



**“Proteasas del látex
de *Asclepias curassavica* L.**

**Caracterización y potencial aplicación
en la síntesis de péptidos”**

Constanza S. Liggieri

LIPROVE. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas.

Año 2005

Directora de Tesis. Dra. Nora S. Priolo

Capítulo 1: Proteasas del látex de *Asclepias curassavica* L.

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Características generales de las Proteasas	3
1.2. Catálisis Enzimática: interacción enzima-sustrato	7
1.3. Clasificación y Nomenclatura de las enzimas proteolíticas	8
1.3.1. El sistema EC de clasificación de las peptidasas	9
1.3.2. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas	12
1.4. Mecanismos de acción catalítica de las endopeptidasas	13
1.4.1. Peptidasas serínicas y treonínicas	13
1.4.2. Peptidasas cisteínicas	16
1.4.3. Peptidasas aspárticas	19
1.4.4. Metalopeptidasas	22
1.4.5. Peptidasas de mecanismo catalítico no conocido	25
1.5. ¿Cómo pueden inhibirse las peptidasas? Importancia de los inhibidores	25
1.5.1. Inhibición de peptidasas serínicas	26
1.5.2. Inhibición de peptidasas cisteínicas	26
1.5.3. Inhibición de peptidasas aspárticas	28
1.5.4. Inhibición de metalopeptidasas	28
1.6. Importancia de la proteólisis en las plantas	29
1.6.1. Ejemplos de proteólisis " <i>in vivo</i> "	31
1.7. Características del látex: propiedades y funciones	32
1.8. Ejemplos en la naturaleza de la presencia de proteasas en látex	35
1.9. Proteasas pertenecientes al Género <i>Asclepias</i>	37
1.10. Actividad enzimática: detección y localización " <i>in situ</i> "	39
1.10.1. Detección y localización " <i>in situ</i> " de enzimas proteolíticas	40
1.11. Descripción botánica de la familia <i>Asclepiadaceae</i> R. Br.	40
2. OBJETIVOS	42
<u>SECCIÓN A</u>	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	44
A.3.1. Características del material vegetal	44
A.3.2. Método de la película-sustrato de Denker	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
<u>SECCIÓN B</u>	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
B.3.1. Obtención del extracto crudo enzimático	53
B.3.2. Determinación de la actividad proteolítica	53
B.3.2.1. Actividad caseinolítica	53
B.3.2.2. Actividad azocaseinolítica	54

B.3.3. Determinación del contenido de proteínas	54
B.3.4. pH óptimo	55
B.3.5. Estabilidad al pH	56
B.3.6. Estabilidad a la temperatura	56
B.3.7. Estabilidad a la fuerza iónica	56
B.3.8. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica	57
B.3.9. Efecto de cisteína como activador sobre la actividad proteolítica	57
B.3.10. Determinación de los pI mediante Isoelectroenfoque (IEF)	57
B.3.11. Detección de las proteasas mediante la técnica de Zimograma	60
B.3.12. Determinación de la actividad endoesterolítica	61
B.3.13. Actividad carboxipeptidasa	62
B.3.14. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA)	63
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
B.4.1. Determinación de la actividad proteolítica	64
B.4.2. pH óptimo	64
B.4.3. Estabilidad al pH	65
B.4.4. Estabilidad a la temperatura	65
B.4.5. Estabilidad a la fuerza iónica	66
B.4.6. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica	67
B.4.7. Efecto activador de la cisteína sobre la actividad proteolítica	68
B.4.8. Isoelectroenfoque (IEF) y Zimograma	69
B.4.9. Determinación de la actividad endoesterolítica	70
B.4.10. Actividad carboxipeptidasa del E.C.	71
B.4.11. Detección de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) en el E.C.	72
<u>SECCIÓN C</u>	
3. MATERIALES Y MÉTODOS	74
C.3.1. Purificación cromatográfica. Cromatografía de intercambio iónico	74
C.3.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	74
C.3.2.1. Preparación de las muestras	75
C.3.2.2. Preparación de los geles	75
C.3.2.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida	76
C.3.2.4. Fijación y coloración con Coomassie Blue	77
C.3.2.5. Estimación de las masas moleculares	78
C.3.3. Isoelectroenfoque y Zimograma	78
C.3.4. Tinción con plata	78
C.3.5. pH óptimo	81
C.3.6. Estabilidad al pH	81
C.3.7. Estabilidad a la temperatura	81
C.3.8. Medida de la actividad esterolítica utilizando los sustratos sintéticos <i>N</i> - α -carbобензохи- <i>p</i> -nitrofenil ésteres de aminoácidos	81
C.3.9. Medida de la actividad amidolítica utilizando pFLNA	82
C.3.10. Estudios cinéticos	82
C.3.10.1. Determinación de los parámetros <i>K_m</i> , <i>V_m</i> , <i>k_{cat}</i> y <i>K_{cat}/K_m</i>	82
C.3.10.1.1. Obtención de los parámetros cinéticos empleando <i>N</i> - α -Cbz-L-Gln <i>p</i> -nitrofeniléster como sustrato	82
C.3.10.1.2. Obtención de los parámetros cinéticos empleando <i>p</i> FLNA como sustrato	83

C.3.11. Titulación del sitio activo	83
C.3.12. Espectrometría de masas	83
C.3.13. Secuenciamiento de los aminoácidos de la porción N-terminal de las fracciones purificadas	84
C.3.14. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) de la fracción no retenida (Nr) del E.C.	85
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
C.4.1. Purificación cromatográfica. Cromatografía de intercambio iónico	86
C.4.2. Esquema de purificación	87
C.4.3. Determinación de la homogeneidad de asclepaína c I y asclepaína c II: electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	87
C.4.4. Estimación de las masas moleculares	89
C.4.5. Isoelectroenfoque y Zimograma	90
C.4.6. pH óptimo de asclepaína c I y asclepaína c II	90
C.4.7. Estabilidad al pH	92
C.4.8. Estabilidad a la temperatura de asclepaína c I y asclepaína c II	93
C.4.9. Medida de la actividad endoesterolítica	94
C.4.10. Medida de la actividad amidolítica	97
C.4.11. Estudios Cinéticos	97
C.4.11.1. Parámetros cinéticos empleando <i>N</i> - α -Cbz-L-Gln <i>p</i> -nitrofeniléster como sustrato	97
C.4.11.2. Parámetros cinéticos empleando pFLNA como sustrato	98
C.4.12. Titulación del sitio activo de las asclepaínas purificadas	98
C.4.13. Espectrometría de Masas de las asclepaínas purificadas	99
C.4.14. Análisis de las secuencias aminoacídicas N-terminales	101
C.4.15. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) de la fracción no retenida (Nr) del EC	105
5. CONCLUSIONES	106
6. BIBLIOGRAFÍA	110

Capítulo 2. Aplicación de las proteasas de *Asclepias curassavica* L. en la síntesis de péptidos

1. INTRODUCCIÓN	119
1.1. Importancia de los péptidos biológicamente activos	119
1.2. Mecanismos utilizados para la síntesis peptídica	120
1.2.1. Síntesis química	120
1.2.2. Síntesis enzimática	122
1.3. Especificidad de las proteasas	123
1.4. Estrategias utilizadas en la síntesis peptídica	125
1.5. Papel de las proteasas en la síntesis enzimática en medios orgánicos	129
1.6. Estrategias empleadas en la síntesis enzimática de péptidos	131
1.6.1. Ingeniería de medios	131
1.6.1.1. Síntesis en mezclas de solventes acuoso-orgánicos	131
1.6.1.2. Síntesis en solventes orgánicos puros	133
1.6.1.3. Síntesis en sistemas heterogéneos sólido-líquido	135

1.6.2. Ingeniería de sustratos	138
1.6.3. Ingeniería de enzimas	139
2. OBJETIVOS	141
3. MATERIALES Y METODOS	142
3.1. Elección de los solventes a ensayar: sistemas monofásicos y sistemas bifásicos	142
3.2. Ensayos de estabilidad en los distintos sistemas	144
3.3. Selección del pH y la temperatura para los ensayos de síntesis de péptidos	145
3.4. Inmovilización de las enzimas para los ensayos de síntesis	145
3.5. Selección de los sustratos (donor de acilo y nucleófilo) a emplear en los ensayos de síntesis de péptidos	146
3.6. Síntesis en sistemas bifásicos con enzima liofilizada sin inmovilizar	146
3.7. Ensayos de síntesis de péptidos por control cinético	147
3.8. Seguimiento de las reacciones	149
3.8.1. Por cromatografía en capa fina (TLC)	149
3.8.2. Por Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	149
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
4.1. Ensayos de Estabilidad	151
4.1.1. Ensayos de Estabilidad en los sistemas monofásicos	151
4.1.2. Ensayos de Estabilidad en los sistemas bifásicos	153
4.2. Seguimiento de las reacciones	157
4.2.1. Por cromatografía en capa fina (TLC)	157
4.2.1.1. Sistemas monofásicos	157
4.2.1.2. Sistemas bifásicos utilizando peptidasas inmovilizadas	159
4.2.1.3. Sistemas bifásicos utilizando extracto crudo liofilizado	161
4.2.2. Por Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	162
4.2.2.1. Sistemas monofásicos	163
4.2.2.2. Sistemas bifásicos	164
5. CONCLUSIONES	166
6. BIBLIOGRAFÍA	167

Capítulo 3. Análisis comparativo de las relaciones fenéticas de proteasas provenientes de látex

1. INTRODUCCIÓN	174
1.1. Conceptos de Clasificación y Sistemática	174
1.2. Definición de algunos términos importantes	176
1.3. Doctrinas de la Clasificación Biológica	178
1.3.1. Esencialismo	178
1.3.2. Evolucionismo	179
1.3.3. Feneticismo	179

1.3.4. Cladismo	181
1.4. ¿Qué es la Taxonomía?	183
1.5. Posición Taxonómica de la Familia <i>Asclepiadaceae</i>	186
2. OBJETIVOS	194
3. MATERIALES Y MÉTODOS	195
3.1. Presentación de las Técnicas Numéricas empleadas	195
3.2. Pasos elementales de las Técnicas Numéricas	196
3.2.1. Elección de las OTU	196
3.2.2. Elección de los Caracteres	197
3.2.3. Construcción de la <i>Matriz Básica de Datos (MBD)</i>	198
3.2.4. Obtención de un <i>Coficiente de Similitud</i>	198
3.2.5. Construcción de una <i>Matriz de Similitud</i>	199
3.2.6. Conformación de Grupos Taxonómicos: “fenogramas”	200
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	203
4.1. Construcción de la <i>Matriz Básica de Datos (MBD)</i>	203
4.2. Conformación de Grupos Taxonómicos: “fenogramas”	204
4.2.1. Fenograma 1	204
4.2.2. Fenograma 2	206
4.2.3. Fenograma 3	208
4.2.4. Fenograma 4	210
4.2.5. Fenograma 5	212
4.2.6. Fenograma 6	214
5. CONCLUSIONES	220
6. BIBLIOGRAFÍA	221
ABREVIATURAS	224
<hr/>	
TRABAJO FUTURO	225
<hr/>	

1. Introducción

1.1. Características generales de las proteasas

Las proteasas son enzimas que participan activamente en la degradación de péptidos y proteínas. También se las conoce con el nombre de enzimas proteolíticas o péptido-hidrolasas. Ocupan un lugar significativo por su participación en numerosos procesos fisiológicos en los seres vivos, como así también, por sus aplicaciones en diferentes procesos industriales.

Se ha comprobado por diversas técnicas analíticas que las proteasas dirigen modificaciones altamente específicas y selectivas de proteínas, tales como la activación de zimógenos, coagulación sanguínea, ruptura de los coágulos de fibrina y procesamiento y transporte de proteínas secretoras a través de las membranas (Rao *et al.*, 1998).

Se estima que en el mundo las industrias que aplican enzimas para sus productos, invierten anualmente cerca de un billón de dólares en su comercialización.

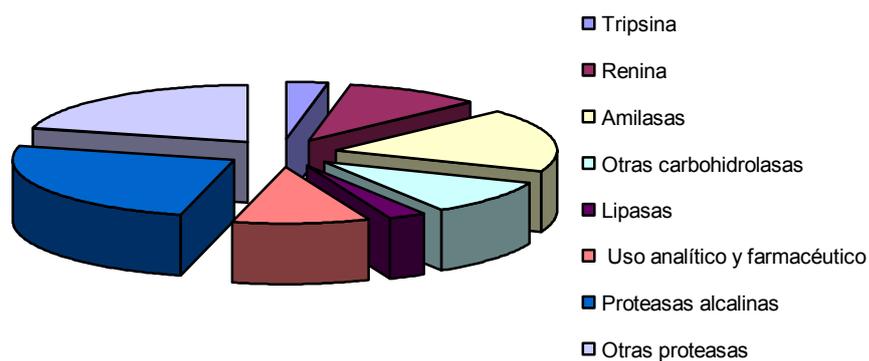


Fig. 1. Distribución de la venta mundial de enzimas comerciales.

De ellas, el 75% pertenecen a las enzimas hidrolíticas y de este porcentaje, las proteasas representan el 60% de total de las ventas mundiales (Rao *et al.*, 1998), Figura 1.

La vasta diversidad de proteasas, con su acción específica, ha atraído la atención de los científicos de todo el mundo que los ha llevado a explorar sus múltiples aplicaciones fisiológicas e industriales. Con relación a este último aspecto, las proteasas desarrollan un papel protagónico en los procesos biotecnológicos debido a que mantienen su actividad enzimática dentro de un amplio rango de pH y temperatura (Dubey & Jannadham, 2003).

La *Biología* es la ciencia que utiliza los procesos biológicos para producir bienes y servicios. Estos bienes incluyen productos químicos, alimentos, combustibles y medicamentos. Los servicios que puede ofrecer incluyen el tratamiento de residuos o el control de la contaminación. Esta disciplina utiliza células vivas o productos sintetizados por éstas, como *las enzimas*. Las células pueden proceder de plantas o animales conocidos, o pueden ser microorganismos como las levaduras o las bacterias.

Haciendo un poco de historia, la biotecnología tradicional comenzó antes del año 6.000 a.C. cuando los babilonios consiguieron fabricar cerveza por primera vez utilizando células de levadura que transforman el azúcar en alcohol.

Hacia el año 4.000 a.C. los egipcios aprendieron a utilizar la levadura para fabricar pan y el vino que se obtiene por fermentación de la uva ya se menciona en el Antiguo Testamento de la Biblia.

Toda esta biotecnología tradicional era un arte, más que una ciencia. La gente no comprendía qué sucedía cuando se producía el pan, la cerveza o el queso. Antes que la biotecnología pudiera desarrollarse, los científicos tuvieron que investigar mucho y conocer más acerca de estos procesos. Así, los microorganismos se han utilizado (aún sin conocer su existencia) durante miles de años para fabricar alimentos y bebidas. Hubo que esperar hasta el siglo XVII para que Anton van Leeuwenhoek viera a estos organismo por primera vez con uno de los microscopios primitivos.

Por entonces se creía que los organismos vivos podían surgir espontáneamente a partir de materia inerte. En el siglo XIX Louis Pasteur refutó esa idea, con su teoría sobre "la generación espontánea". Demostró que los microorganismos sólo podían provenir de otros microorganismos. Más tarde, Pasteur utilizó estas ideas para evitar que el vino se 'picase' (se transformara en vinagre) o que la leche se agriara. Su método se utiliza todavía hoy y es conocido como "pasteurización".

En 1897 Edward Buchner demostró que no se necesitan las células de levadura completas para fabricar alcohol, sino que algunas partes de la célula realizan este proceso. Ahora sabemos que "esas partes de la célula" son las que contienen las *enzimas* (Buchner, 1897).

Desde 1897 se han ido obteniendo muchas enzimas a partir de células de microorganismos, plantas y animales.

Actualmente pueden mencionarse varios ejemplos de la utilización de enzimas y específicamente de proteasas en distintas áreas de la industria (Caffini *et al.*, 1988; Raffo, 2000; Uligh, 1998; Walsh, 2004).

- ✓ *Proteínas modificadas para la industria alimentaria:* Las proteasas se adicionan a distintos tipos de alimentos como bebidas, sopas y salsas para incrementar la solubilidad. También se las puede agregar a mayonesas, salsas y aderezos para mejorar la capacidad emulgente. Por su poder espumígeno se incorporan a "souffles", "mousses", merengues, helados y cremas. Por último para personas con dificultades alimentarias se utilizan los "hidrolizados proteicos".

