquetipo.

araujaína aI	1	VPDSIDWREKDAVLPIRNQGQCG	22
araujaína aII	1	LPDSVDWRDKGVVFP PRRQGKCG	23
araujaína aIII	1	LPESVDWRKKNLVFP I RNQGQCGS	24
papaína (<i>Carica papaya</i>)	1	IPEYVDWRQKGA VTPVKNQGSCGS	24

Tabla 6. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con papaína.

El análisis del mapa peptídico (peptide mass fingerprint) de araujaína aI, aII y aIII (Fig. 6) mostró que poseen algunos picos equivalentes (Tabla 7) lo cual demuestra que son diferentes pero que comparten un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugieren con mayor certeza que se trataría de isoenzimas.

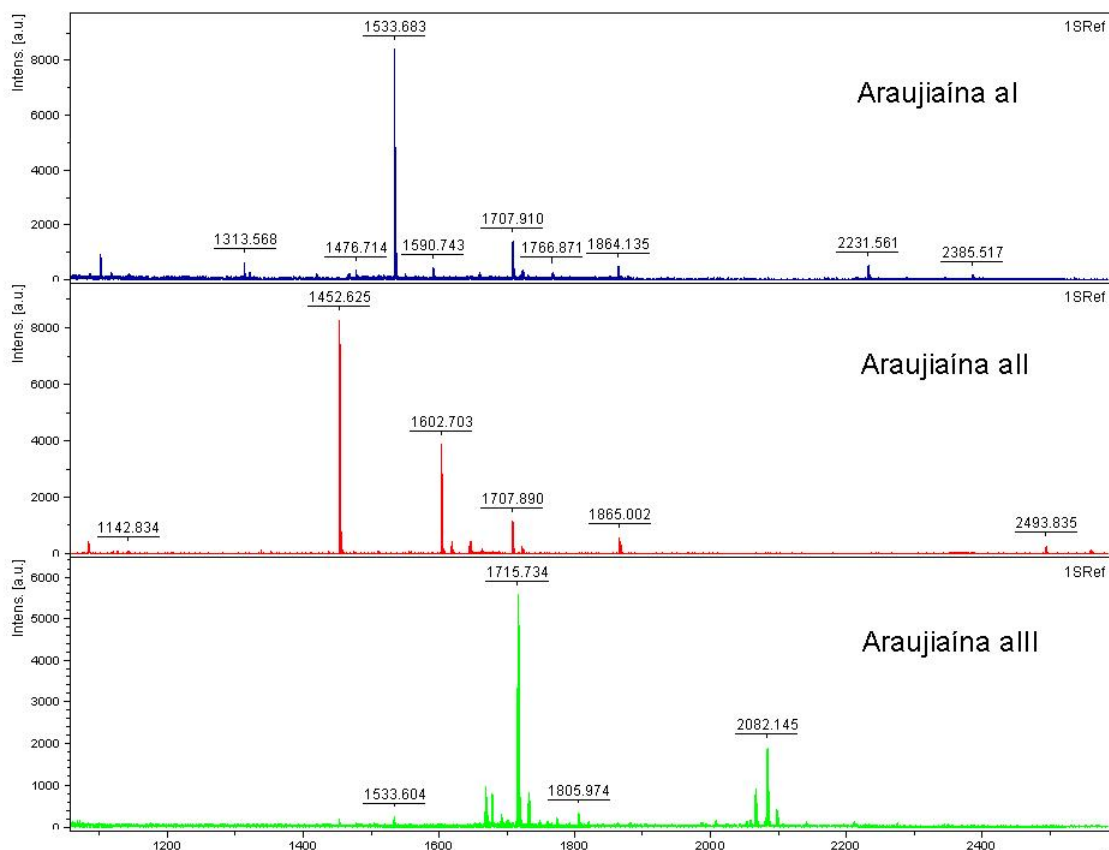


Figura 8. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF provenientes de la digestión trípica de araujaína aI, aII y aIII con papaína.

m/z(CE)	Intens.	m/z(aI)	Intens.	m/z(aII)	Intens.	m/z(aIII)	Intens.
1.083.488	1828.04	1.101.136	758.45	1.083.799	307.35	1.533.604	232.81
1.101.188	434.78	1.313.568	832.99	1.142.834	110.43	1.888.896	858.37
1.125.872	495.24	1.418.814	221.00	1.452.625	8278.00	1.677.808	798.00
1.142.726	1735.05	1.488.828	258.00	1.802.703	4180.01	1.715.734	5012.98
1.313.567	420.84	1.478.714	328.88	1.818.712	420.88	1.885.874	282.38
1.452.643	8787.81	1.533.863	8428.00	1.843.787	498.48	2.083.110	788.23
1.533.887	6638.00	1.590.743	407.41	1.707.890	1180.34	2.082.145	1818.88
1.664.888	006.24	1.658.855	238.00	1.721.811	276.21	2.086.184	330.88
1.580.746	1143.12	1.874.888	116.00	1.740.887	78.00		
1.602.723	2100.49	1.707.910	1488.17	1.865.002	488.79		
1.846.782	878.41	1.723.846	211.87	2.188.836	182.81		
1.658.894	483.20	1.788.871	215.00	2.588.844	81.52		
1.882.810	372.38	1.884.126	418.88				
1.667.800	731.88	1.878.125	128.00				
1.677.915	883.20	2.214.660	100.00				
1.707.828	1700.81	2.231.561	408.06				
1.715.851	1388.48	2.344.680	88.00				
1.751.822	388.88	2.385.517	181.00				
1.007.807	284.71	2.707.131	87.00				
1.885.860	931.85	2.718.048	88.00				
2.271.577	333.48						
2.493.935	132.37						

Tabla 7. Datos numéricos correspondientes a los mapas peptídicos (peptide mass fingerprint, PMF) de araujaína aI, aII y aIII.

La presencia de picos coincidentes entre las enzimas estudiadas refleja la presencia de dominios conservados, algunos propios de la especie y quizás muchos otros propios de la mayoría de las proteasas cisteínicas de la familia *Asclepiadaceae*, *Caricaceae* y *Bromeliaceae*. Por otra parte, la existencia de picos no coincidentes demostraría que constituyen diferentes enzimas, con la misma función biológica, pero con distinta actividad enzimática.

Utilizando los mapas trípticos realizados y empleando la herramienta MASCOT se realizaron búsquedas a fin de identificar las proteínas originales. Mediante este software no se encontraron proteínas que permitieran establecer la identidad de estas enzimas con valores aceptables, en razón de no haberse ingresado aún información sobre proteasas vegetales provenientes de especies pertenecientes a las familias *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae*. Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron confirmar que se trata de tres enzimas diferentes. Por otra parte, este tipo de estudios podría permitir el empleo a futuro de esta herramienta fundamental de la proteómica con el objeto de detectar proteasas en extractos vegetales.