- ✓ *Panificación:* se agregan proteasas fúngicas (*Aspergillus oryzae*), o bien de origen vegetal como papaína o bromelaína para mejorar la manipulación de la masa, así como su elasticidad y la textura del gluten.

- ✓ *Elaboración de cerveza:* se utilizan las proteasas papaína ficina, bromelaína y pepsina para otorgarle a la cerveza buena estabilidad coloidal a bajas temperaturas y así, producir espuma abundante y duradera.
- ✓ *Elaboración de quesos:* para coagular las proteínas de la leche y la maduración de los quesos se utiliza la quimosina debido a que produce la hidrólisis específica de la *kappa*-caseína, que en presencia de calcio y calor engloba lípidos y proteínas.
- ✓ *Preparación de polvos detergentes:* se adicionan a estas preparaciones proteasas, lipasas y amilasas de origen generalmente microbiano.
- ✓ *Tratamiento de efluentes industriales:* los efluentes con alto contenido proteico son generalmente viscosos y para disminuir dicha viscosidad se les adicionan proteasas. Esta metodología tiene dos fines: por un lado, facilitar el transporte de los efluentes a través de las cañerías, y por otro, contribuir a la biodegradación de los mismos.
- ✓ *Industria textil:* en una de las etapas de la industrialización de las fibras artificiales se las impregna con gelatina la que luego es eliminada por proteasas generalmente de origen bacteriano.
- ✓ *Manufactura del cuero:* para la depilación de la piel y la remoción de restos de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales no separados por los tratamientos previos se utiliza principalmente pancreatina, aunque también se han ensayado con buenos resultados papaína, bromelaína y proteasas bacterianas y fúngicas de variado origen.

- ✓ *Industria farmacéutica:* Para la formulación de una gran variedad de preparaciones farmacéuticas se utilizan principalmente las proteasas papaína, bromelaína y ficina (antiinflamatorios de vía oral y de aplicación local, coadyuvantes en trastornos digestivos, etc) .

- ✓ *Limpieza de material quirúrgico y biomédico:* Actualmente se utilizan proteasas principalmente de origen microbiano para disminuir en forma significativa la biocarga inicial de los elementos que luego se esterilizarán por la metodología tradicional.

En la década de 1950, algunas enzimas se producían a escala comercial como las amilasas y las proteasas microbianas. Otras se producían en pequeñas cantidades como las pectinasas, lactasas, invertasas, lipasas y celulasas.

En la actualidad, las aplicaciones de la tecnología de enzimas incluyen su incorporación en nuevos materiales crudos para la alimentación de animales y humanos, la fabricación de comidas dietéticas y la eliminación de sustancias antinutritivas de ciertos materiales crudos nutricionales.

Una de las líneas de investigación de la biotecnología moderna está liderada por la utilización de enzimas inmovilizadas y microorganismos inmovilizados en diferentes métodos enzimáticos. Estos procedimientos enzimáticos se aplican por ejemplo para la síntesis de péptidos bioactivos y antibióticos, reciclado de desechos de la industria alimentaria y en el tratamiento de las aguas residuales, la producción de edulcorantes (ejemplo: el aspartamo) usando métodos microbiológicos y enzimáticos combinados, entre otros.

1.2. Catálisis Enzimática: interacción enzima-sustrato

En general, las proteasas se unen al sustrato apropiado a través de los denominados sitios activos que permiten luego catalizar la hidrólisis de la unión peptídica específica (Mc Donald, 1985). Según la nomenclatura

introducida por Schechter & Berger (1967) y hoy utilizada ampliamente, la zona de unión del sitio activo puede subdividirse en subsitios o sitios específicos (S), cada uno de los cuales permite la ubicación de un residuo aminoacídico del sustrato o péptido (P). Los subsitios se ubican a ambos lados del sitio activo y a partir del mismo se numeran en forma correlativa, bien respecto en dirección al N-terminal (S_1, S_2, S_3 , etc) o bien hacia el C-terminal (S'_1, S'_2, S'_3 , etc.). En cuanto al sustrato, los aminoácidos que interactúan con la proteasa son numerados (P_1, P_2, P_3 , etc.) en relación a los subsitios en los cuales se ubican respecto del N-terminal o (P'_1, P'_2, P'_3 , etc.) hacia el C-terminal.

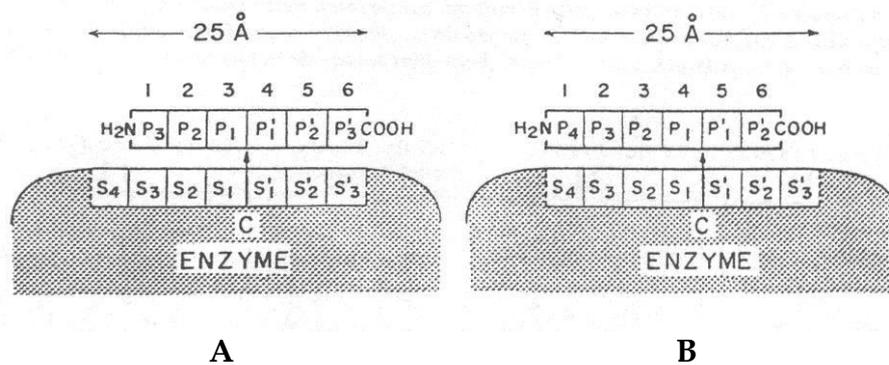


Fig. 2. Interacción enzima-sustrato. **A.** El complejo enzima-sustrato liberará como producto dos tripéptidos. **B.** Este complejo liberará un tetrapéptido y un dipéptido. (Schechter & Berger, 1967).

1.3. Clasificación y Nomenclatura de las enzimas proteolíticas

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue el de *proteasas* y surgió a finales del siglo diecinueve como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemán sugirió el término *proteinasas* para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas y *peptidasas* a aquellas enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también fue utilizado el término *peptidasa* en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas

del enlace peptídico (Barrett, 2004 a). Dado que el uso del término *peptidasa* en un sentido amplio y otro estrecho ha generado confusión, el Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha recomendado el uso de este término en un sentido general para todas las hidrolasas del enlace peptídico.

La aceleración de las investigaciones en el campo de las peptidasas y la consiguiente velocidad de expansión del conocimiento en dicho campo no era imaginable años atrás. Ya en 1999 Barrett menciona que al momento pueden reconocerse unas 600 peptidasas diferentes y que nuevas peptidasas se descubren día a día. Actualmente en MEROPS 6.90 (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) encontramos más de dos mil peptidasas con número de identificación y cerca de 25000 secuencias.

A medida que un área de investigación crece se hace necesario un sistema de nomenclatura y clasificación para facilitar el manejo de toda la información y que además permita la comunicación entre las personas y el almacenamiento y búsqueda de dicha información sin ambigüedades. En este sentido los sistemas EC y MEROPS, con diferentes criterios, ordenan, clasifican y reúnen la información acerca de las peptidasas.

1.3.1. El sistema EC de clasificación de las peptidasas

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha indexado las enzimas con números en un sistema que se conoce como EC (del inglés: Enzyme Commission) agrupándolas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6).

Dentro de este sistema a las peptidasas le corresponde el número 3.4 dentro de la clase 3 de las enzimas hidrolíticas o hidrolasas. Las peptidasas en la lista EC se dividen en 13 subclases (Tabla 1).

<i>Subclase</i>	<i>Tipo de peptidasa</i>
3.4.11	Aminopeptidasas
3.4.13	Dipeptidasas
3.4.14	Dipeptidil-peptidasas y Tripeptidil-peptidasas
3.4.15	Peptidil-Dipeptidasas
3.4.16	Carboxipeptidasas tipo serínico
3.4.17	Metalocarboxipeptidasas
3.4.18	Carboxipeptidasas tipo cisteínico
3.4.19	Omega peptidasas
3.4.21	Endopeptidasas serínicas
3.4.22	Endopeptidasas cisteínicas
3.4.23	Endopeptidasas aspárticas
3.4.24	Endopeptidasas metálicas
3.4.99	Endopeptidasas de tipo no conocido

Tabla 1. Sistema E.C. de clasificación de peptidasas.

A su vez se reconocen dos grupos principales, las *exopeptidasas* (3.4.11-19) que son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y que actúan preferentemente o sólo si existe un grupo terminal libre y las *endopeptidasas* (3.4.21-25 y 3.4.99) que actúan sólo lejos del final de las cadenas polipeptídicas (URL: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34>). Dentro de las exopeptidasas las *oligopeptidasas* (3.4.19) son un grupo de enzimas cuya especificidad es dependiente del tamaño del sustrato (Tabla 2, Rao *et al.*, 1998).

<i>Proteasa</i>	<i>Modo de acción</i>	<i>EC Nro.</i>
<i>Exopeptidasas</i>		
Aminopeptidasas	↓ ●-○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidil peptidasa	↓ ●-●-○-○-○---	3.4.14
Triipeptidil peptidasa	↓ ●-●-●-○-○---	3.4.14
Carboxipeptidasa	↓ ---○-○-○-○-●	3.4.16-3.4.18
Proteasas tipo serínicas		3.4.16
Metaloproteasas		3.4.17
Proteasas tipo cisteínicas		3.4.18
Peptidil Dipeptidasa	↓ ---○-○-○-○-○-●-●	3.4.15
Dipeptidasas	↓ ●-●	3.4.13
Omegapeptidasas	↓ *-●-○-○---	3.4.19
	↓ ---○-○-○-○-○-●-*	3.4.19
<i>Endopeptidasas</i>		
	↓ ---○-○-○-○-○-○-○---	3.4.21-3.4.34
Proteasas serínicas		3.4.21
Proteasas cisteínicas		3.4.22
Proteasas aspárticas		3.4.23
Metaloproteasas		3.4.24
Endopeptidasas de mec.		3.4.99
Catalítico desconocido		

Tabla 2. Clasificación de las proteasas. Los círculos vacíos representan los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Los círculos llenos indican el aminoácido terminal y el asterisco significa la terminación bloqueada. Las flechas muestran los sitios activos de las enzimas.

1.3.2. El sistema MEROPS de clasificación de peptidasas

El sistema EC tiene la desventaja de no tener en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejen las relaciones evolutivas de las peptidasas miembro de cada clase; por esta causa en 1992 Rawlings & Barrett comenzaron el diseño de un sistema de clasificación de peptidasas que salva esa deficiencia y agrupa las peptidasas teniendo en cuenta esta fundamental característica. El sistema se va perfeccionando durante algunos años (Rawlings & Barrett, 2004 a,b y 1995) hasta que en 1996 fue publicado en la *www* (URL: <http://www.merops.co.uk>) como la base de datos de proteasas MEROPS. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los conceptos de *tipo catalítico*, *clan*, *familia* y *peptidasa* (Tabla 3).

<i>Nivel</i>	<i>Descripción</i>
<i>Clan</i>	Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares
<i>Familia</i>	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en la secuencia aminoacídica de la región encargada de la actividad enzimática
<i>Peptidasa</i>	Una peptidasa es un grupo de proteínas que muestran una actividad proteolítica particular y que están muy estrechamente relacionadas en secuencia

Tabla 3. Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.

El concepto de tipo catalítico de una peptidasa depende de la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis (Barrett *et al.*, 2004a).

En los clanes y familias se agrupan peptidasas homólogas. Un clan contiene una o más familias de peptidasas que muestran tener un origen común, es decir que están relacionadas evolutivamente. La evidencia más clara de homología en el nivel de clan está dada por la similitud en la estructura terciaria. En las familias, las peptidasas están agrupadas en base a la homología de su secuencia aminoacídica, particularmente en la zona de la molécula responsable de la actividad enzimática (Barrett *et al.*, 2004a) .

La mayoría de los clanes están formados por peptidasas de un solo tipo catalítico, por ejemplo el clan CA está formado por varias familias de peptidasas cisteínicas. La primer peptidasa reconocida como de tipo cisteínico fue papaína, prototipo de la familia C1 y del clan CA. Casi todas las peptidasas cisteínicas de origen vegetal pertenecen a la familia C1.

1.4. Mecanismos de acción catalítica de las endopeptidasas

1.4.1. Peptidasas serínicas y treonínicas

Esta clase de peptidasas comprende dos familias distintas: la familia de la quimotripsina que incluye enzimas de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastasa), plantas y microorganismos y la familia de la subtilisina que si bien en un principio se creyó constituida solamente por enzimas bacterianas (ejemplo: subtilisina), actualmente se han encontrado representantes en otros microorganismos, en plantas y en animales superiores. Si bien la estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, ambas tienen la misma geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con el mismo mecanismo. Las proteinasas serínicas exhiben diferentes especificidades de sustrato las cuales están relacionadas con las sustituciones de aminoácidos en varios subsitios enzimáticos interactuando con los residuos de los sustratos. Algunas enzimas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato mientras que otras tienen una especificidad restringida al residuo P₁ del sustrato.

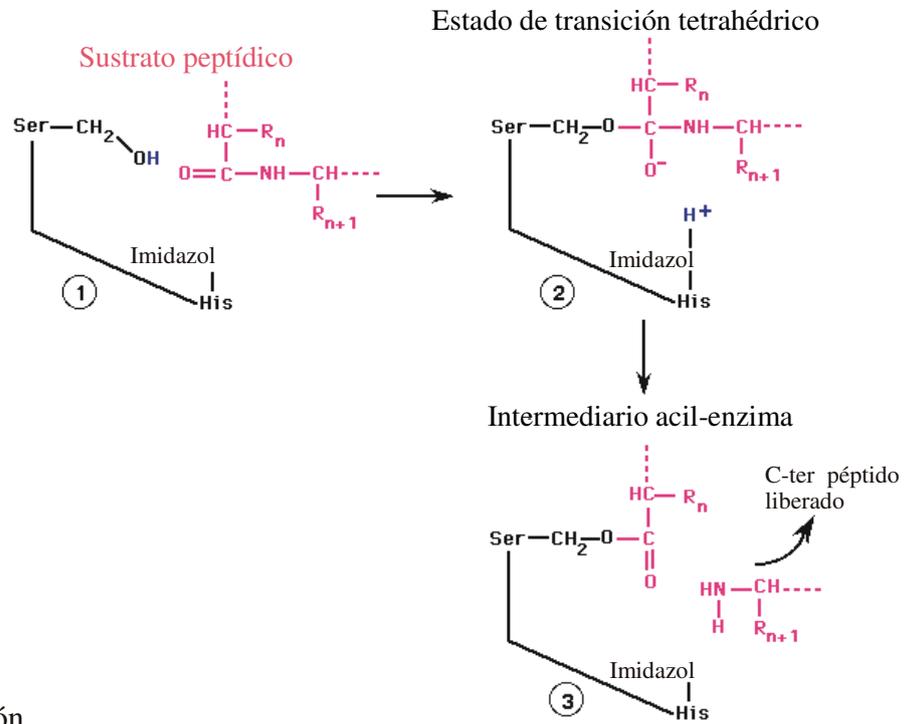
En el proceso catalítico son esenciales tres residuos aminoacídicos que forman la tríada catalítica, Histidina 57, Aspártico 102 y Serina 195 (la numeración dada a cada aminoácido corresponde al sistema de numeración del

quimotripsinógeno). La primera etapa en la catálisis es la formación de un intermedio acil-enzima entre el sustrato y el aminoácido serina. La formación de este intermedio covalente procede a través de un estado intermedio de transición tetraédrico cargado negativamente y luego el enlace peptídico es cortado. Durante la segunda etapa o deacilación, el intermedio acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua para liberar el péptido y para restaurar el hidroxilo serínico de la enzima. La deacilación involucra también la formación de un estado de transición tetraédrico intermedio, que se produce a través de la reacción inversa a la vía de acilación. Una molécula de agua es el nucleófilo atacante en lugar del residuo Serina. La Histidina provee una base general y acepta el grupo OH de la Serina reactiva (Moreau & Choplin, 2005 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>) (Figura 3).

La actividad de las mismas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores, aunque los iones calcio intervienen en la activación de algunas proenzimas y estabilizarían a algunas enzimas.

Si bien estas enzimas son las más estudiadas en el campo de las proteasas, son relativamente pocas las que se conocen dentro de los vegetales. Entre ellas pueden citarse cucumisina, aislada de *Cucumis melo* L. var. Prince (Kaneda & Tominaga, 1975; Kaneda *et al.*, 1995; Uchikoba *et al.*, 1995); macluralisina obtenida de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Rudenskaya *et al.*, 1995) y taraxalisina extraída de *Taraxacum officinale* Webb s.l. (Rudenskaya *et al.*, 1998). También fueron estudiadas las enzimas obtenidas a partir de *Benincasa cerifera* (Kaneda & Tominaga, 1977), de *Trichosantes cucumeroides* Maxim. (Kaneda *et al.*, 1986), *Trichosantes bracteata* (Lam.) Voigt (Kaneda & Uchikoba, 1994), de *Cucurbita ficifolia* (Curotto *et al.*, 1989), *Synadenium grantii* Hook, 'f'. (Mrinalini Menon *et al.*, 2002), *Euphorbia supina* (Arima *et al.*, 2000), *Melothria japonica* (thumb) Maxim (Uchikoba *et al.*, 2001), entre otras.

Acilación



Deacilación

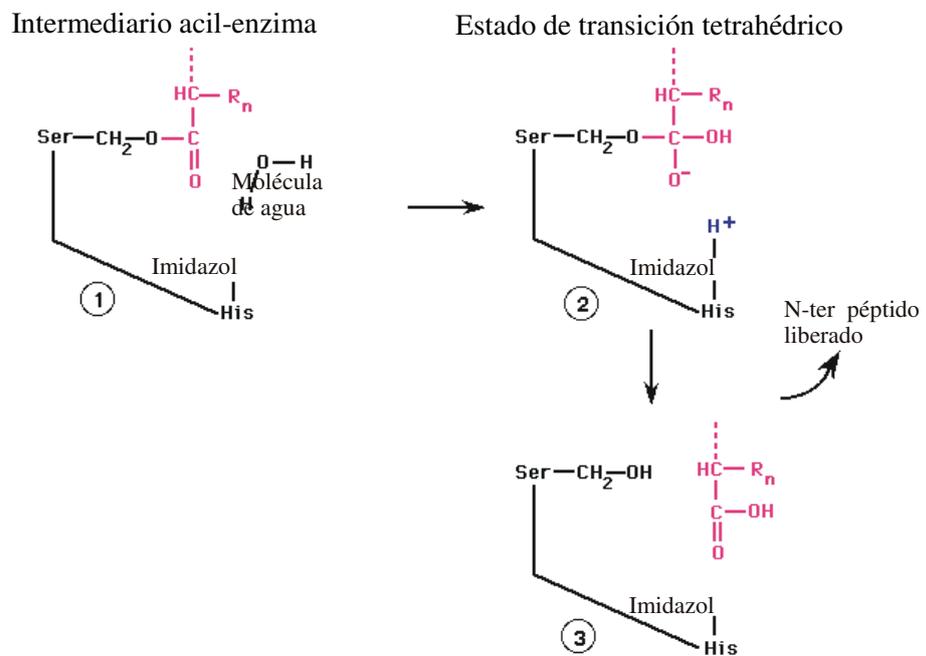


Fig. 3. Mecanismo catalítico de las proteinasas serínicas y treonínicas.

1.4.2. Peptidasas cisteínicas

Esta clase incluye las proteasas vegetales más extensamente estudiadas tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaina, varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma*. La mayoría de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína que es la enzima cisteínica más ampliamente estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la enzimología en general. Ha sido la primera proteínasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth *et al.*, 1968) por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas.

Actualmente se sabe que estas peptidasas se sintetizan en los polisomas del citoplasma como un precursor o propéptido N-terminal de corta longitud y otro C-terminal más largo. Esta proenzima inactiva se dirige al lumen del Retículo Endoplasmático y luego es transportada a las vacuolas o a la pared celular que constituyen su destino final. La mayoría de las proteínas solubles de las plantas poseen una secuencia señal a nivel del C-terminal reconocida por un receptor del Aparato de Golgi (Okamoto *et al.*, 2003) y luego transportada por la red trans Golgi. Sin embargo, ciertas peptidasas de la familia de la papaína tienen una secuencia señal de retención al Retículo Endoplasmático y así, son transportadas en grandes vesículas que emergen del retículo y se fusionan directamente con las vacuolas almacenadoras de proteínas, sin pasar por el Aparato de Golgi, (Okamoto *et al.*, 2003). Finalmente cuando se remueven las secuencias C y N- terminales del propéptido en estas vacuolas se transforman en la conformación nativa que es la estructura química con capacidad de cumplir su función biológica (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cisteína 25 y la Histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Serina 195 y de la Histidina 57,

respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo OH, sino un ion tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la Histidina 159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua (Moreau & Choplin, 2005 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>). La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (switterion). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carboxilo del sustrato. La ruptura del mismo implica el ataque del agua catalizado por la enzima.

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó “tiolproteinasas” (Hartley, 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término “tiolproteinasas” por el de “proteinasas cisteínicas” (NC-IUBMB, 1984) (Figura 4).

Como ejemplos de peptidasas cisteínicas se pueden citar a las aisladas de *Calotropis gigantea* (Rajesh *et al.*, 2005), de *Bromelia hieronymi* Mez (Bruno *et al.*, 2003), de *Bromelia balanceae* Mez (Pardo *et al.*, 2001), de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregon *et al.*, 2001), de *Araujia angustifolia*, y de *Funastrum clausum* (Morcelle del Valle, 2004 a; Morcelle del Valle *et al.*, 2004 b), entre otras.

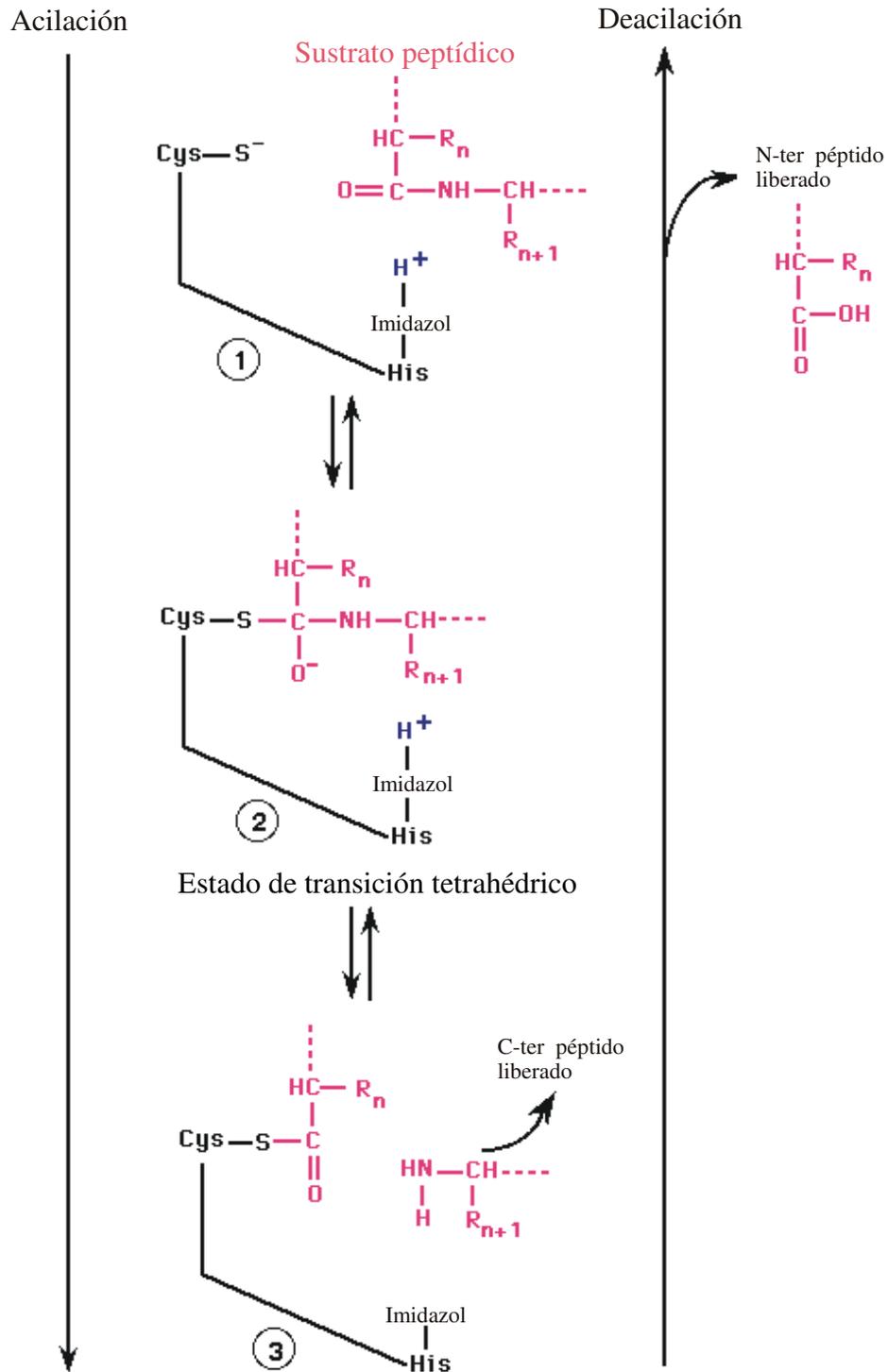


Fig.4. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.

1.4.3. Peptidasas aspárticas

La mayoría de las proteinasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas tales como pepsina y quimopepsina, catepsina D y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia comprende proteínas virales tales como la proteasa del virus del SIDA, llamada retropepsina.

Estudios cristalográficos permitieron mostrar que estas enzimas son moléculas constituidas por dos lóbulos homólogos, con el sitio activo localizado entre ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo Aspártico de la díada activa de aspartatos. Estos dos residuos aspárticos están geoméricamente muy próximos en la molécula activa y uno sólo de ambos aspartatos es ionizado en el rango de pH óptimo (2-3). Por actuar en forma óptima a bajos pH estas proteinasas también fueron denominadas “proteinasas ácidas” Hartley (1960).

En contraste con las proteasas serínicas y cisteínicas, la catálisis de las aspárticas no involucra enlaces covalentes intermedios, aunque existe un intermedio tetraédrico. El ataque nucleofílico se realiza por la transferencia simultánea de dos protones: uno desde una molécula de agua a la díada de dos grupos carboxilos y un segundo desde la díada al oxígeno del grupo carbonilo del sustrato con la consecuente rotura del enlace peptídico. Esta catálisis general ácido-base, permite la formación de un intermedio tetraédrico no covalente (Moreau & Choplin, 2005 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>) (Figura 5).

Las proteasas aspárticas vegetales conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar phytepsina aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Oryza* y *Vigna*, (Kervinen, 1998) además de cyprosina obtenida a partir de *Centaurea calcitrapa* y de *Cynara cardunculus* (Cordeiro *et al.*, 1998) y cardosina A (Pires, 1998a) y cardosina B (Pires, 1998b) aisladas de *Cynara cardunculus*. Recientemente se aisló otra proteasa aspártica de la especie *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo Cavalli, 2005).

Estas enzimas pueden ser monoméricas o heterodiméricas, conteniendo dos péptidos procesados a partir del mismo precursor proteico. Las proteinasas aspárticas de los vegetales son generalmente secretadas o bien destinadas al compartimento vacuolar. La secuencia primaria de algunas de estas enzimas ha sido determinada y presentan un alto grado de identidad con las de origen animal y microbiano; sin embargo, las proteinasas aspárticas vegetales tienen una región muy específica que no se encuentra en animales, microorganismos o proteinasas virales. Si bien la función de esta región no ha sido aún elucidada se ha propuesto una función en el procesamiento o degradación de proteínas, aunque se requerirían más estudios para confirmar su función in vivo. Resultados más recientes sugieren posibles roles en la muerte celular programada de los tejidos y en la resistencia a los patógenos (Mutlu & Gal, 1999).

1.4.4. Metalopeptidasas

Las metaloproteinasas se encuentran entre las hidrolasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado por una molécula de agua. Esta es una característica compartida con las proteasas aspárticas, pero en las metaloproteasas un catión metálico divalente, usualmente cinc, aunque algunas veces cobalto, níquel o manganeso, activan la molécula de agua. El ión metálico es generalmente sostenido por tres aminoácidos ligandos.

Estas proteinasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En varias metaloproteasas se requiere solamente un ión cinc, pero en algunas son dos los iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso, se requieren dos iones metálicos, aunque hay familias dependientes de cinc en las que también dos iones son cocatalíticos. En las proteinasas con iones metálicos cocatalíticos, solamente cinco residuos aminoacídicos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metaloproteinasas con un ion metálico catalítico pueden ser exo o endopeptidasas. Los ligandos conocidos son Histidina, Glutamina, Aspártico o Lysina.

Estas enzimas difieren ampliamente en sus secuencias y en sus estructuras pero la gran mayoría contiene un átomo de cinc catalíticamente activo. En algunos casos, el cinc puede ser reemplazado por otro metal como cobalto o níquel sin pérdida de la actividad. La termolisina bacteriana ha sido bien caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico.

Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos histidinas para el cinc mientras el tercer ligando es tanto ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasas) o una histidina (astacina). Otras familias exhiben un modo diferente de unión al átomo de cinc. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermedio tetraédrico no covalente luego de atacar una molécula de agua al cinc unido sobre el grupo

carbonilo del enlace escindible. Este intermedio es posteriormente descompuesto por transferencia del protón del ácido glutámico al grupo saliente (Moreau & Choplin, 2005 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>) (Figura 6).

Las metalopeptidasas constituyen el grupo de enzimas proteolíticas menos estudiado en los vegetales. Existen solamente unas pocas referencias sobre la presencia de esta clase enzimas en semillas de *Cucurbita pepo* (Hara & Matsubara, 1980), de soja: *Glicine max* (Bond & Bowles, 1983), de *Canavalia ensiformis* (Dalkin *et al.*, 1983) y de *Fagopyrum esculentum* (Belozersky *et al.*, 1990). Recientemente se han aislado de la especie *Arabidopsis thaliana* (Chabregas, 2003).

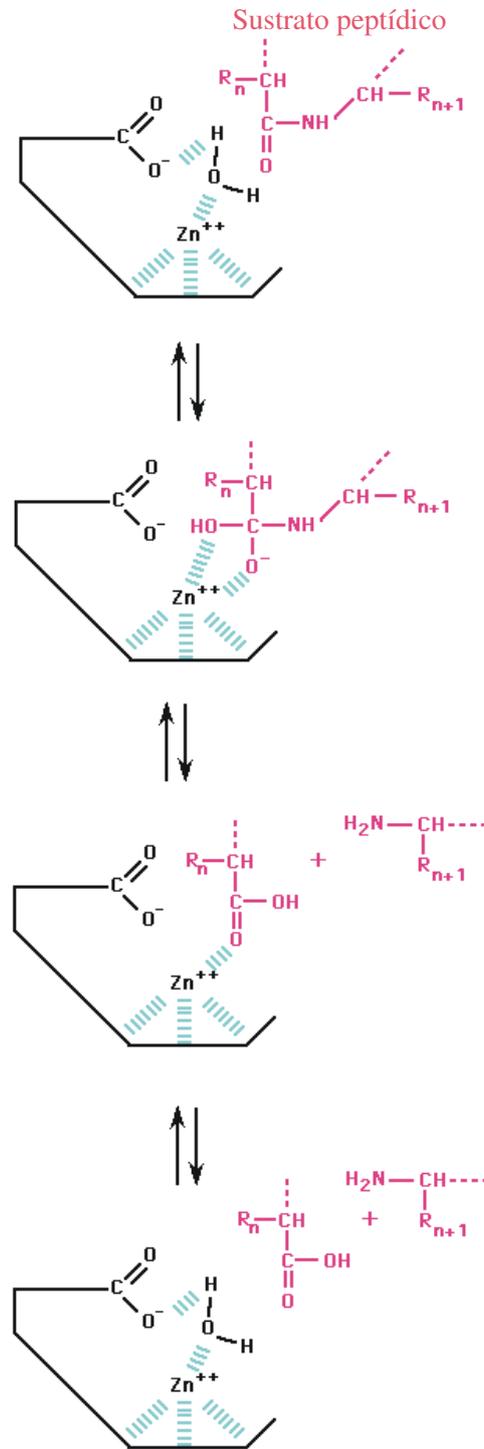


Fig. 5. Mecanismo catalítico de las metaloproteinasas.

1.4.5. Peptidasas de mecanismo catalítico no conocido

Existe un número de peptidasas para las cuales el mecanismo catalítico no se ha elucidado. Aquellas sobre las cuales se conoce la secuencia de aminoácidos se han denominado con la letra “U” (peptidasas **U**nclassified) sin considerar el mecanismo catalítico y se les asigna además un número arbitrario, por ejemplo Familia U28 que contiene dipeptidasa E de *Escherichia coli*. Las bases de datos muestran 20 familias de peptidasas no clasificadas (Barrett, *et al.*, 2004c)

1.5. ¿Cómo pueden inhibirse las peptidasas? Importancia de los inhibidores

En principio, todo compuesto que disminuye la velocidad de hidrólisis de un sustrato determinado es un inhibidor enzimático. Sin embargo, compuestos quelantes que remueven por ejemplo, iones calcio y cinc de una peptidasa metal-dependiente, al igual que agentes desnaturalizantes como urea que cambian la conformación de las proteínas, son más bien considerados inactivadores que inhibidores enzimáticos. Los inhibidores de peptidasas son definidos como aquellos que actúan directamente sobre el sitio activo, por ej. combinándose entre los sitios catalíticos de la enzima y los sitios de unión del sustrato formando un complejo fuerte y estable (Salvesen & Nagase, 2001).

Los inhibidores son de suma importancia en el estudio de las proteinasas dado que permiten obtener claras evidencias acerca del tipo de sitio catalítico, información que constituye las bases de la clasificación de estas enzimas. Además permiten la identificación de proteinasas individuales y proveen las herramientas para titular sus sitios activos y facilitan la investigación de sus funciones biológicas (Barrett *et al.*, 1982). Comprender la actividad proteolítica en procesos biológicos implica conocer la contribución de los inhibidores naturales en la regulación de esta actividad y el uso de inhibidores sintéticos en la caracterización de la misma.

1.5.1. Inhibición de peptidasas serínicas

El diisopropilfluorofosfato (DFP), uno de los inhibidores de peptidasas más ampliamente utilizado, es un miembro de los compuestos organofosforados que inactiva irreversiblemente a las peptidasas serínicas mediante fosforilación de la serina activa del sitio catalítico. Es considerado el inhibidor más útil para poder identificar esta clase de peptidasas dado que manifiesta escasa o nula acción sobre otros tipos de endopeptidasas (Salvesen & Nagase, 2001).

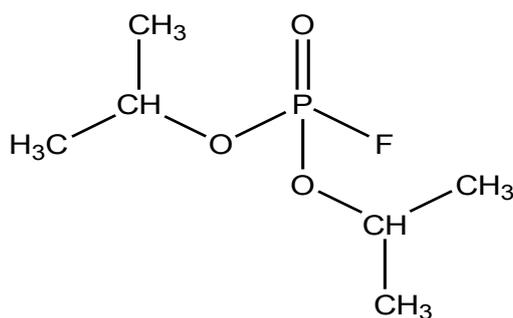


Fig. 7. Diisopropilfluorofosfato (DFP).

1.5.2. Inhibición de peptidasas cisteínicas

Las cisteinilpeptidasas contienen un grupo tiol altamente reactivo por lo que generalmente manifiestan su actividad en condiciones reductoras y en presencia de agentes quelantes, ya que los iones metálicos pueden inhibirlas. Precisamente este tipo de proteasas pueden identificarse mediante el agregado de reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilos tales como iodoacetato, cloruro mercúrico o mercuribenzoato, aunque no son aconsejables de emplear en las condiciones usuales de ensayo dado que reaccionan también con compuestos tiólicos de bajo peso molecular, por ej. con cisteína que normalmente se adiciona al medio como activador. Los inhibidores naturales de las peptidasas cisteínicas están ampliamente distribuidos en en las plantas como así también en los animales y los microorganismos (Malgorzata *et al.*, 2004). De acuerdo a su secuencia aminoacídica, la presencia y posición intracadena de los puentes disulfuro y la masa molecular de las proteínas, estos inhibidores se clasifican en tres familias: (Turk & Bode, 1991). La primera de estas familias consiste en

proteínas constituidas por 100 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 11 kDa las cuales no poseen puentes disulfuro. La familia de las Cystatin posee proteínas con 120-128 residuos de aminoácidos, masa molecular de 13,4-14,4 kDa y con dos puentes disulfuro y la mayoría de ellas no son glicosiladas (Grzonka *et al.*, 2001). El grupo de las kininogen está compuesto por glicoproteínas de 60-120 kDa de masa molecular. Recientemente se descubrió una nueva clase de inhibidores naturales que se la llamó Estafostatina encontrada en *Staphylococcus aureus* (Dubin, 2003; Dubin *et al.*, 2003; Rzychon *et al.*, 2003). La regulación de estos inhibidores naturales es poco conocido. La expresión de estos está limitada a órganos específicos o a etapas de crecimiento particulares como la germinación (Botella, 1996), estadios tempranos de la senescencia foliar (Huang *et al.*, 2001), stress hídrico (Waldron *et al.*, 1993), stress ante bajas temperaturas (Pernas *et al.*, 2000) y stress salino (Van der Vyver *et al.*, 2003). La localización citosólica de estos inhibidores sugieren su participación en la defensa de la planta ante insectos (Botella, 1996; Zhao, 1996).

Así, el inhibidor artificial aconsejable para esta clase de peptidasas es el denominado E 64: *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidin)butano, que forma un enlace tioéter irreversible con el tiol de la cisteína activa. Se ha demostrado que el E-64 inhibe todas las peptidasas cisteínicas ensayadas y que no afecta a las demás peptidasas. Además se caracteriza por actuar en relación equimolecularar (1:1 enzima/inhibidor) permitiendo de este modo la titulación del sitio activo (Barrett *et al.*, 1982).

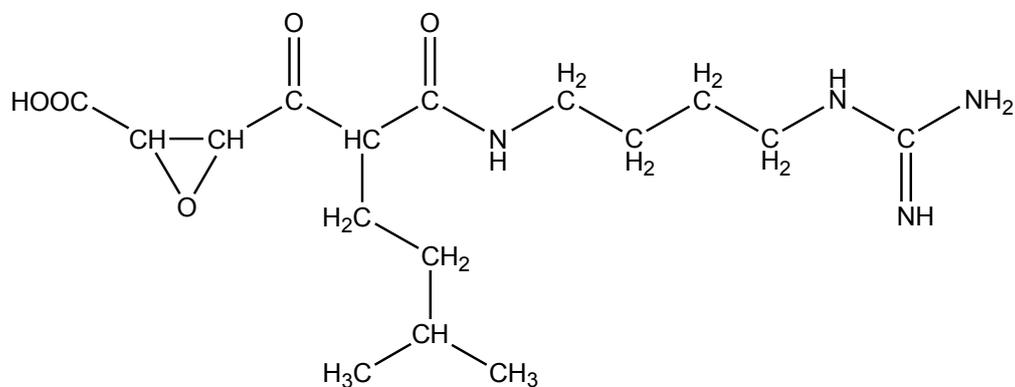


Fig. 8. E-64: *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano.

1.5.3. Inhibición de peptidasas aspárticas

Las peptidasas aspárticas mejor caracterizadas (pepsina, quimopepsina, catepsina D, renina y proteasas del HIV) son inhibidas por pepstatina A, un isovalerilpentapéptido de origen microbiano, que actúa de modo reversible y no afecta a otro tipo de proteasas (Unezawa, 1976).

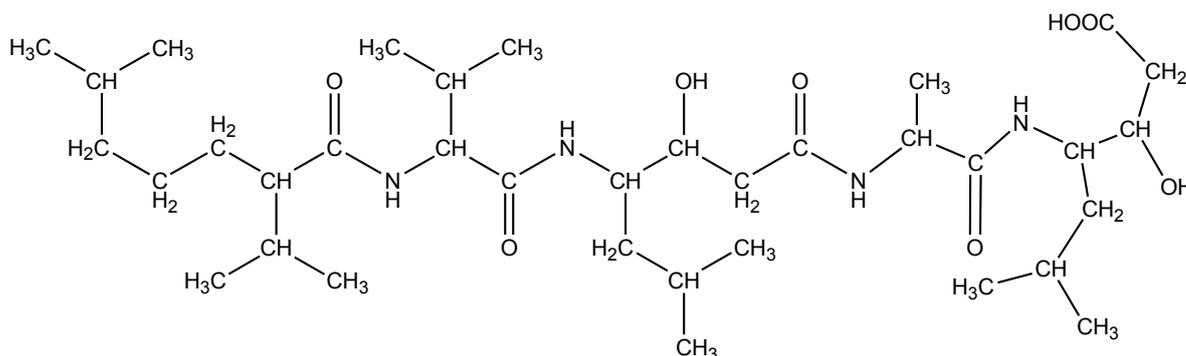


Fig. 9. Pepstatina A: Isovaleril-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA, donde AHMHA es: (3S, 4S)-4- amino-3-hidroxi-6-metil-heptanoico.

1.5.4. Inhibición de metalopeptidasas

Las metalopeptidasas muestran máxima actividad a pH cercano a 7,0 y pueden ser inhibidas por acción de agentes quelantes como el EDTA o la 1-10 fenantrolina que bloquean los átomos metálicos esenciales para la catálisis (Dunn, 2001) (Figura 10).

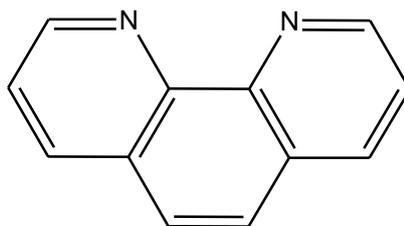


Fig. 10. 1-10 Fenantrolina.

1.6. Importancia de la proteólisis en las plantas

La proteólisis, como ya ha sido mencionado en párrafos anteriores, es esencial en muchos aspectos de la fisiología y desarrollo de los vegetales debido a que este tipo de enzimas está involucrado en el catabolismo proteico (el recambio de las proteínas existentes y su reemplazo por otras nuevas constituye la clave para la adaptación al medio ambiente), en la regulación de varios procesos, particularmente en la germinación de semillas (las proteínas de reserva son movilizadas para la construcción de las proteínas que requiere la plántula), en la formación de órganos reproductores y en la senescencia de algunos órganos como las hojas (en este proceso las proteínas se degradan y sus aminoácidos son transportados y almacenados en aquellos lugares donde se sintetizan nuevas proteínas). También participan en la interacción con otros organismos (Ejemplo: las proteasas de plantas insectívoras). De este modo, la proteólisis es responsable del mantenimiento celular, de la respuesta al stress mediante la remoción de proteínas anormales y mal plegadas. Aporta los aminoácidos necesarios para fabricar nuevas proteínas, ayuda en la maduración de zimógenos y hormonas peptídicas mediante escisiones limitadas. Controla el metabolismo, la homeostasis y el desarrollo, disminuyendo la abundancia de enzimas claves y proteínas regulatorias así como la muerte celular programada de ciertas células y órganos de la planta (Vierstra, 1996).

El modo de acción de las enzimas en los procesos fisiológicos puede ser de dos tipos diferentes (Moreau & Choplin, 2005 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>)

- a) Proteólisis limitada: en la cual una proteasa corta sólo un o bien un número limitado de enlaces peptídicos de una determinada proteína inicialmente inactiva o precursora, provocando de este modo su transformación en una proteína biológicamente activa (ejemplo: conversión de prohormonas en hormonas).

- b) Proteólisis ilimitada: en la cual una proteína determinada es degradada a sus aminoácidos constituyentes. La degradación de las proteínas puede ser dependiente de la ubiquitina, polipéptido que se une selectivamente a la misma para constituir la forma conjugada ubiquitina-proteína, susceptible de ser rápidamente hidrolizada o bien mediante la compartimentalización de proteasas en vacuolas. Cuando las proteínas son transferidas a estos compartimientos vacuolares experimentan una rápida degradación (Vierstra, 1996).

El análisis de los datos completos en alrededor de cien genomas ha demostrado que aproximadamente de un 2% de todos los productos génicos son peptidasas, evidenciándose así que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más grandes e importantes (Barrett *et al.*, 2004c).

Estas enzimas normalmente se encuentran en cantidades relativamente bajas y a menudo son difíciles de detectar. La presencia de cantidades extremadamente altas de enzimas proteolíticas en algunos tejidos, es difícil de explicar. Ellas podrían actuar como alomonas, en defensa contra agentes patógenos, parásitos y herbívoros (Dussourd, 1993)

Aparentemente, diferentes recursos genéticos han sido utilizados en un proceso de convergencia evolutiva para la sobreproducción y acumulación de proteasas en diferentes familias vegetales. A esta clase de enzimas que se producen en cantidades que exceden el potencial necesario para el recambio proteico se las denomina “proteasas no dispensables” o “proteasas secundarias” en obvia analogía con los metabolitos secundarios de las plantas y estarían destinadas a interactuar con otras especies vegetales o animales con funciones de protección o de defensa (Boller, 1986).

Entre las proteasas altamente abundantes en látex, en tejidos vegetativos y en frutos se encuentran fundamentalmente las proteasas cisteínicas y las serínicas.

Las proteasas presentes en el látex de algunas especies representan más del 50% del total de las proteínas. La principal proteinasa del látex de

frutos de papaya, papaína (EC 3.4.22.2), se encuentra en una concentración tal que excede en dos veces la cantidad necesaria para el recambio de las proteínas del fruto (Glazer & Smith, 1971). También ficina (EC 3.4.22.4), presente en el látex de higos, se encuentra en cantidades abundantes. Asimismo, tanto en partes vegetativas como en frutos de varias especies pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* se observan grandes cantidades de enzimas proteolíticas. A estas proteasas también se las llamó “proteínas prescindibles” (Adams & Rinne, 1981). La sorprendente similitud bioquímica de las proteasas cisteínicas altamente abundantes no indicaría un ancestro común, como se ha sugerido, sino más bien una convergencia evolutiva como resultado de una función defensiva común. En efecto, es de esperar que aquellas proteasas que se acumulan para propósitos defensivos presenten una elevada estabilidad, una amplia especificidad de sustrato y la falta de una tendencia autolítica. Estas propiedades, características indispensables para la acción de estas enzimas, las distingue de otras proteasas como por ejemplo las que actúan en el proceso de germinación (Boller, 1986).

1.6.1. Ejemplos de proteólisis "in vivo"

A continuación se mencionan algunos de los procesos más importantes en los que participan las proteasas:

- ✓ *Germinación*: las proteínas almacenadas en las semillas son expresadas en órganos específicos (endosperma o mesófilo del cotiledón), siendo generalmente sintetizadas como precursores que serán procesados antes de su depósito en los cuerpos proteicos. Para ello pareciera que es importante la co-localización en la misma organela de varias peptidasas. (Mutlu & Gal, 1999). Recientemente se ha descubierto que las proteasas cisteínicas son las responsables de la degradación y movilización de las proteínas almacenadas (Grudkowska & Zagdanska, 2004).

- ✓ *Senescencia*: término que se refiere al proceso programado dentro del desarrollo de la planta que involucra una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de forma simultánea o secuencial en los diferentes tejidos que envejecen, las proteínas se degradan y sus aminoácidos se transportan y se almacenan en aquellos lugares donde se sintetizan nuevas proteínas.

- ✓ *Defensa*: las proteasas que se encuentran en las vacuolas o en la pared celular de algunas plantas actúan como agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros debido a que constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos (Bell, 1981; Alvan der Hogrn & Jones, 2004).

- ✓ *Adquisición de nutrientes*: si bien las plantas son autótrofas, en las plantas insectívoras es donde se evidencia la participación de las proteasas ya que son capaces de digerir las proteínas de las presas capturadas y de este modo aportan nutrientes a la planta (Boller, 1986).

- ✓ *Apoptosis o muerte celular programada*: este proceso funciona como un mecanismo de defensa para la planta ya que constituye una forma eficaz de destruir células o tejidos no deseados o dañados y prepara los restos para su eliminación rápida, por lo cual contribuye a la construcción y el mantenimiento de los tejidos y por ende del organismo en su totalidad. Se ha encontrado que las proteasas cisteínicas participan activamente de este proceso (Alvan der Hogrn & Jones, 2004; Campbell *et al*, 2003).

1.7. Características del látex: propiedades y funciones

El látex es una emulsión generalmente lechosa y blanca, aunque también puede ser amarillenta, anaranjada o rojiza. Se encuentra en los tubos laticíferos de muchas plantas de los cuales fluye cuando son heridas. Este látex

gotea durante algunos minutos hasta la formación de un coágulo en la zona dañada. Este proceso de coagulación es vital y constituye un mecanismo de defensa contra el posible ataque de patógenos (Pereira *et al.*, 2001).

La composición del látex es muy compleja y varía con las distintas especies. Entre los materiales que pueden formar la suspensión se encuentran caucho, ceras, proteínas, aceites esenciales, mucílagos e incluso granos de almidón, sales, ácidos orgánicos, azúcares, alcaloides, enzimas, etc. Del látex se extrae por ejemplo, caucho, gutapercha, chicle, entre otros. En ocasiones se utiliza el término de lactoresina como sinónimo de látex. Según esta denominación se pueden diferenciar dos tipos de lactoresinas: las fisiológicas y las patológicas. Las primeras se refieren a aquellas que la planta produce normalmente y acumula en pelos, raíces, conductos secretores, etc. En cambio, las patológicas son exudadas artificialmente a causa de traumatismos ocasionados en la planta. La secreción fisiológica de resinas es mucho menor que la patológica, debido a que una incisión o traumatismo produce una estimulación del sistema secretor existente o incluso la formación de un nuevo tejido secretor llamado *sistema secretor secundario* (<http://inistor.galeon.com/pagina2.htm>).

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, la estructura secretora interna que contiene al látex es el laticífero, que puede ser una sola célula no articulada o una estructura multicelular articulada. La presencia de látex ha sido reportada en 12.000 especies vegetales pertenecientes a 900 géneros. El hecho que en una familia determinada no todos los géneros posean látex complica definir la función del látex en las plantas (Lynn & Clevette-Radford, 1987).

Diversas investigaciones han confirmado que el látex tiene componentes con propiedades biológicas que le otorgan protección a la planta que lo posee contra distintos tipos de daños ambientales. Así por ejemplo, el caucho o goma natural extraído de *Hevea brasiliensis* L. es látex coagulado que el árbol produce como un mecanismo de defensa ante una herida. Otro ejemplo lo presenta el látex del árbol de la papáina en el cual dicha proteasa transforma al

látex en tóxico para las larvas de los lepidópteros (Konno *et al.*, 2004). Contrariamente a lo anterior, ocurre que el látex para algunos organismos es beneficioso como por ejemplo el que produce algunas especies del género *Asclepias*. Dicho látex proporciona a las mariposas monarcas una defensa química eficaz contra diversos depredadores. Las monarcas aíslan los cardenólidos (también conocidos como glicosídeos cardíacos) que se encuentran en estas especies, volviéndose venenosas para la mayoría de los vertebrados (Brower & Moffit, 1974; Haribal & Renwick, 1996; Rayor, 2004). Sin embargo, los beneficios que las monarcas obtienen de los cardenólidos no son gratuitos. La concentración de cardenólidos en estas plantas varía significativamente de una especie a otra y dentro de una misma especie. Tanto la toxina como el látex viscoso producidos por las plantas proporcionan defensas contra los herbívoros. Al parecer el consumo de plantas con altos niveles de cardenólidos afecta en forma negativa a las monarcas, las cuales, en efecto, pueden morir de inanición cuando sus mandíbulas se pegan una con otra con el látex o cuando su cuerpo queda envuelto en una gota de látex formada cuando la planta presenta algún daño. También estos cardenólidos son tóxicos para el ganado, ovejas y ocasionalmente a los caballos produciéndoles graves consecuencias en su organismo como por ejemplo, aumento en la frecuencia cardíaca, pérdida del control muscular, parálisis respiratoria y finalmente la muerte. (Malcolm & Zalucki, 1996; Zalucki & Brower, 1992; Zalucki *et al.*, 2001).

El látex de algunas especies posee propiedades que pueden ser beneficiosas para aplicaciones terapéuticas y farmacéuticas. Así, el látex de *Calotropis gigantea* contiene proteasas que ayudan en el tratamiento de la trombosis coronaria la cual se produce por un bloqueo de los vasos sanguíneos por coágulos estructurados por una proteína llamada fibrina. Estas proteasas promueven selectivamente la degradación natural de coágulos de sangre, sin causar hemorragias, en personas que presentan bloqueos en vasos sanguíneos (Rajesh *et al.*, 2005). El látex de *Ervatamia coronaria* posee efectos antiinflamatorios en las heridas (Sundd, *et al.*, 1998). *Calotropis procera*, es una planta medicinal popular en Asia y Africa ya que el extracto etanólico de esta especie posee

actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antipirética y anticancerosa (Dubey & Jagannadham, 2003).

1.8. Ejemplos en la naturaleza de la presencia de proteasas en látex

Las familias que se caracterizan por presentar látex en la naturaleza son: *Caricaceae*, *Moraceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae*, sin embargo las proteasas más estudiadas han sido las aisladas de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y de ciertas especies de higos (*Moraceae*). Debido a esto, son las más producidas a escala comercial y como consecuencia de ello, las más utilizadas en diferentes procesos industriales (Kimmel & Smith, 1957; Glazer & Smith, 1971).

De *Carica papaya* se aislaron al menos 4 proteasas cisteínicas mayoritarias con propiedades enzimáticas similares, aunque diferenciables por sus actividades relativas sobre diferentes sustratos (Glazer & Smith, 1971), por su reactividad frente a reactivos sulfhidrúlicos (Baines & Brocklehurst, 1982) y por su basicidad (Brocklehurst & Salih, 1983). La secuencia N-terminal de las cuatro peptidasas pudo ser determinada y comparada, demostrando tener todas una importante homología lo que indicaba, que los representantes de la familia poseen genes íntimamente relacionados (Lynn & Yaguchi, 1979).

Las proteasas presentes en el látex de *Ficus carica* (*Moraceae*) (Sgarbieri, *et al.*, 1964; Kramer & Whitaker, 1964; Sugiura & Sasaki, 1974) y *Ficus glabrata* (Englund, *et al.*, 1968; Williams & Whitaker, 1969; Jones & Glazer, 1970; Kortt *et al.*, 1974 a y 1974b) son cisteínicas y se asemejan mucho a las proteasas de papaya ya que presentan similar especificidad de sustrato frente a la cadena B de insulina, pH de acción óptimo frente a caseína cercano a la neutralidad, puntos isoeléctricos elevados y son inhibidas por cistatina (Bojörk & Ylinenjärvi, 1990).

En cambio la proteasa aislada y caracterizada del látex de *Maclura pomifera* (López *et al.*, 1993; López *et al.*, 1995) de la misma familia que la anterior es del tipo de las serínicas, de masa molecular 65 kDa, pH óptimo alcalino y cuya especificidad respecto de sustratos sintéticos y de la cadena B de la

insulina es similar a cucumisina, proteinasa de *Cucumis melo* (*Cucurbitaceae*). Esta peptidasa pertenecería a la familia de las subtilisinas, por sus características y dicha pertenencia se fundamenta además en su secuencia N-terminal (Rudenskaya *et al*, 1995).

La familia *Euphorbiaceae* se caracteriza por presentar látex con importante actividad proteolítica, sin embargo carece de estudios recientes acerca del aislamiento y caracterización de las proteasas presentes. Las proteasas que se aislaron y se caracterizaron fueron euforbaína 1, euforbaína p (Lynn & Clevette-Radford, 1988), y euforbaínas y c 1-3 del género *Euphorbia*, y hevaína a, hevaína b y hevaína l del género *Hevea* (Lynn & Clevette-Radford, 1986), las cuales se caracterizan por ser serínicas.

Del látex de *Taraxacum officinale* (*Asteraceae*) se aisló y se caracterizó a la proteasa taraxalisina de tipo serínica, con un pH óptimo de 8 una masa molecular de 67 kDa y un pI de 4,5. En lo que respecta a especificidad de sustrato y secuencia N-terminal manifiesta características similares a cucumisina y maclurisina.

Con respecto a las proteasas presentes en el látex de la familia *Apocynaceae* se ha aislado y caracterizado a la tabernamontanaína de la especie la *Tabernamontana grandiflora* (Jaffé, 1943) que es de característica cisteínica y con una significativa actividad proteolítica. Del látex de *Ervatamia coronaria* se aisló una proteasa cisteínica llamada ervatamina que se caracteriza por ser altamente estable, presentar una masa molecular de 25 kDa, un pH óptimo de 7,5-8,0 y una temperatura de acción óptima de 50 °C. La secuencia aminoacídica N-terminal mostró considerable similitud con papaína y bromelaína (Sundd *et al.*, 1998). Más recientemente, se aislaron, purificaron y cristalizaron dos tiol proteasas denominadas ervatamina B y ervatamina C (Chakrabarti *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2000).

Finalmente en la familia *Asclepiadaceae*, a pesar de estar constituida por 200-250 géneros y desarrollar laticíferos, sólo han sido estudiadas las proteasas contenidas en el látex de algunas especies pertenecientes a cinco Géneros: *Araujia*, *Asclepias*, *Calotropis*, *Funastrum* y *Morrenia*.

Del Género *Araujia* solamente se han purificado y caracterizado las proteasas del látex de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregon *et al.*, 2001) y de *Araujia angustifolia* (Obregón *et al.*, 2005).

En el Género *Asclepias* los trabajos realizados hasta el presente corresponden a: Winnick *et al.*, 1940; Greenberg y Winnick, 1940; Carpenter & Lovelace, 1943; Brockbank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980; Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991; Trejo *et al.*, 2001 y Liggieri *et al.*, 2004.

Con respecto al Género *Calotropis* los únicos trabajos citados en la bibliografía corresponden a Abraham & Joshi, 1979 a, b; Pal & Sinha, 1980; Sengupta *et al.*, 1984 y Rajesh *et al.*, 2005.

En el caso del Género *Funastrum*, las proteasas aisladas corresponden a *Funastrum clausum* (Morcelle del Valle, 2004 a; Morcelle del Valle *et al.*, 2004 c).

Finalmente del Género *Morrenia* pueden citarse los trabajos referidos a *Morrenia brachystephana* y *Morrenia odorata* (Arribére *et al.*, 1998; Vairo Cavalli *et al.*, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2003) cada una con dos proteasas activas.

Todas estas proteasas se caracterizan por ser cisteínicas, con masas moleculares dentro del rango 20-35 kDa y pI alcalino. Asimismo, se destaca la gran homología existente entre los residuos N-terminal de dichas proteasas entre sí y con las proteasas de *Carica papaya*.

Es importante destacar que la especificidad de las proteasas cisteínicas de *Carica*, *Ficus* y *Asclepias* son muy similares en sus acción sobre la cadena B de la insulina (Lynn, 1983). Dicho comportamiento puede obedecer a una evolución convergente de las proteasas del látex (Boller, 1986).

1.9. Proteasas pertenecientes al Género *Asclepias*

La presencia de enzimas proteolíticas en el látex de *Asclepiadaceae* fue reportada por primera vez en *Asclepias speciosa* por Winnick *et al.*, (1940) quienes lograron aislar una proteinasa sulfhidrónica a la que denominaron asclepaína (EC 3.4.22.7). A partir del látex de *Asclepias mexicana*, Greenberg & Winnick (1940) aislaron asclepaína m, una enzima de iguales características, con máxima

actividad a pH 6,5-8,5 frente a hemoglobina desnaturalizada y a pH 7,0-7,5 frente a ovoalbúmina como sustrato.

El nombre de asclepaína fue también utilizado para describir las proteasas aisladas de *Asclepias syriaca* (Brockbank & Lynn, 1979). La enzima de *Asclepias glaucescens* fue denominada asclepaína g para distinguirla de las otras asclepaínas relacionadas (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991).

Carpenter & Lovelace, en 1943 estimaron en 3,11 el valor del punto isoeléctrico (pI) de una proteasa aislada de *Asclepias syriaca*. Con el látex de esta especie, Brockbank & Lynn (1979) realizaron nuevos estudios purificando y caracterizando dos asclepaínas: asclepaína A3 y asclepaína B5. Ambas son homogéneas con masas moleculares de 23 y 21 kDa respectivamente, requieren agentes reductores y quelantes para manifestar su máxima actividad frente a uniones ésteres, amidas y enlaces peptídicos y se inhiben con p-cloromercuribenzoato, ácido iodoacético y tetracionato de sodio. Contienen un grupo SH titulable por molécula, no son glicoproteínas y presentan notables diferencias en la composición aminoacídica. El pH óptimo para hidrolizar la caseína es 7,5-8,5 para asclepaína A3 y 7,0-7,7 para asclepaína B5. Posteriormente, Lynn *et al.* (1980a) separan cada una de las asclepaínas anteriores en 5 enzimas homogéneas (isoenzimas) las que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y muestran que A3 y B5 frente a la cadena B de insulina presentan un comportamiento esencialmente similar.

Asimismo, fue determinada la secuencia N-terminal de los dos grupos de asclepaínas aisladas de *Asclepias syriaca* (A y B) y se compararon con papaína encontrándose un elevado grado de homología con la última. Sobre 21 aminoácidos determinados, asclepaína A mostró un 57% de homología con papaína y asclepaína B un 52% (Lynn *et al.*, 1980). Estos resultados indicarían que si bien las asclepaínas provienen de plantas no relacionadas con *Carica papaya*, fuente de papaína, probablemente compartan un gen ancestral común con esta enzima.

Luego Barragán *et al.* (1985) y Tablero *et al.* (1991) han estudiado las distintas formas moleculares de proteasas presentes en el látex de

Asclepias glaucescens, que no difieren significativamente de las presentes en las anteriores especies; si bien el pI varía de 3,6 a 9,2, las proteasas más abundantes, cuyo pI es superior a 9,0 tiene un peso molecular de 23 kDa y su estructura secundaria es muy similar a la de papaína.

Más recientemente fueron aisladas las proteasas asclepaína f y asclepaína c I y c II de las especies *Asclepias fruticosa* y *Asclepias curassavica*, respectivamente. Dichas proteasas comparten la mayoría de las características bioquímicas como mecanismo de acción catalítico, punto isoeléctrico, peso molecular, pH y temperatura óptimos, estabilidad térmica, actividad endoesterolítica, entre otras (Liggieri *et al.*, 2004; Trejo *et al.*, 2001).

1.10. Actividad enzimática: detección y localización “*in situ*”

La histoquímica enzimática permite evidenciar la presencia de enzimas específicas en el sitio donde éstas se localizan, dentro de las células intactas. Esto es posible a través del uso de sustratos naturales o artificiales capaces de penetrar en el tejido y reaccionar con la enzima de interés. De modo tal que, el tejido vegetal fresco conteniendo la enzima se prepara para la citoquímica enzimática mediante fijación por congelamiento y posteriormente se incuba en una solución del sustrato específico para la clase de enzima considerada. Después de la reacción enzimática, el producto de reacción formado, puede localizarse dentro de las células y tejidos intactos mediante microscopía óptica, de fluorescencia o electrónica de transmisión. Este método no se puede aplicar a las endopeptidasas ya que sus sustratos son proteínas de gran tamaño incapaces de difundir a aquellos sitios del tejido donde hay actividad proteolítica por lo que no existe una manera clara de identificar los productos finales. Daoust (1965, 1968) propuso el método de la *película-sustrato*, en el cual las secciones frescas de tejido se ponen en contacto con una capa delgada de sustrato (proteína) depositada sobre un portaobjeto. Luego de teñir específicamente el sustrato, las áreas en las cuales la acción proteolítica degradó la proteína permanece sin teñir, revelándose así, las regiones de actividad proteolítica en el corte histológico.

1.10.1. Detección y localización “*in situ*” de enzimas proteolíticas

Para detectar la actividad proteolítica se utiliza un procedimiento en el cual secciones nativas de tejidos que contienen proteasas son colocadas en contacto con un delgado film de sustrato de alto peso molecular, por ejemplo: gelatina. El mismo se degrada por acción de la enzima formándose productos solubles de bajo peso molecular (Bhalla *et al.*, 1986, Morcelle del Valle *et al.*, 2004a).

Otro procedimiento sugerido para la localización de actividad proteolítica del tipo de *película-sustrato* se basa en la incubación de secciones fijadas, cortadas por congelación, sobre un film fotográfico color procesado no expuesto donde las capas de gelatina coloreadas, son progresiva y secuencialmente digeridas por las proteasas presentes en la sección de tejido. Después de terminada la reacción, la preparación es montada sobre un portaobjetos y observada con microscopio óptico. (Adams & Tuquan, 1961). Denker (1974) también desarrolló un método del tipo *película-sustrato* en el cual emplea como sustrato gelatina sin teñir, debido a que los colorantes usados en estos procedimientos podrían actuar como inhibidores potenciales de las enzimas proteolíticas.

1.11. Descripción botánica de la familia *Asclepiadaceae* R. Br.

Plantas herbáceas, leñosas o suculentas, trepadoras o menos frecuentemente erectas, la mayoría con látex blanco, a veces claro o coloreado; plantas hermafroditas. Hojas opuestas u ocasionalmente alternas o verticiladas, a veces reducidas y caducas, simples, enteras; estípulas ausentes. Inflorescencia por lo general extra-axilar en los nudos, anual o raramente perenne, básicamente cimosa, con frecuencia umbeliforme, racemiforme o paniculiforme, flores actinomorfas, 5-meras; cáliz generalmente dividido casi hasta la base, a menudo con glándulas, coléteres, en su parte inferior interna; corola gamopétala, ocasionalmente con un anillo facial u otros apéndices interiores, corona corolina; estambres epipétalos, connados en las anteras (Periplocoideae) o completamente connados, formando un tubo alrededor del gineceo y adnados

al ápice del estilo formando así el ginostegio, que está provisto de apéndices de diferentes formas, los inferiores constituyen la corona, la cual varía desde un simple anillo carnoso (rara vez ausente por completo) hasta con forma de 5 lóbulos simples, alcanzando a veces estructuras compuestas y complejas, anteras 2-loculares, polen granular (Periplocoideae), o el polen de cada lóculo aglutinado en 1 (2 en Secamonoideae) masa cerosa, polinio, que está removida en pares por dos brazos, transladores, conectados a un corpúsculo central córneo, el cual se encuentra en el margen del ápice del estilo entre las anteras; gineceo de 2 carpelos unidos sólo a nivel del engrosado y a menudo pentagonal ápice del estilo, que es estigmático lateralmente abajo de los corpúsculos, ovario súpero, cada carpelo 1-ocular, típicamente con numerosos óvulos. Frutos folículos ventralmente dehiscentes, típicamente madurando un solo carpelo y abortando el segundo, lisos o variadamente ornamentados; semillas aplanadas, casi siempre con un penacho de tricomas sedosos, en el extremo micropilar.

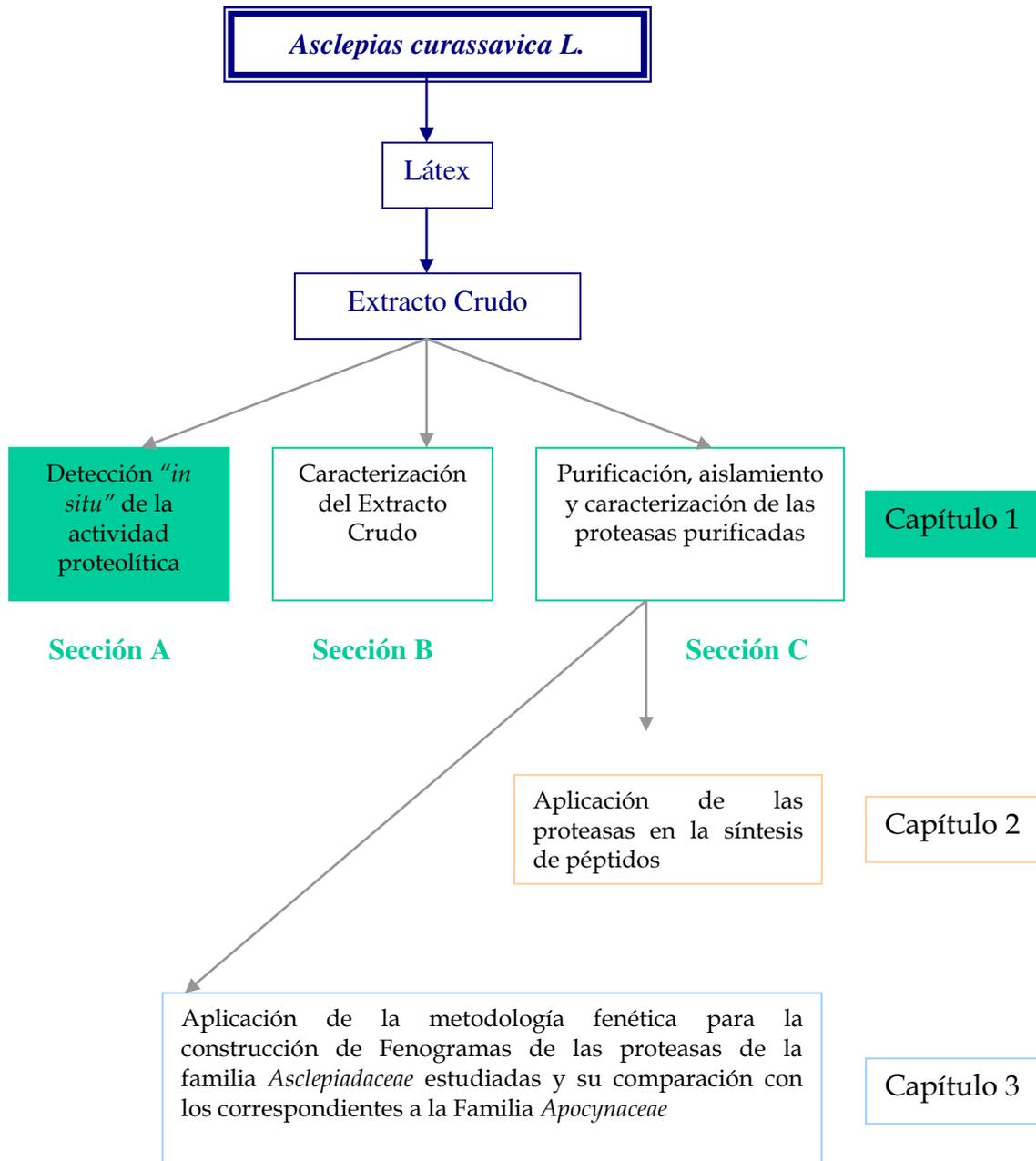
Esta Familia es de distribución principalmente tropical y subtropical con 200–250 géneros y aproximadamente 2800 especies. En nuestro país se las encuentra desde la frontera norte hasta el paralelo 50° en la Patagonia. Abundan especialmente en las zonas llanas y boscosas del norte, centro y litoral y un número reducido de especies llega a las altas montañas y a la Patagonia.

2. Objetivos

SECCIÓN A Localización y detección “*in situ*”, mediante técnicas histoquímicas, de las proteasas ubicadas en los laticíferos de *Asclepias curassavica* L.

SECCIÓN B Obtención y caracterización del Extracto Crudo del látex de *Asclepias curassavica* L.

SECCIÓN C Purificación, aislamiento y caracterización de las fracciones proteolíticas presentes en el Extracto Crudo del látex de *Asclepias curassavica* L.



A.3. Materiales y Métodos

A.3.1. Características del material vegetal



Fig. 11. *Asclepias curassavica* L.

En el presente trabajo de Tesis se eligió la especie *Asclepias curassavica* L. siguiendo la línea de investigación de las proteasas de la Familia *Asclepiadaceae* que se viene desarrollando en el LiProVe. Sus sinonimias con las que además se la conoce son: *A. elata* Benth., *A. glaberrima* Moc. et. Sess.y *Blepharodon mucronatum* (Schlecht.) Decne.

En nuestra región se la conoce comúnmente con el nombre de *Bandera española*, pero también tiene otros nombres vulgares que dependen de la región en la que se encuentre, como por ejemplo: *Paina de seda* (Brasil), *flor de duende* (Venezuela), *vence veneno* (Paraguay), *Hierba de la culebra* (Guatemala), *señorita* (Méjico), *mata y vuelve loco* (Cuba), *algodón de mariposas* (Puerto Rico), *amor de los casados* (Guyana), *Herbe de Ipecac* (Sur de Estados Unidos y Antillas Inglesas), *Cachumeca* (Perú), *mal casada* (Panamá), entre otros.

Esta especie presenta las siguientes características: es una hierba con látex de 50 cm a 1,6 m de altura; sus hojas son simples, alargadas y puntiagudas de 6 a 13 cm de largo y 1 a 2 cm de ancho, se disponen de forma opuesta, el pecíolo es acanalado; las flores están agrupadas en cimas umbeliformes, corola

de color rojo y con néctar, corona amarilla, son pequeñas, Fórmula floral: K(5), C (5), [A 5, G (2)]. Los frutos son folículos erectos glabros, fusiformes y verdes que miden de 5 a 7 cm de largo y multiseminado, semillas negras provistas de pelos blancos sedosos (papus) para ayudar a la dispersión. Flores de primavera a verano.

Hábitat: originaria de Sudamérica, se distribuye en América tropical y subtropical, desde Méjico hasta Argentina, y es una especie naturalizada en Asia. En nuestro país crece espontáneamente en Jujuy, Tucumán, Catamarca, Chaco, Formosa y Misiones. En La Plata y sus alrededores se la puede encontrar escapada de cultivos ornamentales. Esta especie no figura como monografía en la Farmacopea Nacional Argentina.

Partes utilizadas: Raíces, hojas y tallos.

Características salientes: Flores sumamente vistosas y atraentes por su colorido y forma. la corola reflexa, es de color rojo intenso; es común en EEUU llamar a la planta “blood flower” por sus pétalos teñidos de un profundo tinte rojo sangre.

Componentes químicos aislados: Dominguez, J. A. (1928), menciona que en una muestra de tallos foliáceos floríferos recolectados en el mes de marzo en la localidad de Anchorena, (prov. de Buenos Aires), encontró que no contenían cianoglucósidos, alcaloides ni oxidasas; sí contenían peroxidasas y vestigios de saponinas. Citando a otros autores menciona que contiene látex con caucho y resinas y, asclepiadina (Foneulle, 1849) y en la raíz, vincetoxina (Taylor, 1875).

Roig, T. (1945), menciona que la raíz contiene asclepiadina y vincetoxina.

Ragonese y Milano (1984) citan a Gascón y Mors, 1958, mencionando que ellos aislaron tres glucósidos cristalizados de tipo digitaloideo (asclepiadósido) y que además consideran ellos que esta especie contiene sustancias de acción cardiodinámica.

Cáceres A. (1999), citando a diversos autores menciona que la planta contiene β -sitosterol, saponinas (asclepina, curassavina), glicósidos, cardenólidos y esteroides; las hojas glucósidos (asclepiadina), quercetina, camferol y ácido

caféico; la raíz, agliconas cardenólidas y vincetoxina y, hojas, flores y tallos, alcaloides.

Cultivo: Es cultivada por sus flores vistosas en buena parte del país, en la provincia de Buenos Aires se la suele encontrar silvestre escapada de los cultivos. También esta especie es aprovechada para uso medicinal a partir de la recolección de ejemplares silvestres. Existen cultivos comerciales con fines ornamentales.

Condiciones para su crecimiento: necesitan suelos bien drenados, ricos en nutrientes y con pH neutro. Resisten bien temperaturas de 0 °C, aunque su temperatura óptima de invierno es de 10 °C. En primavera florecen y es cuando más agua necesitan. Se recolectan en primavera las plantas enteras y las raíces generalmente a fines del otoño.

Reproducción: Se reproduce con facilidad a partir de semillas, aunque en cultivos comerciales se la reproduce por estacas en vivero, pues enraiza con facilidad.

Usos folclóricos según distintos autores

-Hieronymus, G.: (1882) Am. tropical. Sierras de Catamarca. "La raíz de esta yerba perenne es emética y se ha empleado para sustituir la ipecacuana. Los tallos, hojas y flores se emplean en casos de gonorrea, y la planta seca pulverizada, como estíptico en heridas frescas".

-Roig, T.: (1945) escribe que se utiliza como emética y depurativa. Menciona además que en Camagüey dicen que según la forma que se emplee, puede curar, matar o volver loco al paciente. Agrega que Grosourdy atribuye a esta planta otras propiedades: emética, diaforética, emetocatórtica, hipostenizante vasculoarterial, antídoto y dudosa por su toxicidad y que en Colombia Pérez Arbeláez dice que las raíces se usan para lavados de las mucosas y la piel, que la leche (látex) es antihelmíntica y sirve para romper muelas cariadas.

-Toursarkissian, M.: (1980) menciona que Hieronymus cita esta especie como emético (raíz), antigonorreico (partes aéreas); Pío Correa como emético, venenoso, cordial (raíz); Da Mata como purgativo y emético, hemostático, cordial, tóxico; Bertoni como emético.

El término “cordial” hace referencia a bebidas denominadas “cordiales” probablemente por su sabor amargo y presencia de cardiotónicos, advirtiendo su toxicidad y calificándola de “planta venenosa”.

Ragonese y Milano: (1984) mencionan que es una planta tóxica para el ganado.

Citando a Tokarnia, Dobereiner y Canella, 1972, mencionan que en Brasil se comprobó su toxicidad en un experimento con 38 bovinos jóvenes, describiendo síntomas y lesiones que originan el envenenamiento con esta especie y agregando que con 5 gramos/kg pV ya se observan síntomas de intoxicación y, que cantidades superiores a los 10 gr/kg pV producen la muerte del animal; que no se observó poder acumulativo ni desarrollo de tolerancia. Los síntomas de intoxicación más característicos son anorexia, diarrea líquida o pastosa, timpanismo, edema submaxilar y perturbaciones en la intensidad y ritmo de los latidos del corazón. En el caso que los animales no mueran por la ingesta de esta especie su recuperación es rápidamente. Las alteraciones más importantes que pueden apreciarse en las necropsias son hemorrágicas en el epi y endocardio y alteraciones en el tubo digestivo, principalmente timpanismo (<http://www.herbotecnia.com.ar/aut-bandera-e.html>).

También se ha reportado que el exudado cura las caries y muelas picadas. En algunas regiones se la utiliza como pesticida moliendo hojas y colocadas en cebos ratones (http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/procymaf/). Otros autores reportaron que esta especie produce edema corneal (Kupchan, 1964; Chakraborty *et al.*, 1995).

La tradición popular argentina la registra como planta venenosa para el ganado y su empleo como “hierba medicinal” es muy limitado (Mandrile *et al.*, 1998).

Curiosidades: Su nombre viene del dios griego “Asklepio”, Dios de la Medicina, y alude a sus propiedades medicinales, como ya ha sido mencionado en párrafos anteriores. Como las semillas presentan pelos sedosos se los utilizaba para fabricar mechas de las velas (Ajilvsgi, 1984).

Un ejemplar de herbario está depositado con el número UNR 1130 en la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario.

A.3.2. Método de la película-sustrato de Denker

El método citoquímico empleado en el presente estudio fue el de Denker (1974). Para realizar la determinación de proteasas en cortes longitudinales de tallo de *Asclepias curarassavica* L. se procedió del siguiente modo:

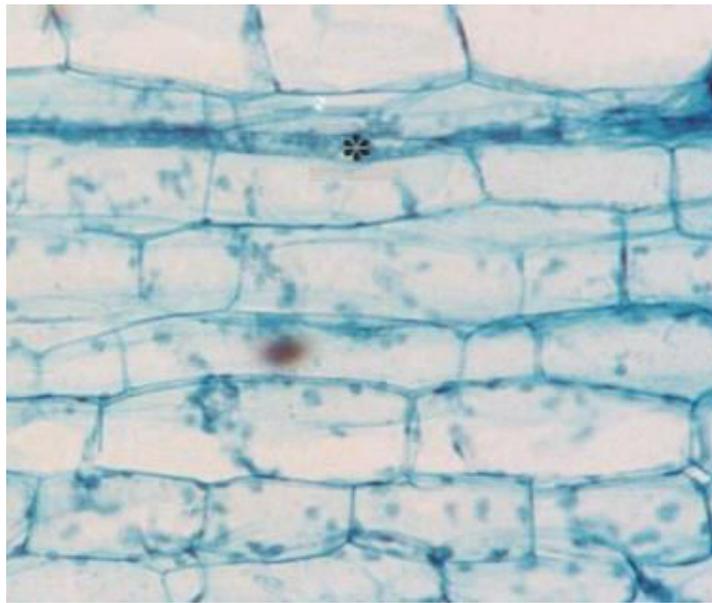
- ✓ Se cubrió un portaobjetos con una solución de gelatina al 5% llevada a 50 °C. La misma se dejó solidificar a temperatura ambiente y se guardó en cámara húmeda a 4°C durante una noche.
- ✓ Se trató durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla de alcohol 50° y formol al 40%, se lavó con agua destilada durante 20 minutos y se secó al aire.
- ✓ Se hidrató el gel con NH₄OH al 7% a temperatura ambiente y se secó con aire.
- ✓ Se ubicó la sección realizada con criostato sobre la capa de gelatina y se incubó en cámara húmeda a 37 °C durante 4 horas como mínimo. Se detuvo la reacción por inmersión del portaobjetos en una solución de formaldehído al 4%.
- ✓ Se enjuagó con agua desionizada durante 25 min.
- ✓ Se tiñó con azul de toluidina al 0,5% en buffer borato pH 10,0 a 4°C durante 30 minutos, se enjuagó, deshidrató y clarificó. Luego se montó en medio sintético (canadax, Biopur) y se observó con microscopio óptico.

- ✓ Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axyolab provisto de un equipo fotográfico MC 80 con película Kodak Gold 100-6.

A.4. Resultados y Discusión

La presencia de actividad proteolítica fue detectada en los laticíferos presentes en los tallos de *Asclepias curassavica* mediante ensayos histoquímicos *in situ*.

La técnica de Denker reveló la presencia de áreas claras con tonalidades celestes dadas por la actividad de las proteasas sobre la capa de gelatina coloreada por el azul de toluidina (figura 12 B). Dichas zonas permiten establecer una correlación con la estructura de las secciones de tejido nativo utilizado (figura 12 A). Estos resultados permiten corroborar la presencia de laticíferos no articulados, ramificados, característica observada en lo estudios anatómicos previos (Cortadi, 2001). Dichos laticíferos se extienden desde el floema hacia el parénquima cortical. Esta ubicación en el vegetal fundamentaría la hipótesis de que el látex actuaría como defensa para la planta frente al ataque de distintos herbívoros (Cortadi, 2001).

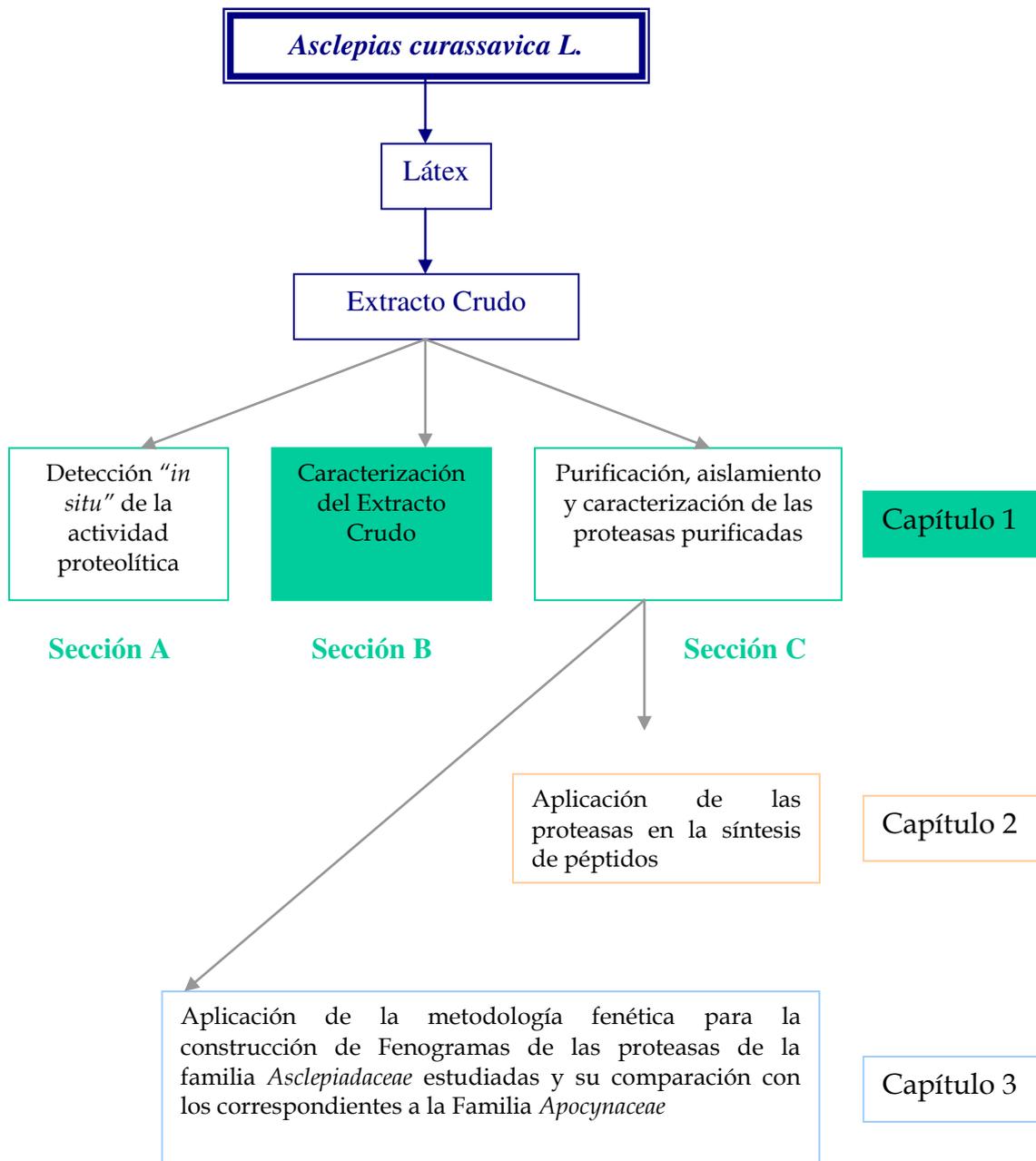


A



B

Fig. 12. Corte longitudinal de tallo de *Asclepias curassavica*. A. Corte teñido con hemalumbreosina. B. Impronta sobre la capa de gelatina (Método de Denker). * : Laticífero.



B. 3. Materiales y Métodos

B.3.1. Obtención del extracto crudo enzimático

Para la obtención del látex se realizaron incisiones superficiales de los pecíolos de las hojas de *Asclepias curassavica* L. lo que provocó la exudación de un látex "lechoso" y de características semilíquidas. El mismo fue colectado en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo 5 mM de EDTA y cisteína. El agregado de EDTA al medio fue necesario a fin de impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968). En el caso de cisteína, la misma se adicionó debido a que permite mantener el medio reductor evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas.

La suspensión obtenida primeramente fue centrifugada a $16,000 \times g$ por espacio de 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la finalidad de descartar gomas y otros materiales insolubles presentes. Luego, el sobrenadante fue ultracentrifugado a 100.000 g durante 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante resultante de la ultracentrifugación, contiendo las proteínas solubles, fue llamado "extracto crudo". El mismo fue fraccionado y conservado, congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien liofilizado, hasta el momento de ser procesado para estudios posteriores.

B.3.2. Determinación de la actividad proteolítica

B.3.2.1. Actividad caseinolítica

Se empleó caseína, tipo Hammarsten (Research Organics, Cleveland, OH, USA), como sustrato para la determinación de la actividad enzimática de las proteasas contenidas en el extracto crudo. La mezcla de reacción contenía 0,1 ml de extracto crudo y 1,1 ml de caseína con cisteína 12 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. La reacción se llevó a cabo en baño termostático a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se detuvo 20 min después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada tubo de ensayo fue centrifugado a $3.000 \times g$ durante 30 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm (Arribére *et al.*, 1998).

Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó unidad caseinolítica (U_{cas}). Dicha unidad caseinolítica expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo (Priolo *et al.*, 1991).

B.3.2.2. Actividad azocaseinolítica

Este sustrato se utilizó para reemplazar a la caseína en los ensayos de inhibición enzimática con el inhibidor 1-10 fenantrolina debido a que dicho inhibidor presenta un alto valor de absorbancia a 280 nm (ítem B.3.8.). De este modo, se tomaron 0,15 ml del extracto crudo (recolectado sin EDTA) y se le adicionó 0,25 ml de azocaseína al 1% (p/v) en buffer en 0,1 M Tris-HCl de pH 8,5 conteniendo 12 mM de cisteína. Esta mezcla de reacción fue incubada a 42 °C, durante 30 min y 60 min en un baño termostático. Luego de la incubación la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA al 10%. Inmediatamente se centrifugó a 4.000 x g durante 15 minutos y a 0,9 ml del sobrenadante obtenido se le añadió 1 ml de NaOH 1 M y se midió la absorbancia a 440 nm. En este caso, una unidad de actividad proteolítica (U_{azocas}) fue definida como la cantidad de enzima que producía un incremento en una unidad de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo (Trejo *et al.*, 2001).

B.3.3. Determinación del contenido de proteínas

Para establecer el contenido proteico del extracto crudo se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando seroalbúmina bovina como estándar. La determinación de proteínas por este método permite la valoración de proteínas en extractos vegetales que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica e interfieren con el clásico método de Lowry (Peterson, 1979). El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas, esta unión produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del

complejo colorante-proteína), por lo que las lecturas se realizan a esta última longitud de onda.

La composición del reactivo se indica en la siguiente Tabla:

<i>Reactivo de Bradford</i>	
Coomasie Brilliant Blue -G	100 mg
Etanol	50 ml
Acido fosfórico 85% p/v	100 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Tanto los ensayos como los respectivos blancos de reactivos se realizaron por triplicado. La concentración de proteínas de la muestra se determinó empleando una curva de calibración realizada empleando albúmina bovina (Sigma Chemical Co.) como patrón.

Según la cantidad de proteínas presentes en las muestras este método se puede realizar de dos maneras diferentes:

Macrométodo: Se mezclaron 50 μ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm.

El rango de detección de proteínas de este método es de 100-900 μ g de proteína/ml.

Micrométodo: Se mezclaron 250 μ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 10-100 μ g de proteína/ml.

B.3.4. pH óptimo

La actividad enzimática del extracto crudo fue medida a diferentes valores de pH (rango 6,0 y 10,0) sobre caseína preparadas en soluciones 25 mM conteniendo sales de sodio de concentración 0,01 M de los siguientes buffers de

"Good" MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (Good & Izawa, 1972). Estas soluciones buffers permiten mantener la fuerza iónica constante. No se utilizaron valores de pH inferiores a 6,0 debido a la muy escasa solubilidad de la caseína en esas condiciones. Para cada valor de pH se usó un blanco de reacción (control negativo) que fue preparado de la misma forma ya nombrada pero utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático.

B.3.5. Estabilidad al pH

Para medir la estabilidad al pH se precipitaron 2 ml de la preparación enzimática con 3 volúmenes de acetona. Posteriormente se centrifugó a 3.000 x g durante 20 min y el precipitado fue redisolto en el buffer de Good ajustado al pH 8,5. Luego se tomaron muestras de 0,1 ml de dicho precipitado y se incubaron a 20 °C durante 1, 2 y 3 h. Finalmente se determinó la actividad caseinolítica residual de las mismas según la metodología indicada previamente (condiciones estándar de reacción, ítem B.3.2.1.).

B.3.6. Estabilidad a la temperatura

Para establecer la estabilidad a la temperatura del extracto crudo se tomaron muestras de 0,1 ml y se incubaron a distintas temperaturas (40, 50, 60 y 70 °C) durante 30, 60, 90, y 120 min. La reacción se detuvo colocando las muestras en un baño de hielo y se midió la actividad caseinolítica residual bajo las condiciones estándar de reacción.

B.3.7. Estabilidad a la fuerza iónica

La habilidad del extracto crudo para retener la actividad del extracto crudo bajo condiciones crecientes de fuerza iónica fue testada colocando 0,1 ml del extracto en soluciones de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (rango 0,1-1,0 M) incubando durante 1 h en un baño termostático a 40 °C. Luego se determinó la actividad caseinolítica residual bajo las condiciones estándar de reacción.

B.3.8. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

Se probaron un conjunto de inhibidores de los distintos tipos de mecanismos catalíticos de las proteasas (Salvesen & Nagase, 2001) para establecer a cuál de ellos corresponde las proteasas del extracto crudo. Para ello se preincubaron muestras a 30 °C conteniendo 0,99 ml durante 30 y 60 min con 0,01 ml de los siguientes inhibidores 10 mM E-64, 100 mM PMSF and 100 mM de 1-10 fenantrolina. Se hicieron controles incubando el extracto crudo con los solventes de los distintos tipos de inhibidores a la misma concentración del ensayo de inhibición (Dunn, 2001). El control positivo se realizó incubando el extracto crudo sin los inhibidores al cual se le midió la actividad enzimática lo que correspondió al 100 % de actividad enzimática. Luego se determinó la actividad caseinolítica residual bajo las condiciones estándar de reacción.

B.3.9. Efecto de cisteína como activador sobre la actividad proteolítica

El efecto de la preincubación con cisteína (activador) sobre el extracto crudo se evaluó incubando alícuotas de dicho extracto frente a distintas concentraciones de cisteína: 10, 20, 30, y 40 mM durante 1 h a 0 °C. Simultáneamente se hicieron los controles negativos en las mismas condiciones del ensayo pero sin la presencia del activador. Luego se determinó la actividad caseinolítica residual bajo las condiciones estándar de reacción.

B.3.10. Determinación de los pI mediante Isoelectroenfoque (IEF)

El IEF se llevó a cabo en un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio-Rad). La muestra se precipitó con cinco volúmenes de acetona fría. Luego se centrifugó a 3.000 x g durante 15 min. El precipitado de esta centrifugación se redisolvió en agua desionizada dos veces.

Los geles de poliacrilamida fueron preparados utilizando la bandeja formadora de geles provista por el equipo mencionado. Para cada placa se usa una película plástica (Gel support film, Bio-Rad), cuya cara hidrofóbica se adhiere sobre un vidrio de sus mismas dimensiones y el conjunto se invierte sobre la bandeja, quedando la cara hidrofílica hacia abajo.

La obtención de los geles de poliacrilamida al 5% con un gradiente de pH en el rango de 3 a 10 se logra mezclando:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Acrilamida-bisacrilamida (25% T, 3%C)	2,0 ml
Glicerol (25% p/v)	2,0 ml
Anfolitos (Biolyte 3-10, Bio-Rad, Hercules, CA)	0,5 ml
Agua desionizada	5,5 ml

Luego de desgasificarla al vacío, se le añadieron a la solución los siguientes reactivos polimerizantes:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
TEMED	3,0 μ l
Persulfato de sodio al 10%	60 μ l
Solución saturada de riboflavina	60 μ l

La mezcla fue luego descargada con pipeta entre la cara hidrofílica de la película plástica y la bandeja formadora de geles, y el conjunto se dejó polimerizando en presencia de luz durante dos horas. Finalmente, los geles fueron removidos de la bandeja con ayuda de una espátula delgada.

La muestra y los marcadores de pI (Sigma IEF MIX 3,6-9,3) se sembraron con jeringa Hamilton en volúmenes comprendidos entre 1-5 μ l y se permitió que difundieran en el gel durante 5 minutos. Los electrodos de la celda de IEF fueron humedecidos con agua desionizada, los geles sembrados se apoyaron sobre los mismos, y la celda se tapó herméticamente. El enfoque de las proteasas presentes en el extracto crudo se realizó según las siguientes condiciones:

- ▶ 15 min a 100 V
- ▶ 15 min a 200 V
- ▶ 60 min a 450 V

Finalizada la corrida, uno de los geles fue fijado con la siguiente solución fijadora:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Ácido tricloroacético	12,5 g
Agua c. s. p.	100 ml

Después de la fijación, dicho gel fue teñido durante 2 h con solución colorante y posteriormente decolorados mediante sucesivos lavados en primer término con solución decolorante I, y finalmente con solución decolorante II, hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R 250	40 mg
Agua c. s. P.	100 ml

Esta solución debe filtrarse antes de usarse.

Solución decolorante I:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
Agua c. s. p.	100 ml

Solución decolorante II:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
Agua c. s. p.	100 ml

La estimación de los puntos isoelectricos (pI) se logró mediante la confección de una curva de calibración con los pI de las proteínas marcadoras patrones en función de la distancia recorrida por las especies proteicas de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

B.3.11. Detección de las proteasas mediante la técnica de Zimograma

Para detectar cuál de las bandas enfocadas tiene actividad proteolítica, el otro gel del IEF no fijado ni coloreado fue puesto inmediatamente en contacto, evitando la formación de burbujas, durante 20 min a 56 °C en cámara húmeda con un gel de agarosa embebido en caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 conteniendo cisteína 12 mM (Westergaard *et al.*, 1980). Después de la incubación, el gel de agarosa fue deshidratado y teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Las placas de agarosa se prepararon como sigue: sobre el lado hidrofílico de una película de Gel Bond (Pharmacia) se depositó una solución de agarosa al 1% en Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en la solución de caseína al 1% durante 20 min, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 min.

Luego de la incubación con el gel proveniente del IEF, se fijó durante 60 min con la siguiente solución fijadora:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Ácido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
Agua c. s. p.	100 ml

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa se deshidrató entre papeles de filtro Whatman 3MM aplicando una presión de 7,5 g/cm² por 20 min. Luego se secó con pistola de aire y finalmente fue sumergida durante 10-30 min en la solución colorante cuya composición se establece a continuación:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Coomassie Brilliant Blue	250 mg
Solución fijadora c. s. p.	100 ml

Esta solución debe filtrarse antes de ser usada.

El exceso de colorante se elimina por inmersión de la placa de agarosa en solución fijadora durante 10 min.

B.3.12. Determinación de la actividad endoesterolítica

La medida de la actividad endoesterolítica fue llevada a cabo usando como sustratos sintéticos los *N*- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres de distintos L aminoácidos según el método de Silverstein con algunas modificaciones (Silverstein, 1974). Estos sustratos sintéticos tienen el grupo α -NH₂ y el α -COOH bloqueados, estando este último unido con un grupo cromóforo que permite la determinación de la actividad endoesterásica relativa respecto del aminoácido que aporta el grupo carboxilo. Los sustratos utilizados fueron los *N*- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres) de los siguientes aminoácidos: Ala, Asn, Tyr, Gln, Lys y Ile. (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las concentraciones ensayadas estuvieron comprendidas entre 0,01 y 0,125 mM. Los ensayos se realizaron a 37 °C, midiendo la absorbancia a 405 nm cada 10 segundos durante 2 min en un espectrofotómetro Agilent 8453 E UV-visible (Palo Alto, CA) termostatzado. El buffer de reacción era Tris-HCl 0,1 M pH 9,0 con EDTA 2 mM y cisteína 10 mM. Una unidad enzimática arbitraria (U_{cbz}) se definió como la cantidad de proteasa que libera 1,0 μ mol de *p*-nitrofenolato por min en las condiciones del ensayo. Para determinar los μ moles de

p-nitrofenolato producidos durante la reacción, se realizó una curva estándar de *p*-nitrofenol (5-50 μ M).

Las determinaciones de actividad endoesterásica se realizaron según el siguiente protocolo:

- 1) Diluir la enzima con buffer Tris-ClH 0,1 M pH 8,0 conteniendo cisteína 1 mM y conservar en baño de hielo. La concentración de cisteína a usar se seleccionó en base a ensayos preliminares con blanco de reactivos, de modo que no actúe como catalizador de la reacción de hidrólisis (Ascenzi *et al.*, 1983).
- 2) Colocar en la cubeta en el siguiente orden:

<i>Blanco</i>	<i>Muestra</i>
100 μ l de buffer Tris-ClH 0,1 M pH 8,0 Cys 1 mM	100 μ l de enzima diluida
1,8 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9,0 con EDTA 2 mM y Cys 10 mM preincubado a 42 °C	1,8 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9,0 con EDTA 2 mM y Cys 10 mM preincubado a 42 °C
100 μ l de sustrato disuelto en acetonitrilo	100 μ l de sustrato disuelto en acetonitrilo
Mezclar por inversión, colocar la cubeta en el espectrofotómetro termostatzado a 42 °C	Mezclar por inversión, colocar la cubeta en el espectrofotómetro termostatzado a 42 °C

Cada ensayo se realizó por triplicado.

B.3.13. Actividad carboxipeptidasa

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica se añadieron 50 μ l del extracto crudo en una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 2 ml buffer de reacción (Tris-HCl 0,05 M NaCl 0,1 M pH 7,5) y 10ml de solución de sustrato [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] 10 mM disuelto en DMSO. La actividad fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm (la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja) durante 2 min.

B.3.14. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA)

Para este ensayo se utilizó el protocolo descrito en B.3.13. La actividad inhibitoria del extracto se manifiesta por una disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción que se corresponde con una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato.

Se siguieron dos procedimientos diferentes para poner en evidencia el tipo de inhibición:

► Sin preincubación del extracto y la enzima

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Cantidad</i>
Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M pH 7,5	2 ml
Solución de CPA bovina (Sigma) 10 mg/ml	7 µl
Solución de sustrato 10 mM	10 µl
Luego de 40" de iniciada la reacción	
Muestra a ensayar	50 µl

► Con preincubación del extracto y la enzima

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Cantidad</i>
Muestra a ensayar	50 µl
Solución de CPA bovina (Sigma) 10 mg/ml	7 µl
Incubar durante 6 min a 37 °C	
Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M pH 7,5	2 ml
Solución de sustrato 10 mM	10 µl

La reacción fue monitoreada por medidas continuas de absorbancia durante 6 min como se indica en B.3.13.

B. 4. Resultados y Discusión

B.4.1. Determinación de la actividad proteolítica

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas (mg/ml)</i>	<i>Actividad Caseinolítica UCAS/ml</i>	<i>Actividad Específica (UCAS/mg proteínas)</i>
Extracto Crudo	0,933	0,988	1,0586

Tabla 4: Proteínas y actividad específica del E.C.

B.4.2. pH óptimo

La actividad caseinolítica se determinó en el rango de pH 6,0 y 10,0 con el objetivo de conocer el comportamiento del mismo.

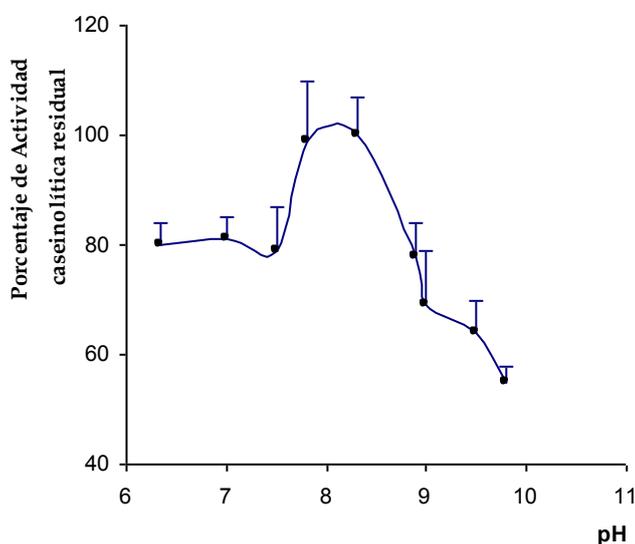


Fig. 13. Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica del E.C.

Como puede comprobarse en esta figura la preparación es activa en un amplio rango de pH con un máximo de actividad en el pH 8,5. Este comportamiento de máxima actividad a pHs alcalinos es semejante al de otras

proteasas ya estudiadas de la familia *Asclepiadaceae* (Cortadi, 2001; Trejo *et al.*, 2001; Arribére, *et al.*, 1998, 1999; Morcelle del Valle *et al.*, 2004 b, c).

B.4.3. Estabilidad al pH

La actividad caseinolítica se determinó al valor de su pH óptimo (8,5). Los resultados se muestran en la figura 14.

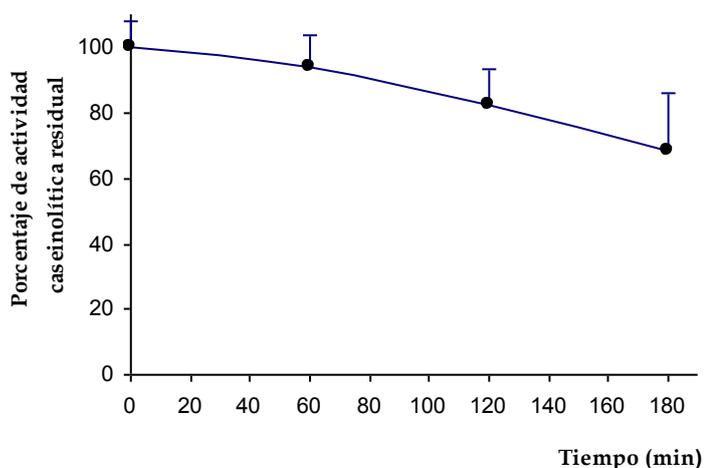


Fig. 14. Estabilidad del E.C. en su pH óptimo.

Como se observa en este gráfico la actividad proteolítica se mantiene inalterable cuando el extracto crudo fue incubado durante una hora a pH 8,5 y 37 °C . Al cabo de dos horas aún retiene el 82% y del mismo modo a las tres horas el 70% de la actividad residual.

B.4.4. Estabilidad a la temperatura

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre las enzimas del extracto crudo. Los resultados pueden verse en la figura 15.

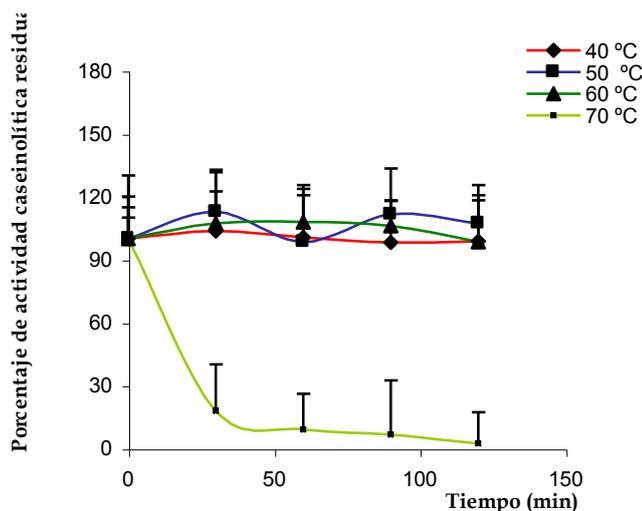


Fig. 15. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática del E.C.

En esta figura puede observarse que las enzimas presentes en el extracto crudo mantienen una significativa estabilidad. Luego de dos horas de incubación a 40, 50, y 60 °C la actividad proteolítica permanece prácticamente constante. Las enzimas se inactivan completamente por el calor a los 40 minutos a 70 °C. En general todas las enzimas de las especies que pertenecen a la familia *Asclepiadaceae* presentan alta estabilidad térmica aún a altas temperaturas (70 °C) (Morcelle del Valle, 2004 a).

Es oportuno aclarar que, para el caso de los extractos crudos correspondientes a los géneros *Morrenia* a 70°C de temperatura, la estabilidad fue del 45% para *M. brachystephana* (Arribére, et al., 1998) y 22% para *M. odorata* (Arribére et al., 1999).

B.4.5. Estabilidad a la fuerza iónica

La actividad caseinolítica residual se determinó luego que el extracto crudo estuvo incubado durante una hora en soluciones de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (rango 0,1-1,0 M). Los resultados son los que presenta la siguiente figura.

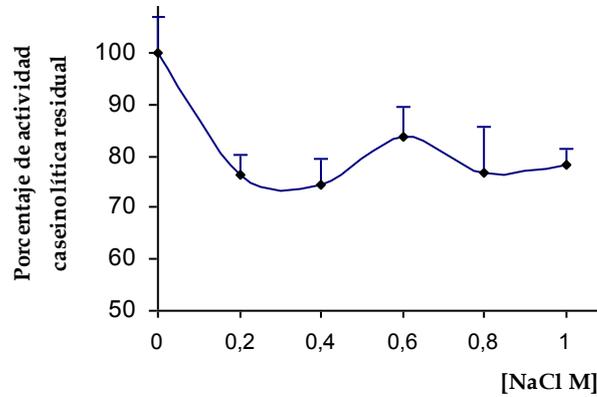


Fig. 16. Estabilidad del E.C. a la fuerza iónica.

De acuerdo a los resultados obtenidos se verifica que el extracto crudo mantuvo una estabilidad suficiente a valores de fuerza iónica moderadas. La actividad caseinolítica residual disminuyó sólo el 30% a una concentración de cloruro de sodio 1M.

Este comportamiento es similar a otras proteasas estudiadas en nuestro laboratorio (Brullo, 2003; Trejo *et al.*, 2001).

B.4.6. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

La figura 17 muestra los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición del extracto crudo sobre la actividad caseinolítica frente a los inhibidores E-64, PMSF y 1,10-10 mM de fenantrolina durante 30 y 60 minutos.

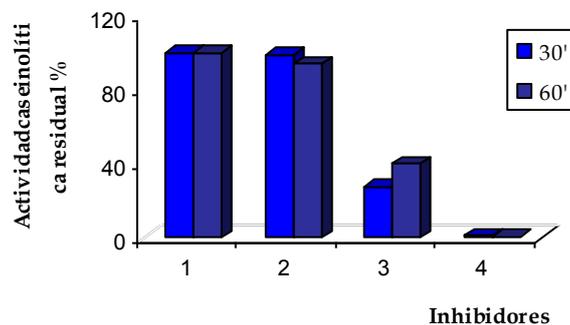


Fig.17. Efecto de los inhibidores sobre la actividad caseinolítica del E.C. **1:** E.C. + agua destilada; **2:** E.C. + 1-10 fenantrolina; **3:** E.C. + PMSF **4:** E.C. + E-64.

Los resultados revelan que el extracto crudo fue inmediatamente inhibido por E-64, un inhibidor irreversible de proteasas cisteínicas. El inhibidor PMSF durante 30 minutos disminuyó la actividad en un 28% del valor inicial, pero la inhibición fue parcialmente revertida en presencia de 100 mM de PMSF y cisteína 12 mM ya que es un inhibidor reversible. Con respecto al inhibidor 1-10 fenantrolina casi no tuvo efecto sobre la actividad debido a que es un inhibidor específico de las proteasas serínicas, aspárticas y metaloproteasas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos de otros extractos crudos de la familia *Asclepiadaceae* y con los de papaína sugeriría que las enzimas presentes en el extracto crudo de la especie en estudio pertenecerían a las peptidasas del tipo de la papaína (Barrett *et al.*, 2004 a; Morcelle del Valle, 2004 a; Trejo *et al.*, 2001; Arribére, *et al.*, 1998, 1999; Priolo *et al.*, 2000; Cortadi, 2001).

B.4.7. Efecto activador de la cisteína sobre la actividad proteolítica

El extracto crudo fue incubado con diferentes concentraciones de cisteína (10, 20, 30, y 40 mM). Los resultados pueden apreciarse en la figura 18.

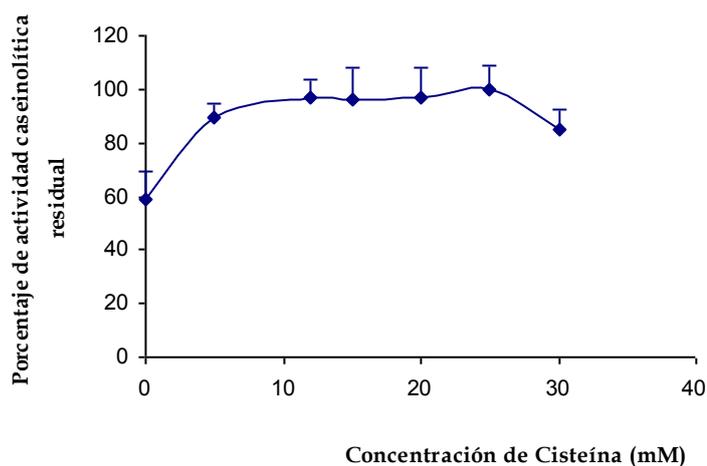


Fig. 18. Efecto de la concentración de cisteína sobre la actividad proteolítica del E.C.

Del análisis de los resultados se observa que la actividad caseinolítica aumenta considerablemente con el agregado de cisteína de concentraciones 12 mM y luego la actividad permanece casi constante con concentraciones crecientes del activador.

Este comportamiento es similar al registrado en otros extractos crudos de la familia *Asclepiadaceae* (Morcelle del Valle, 2004 a; Trejo *et al.*, 2001; Arribére, *et al.*, 1998, 1999; Priolo *et al.*, 2000; Cortadi, 2001; Brullo, 2003).

B.4.8. Isoelectroenfoque (IEF) y Zimograma

El isoelectroenfoque se realizó en el gel de poliacrilamida con un gradiente de pH comprendido entre 3,0 y 10,0. Los resultados del IEF sumados a los correspondientes al zimograma (figura 19) confirman que los pI de las proteasas presentes en el extracto crudo son mayores a 9,3.

Este valor de pI alcalino coincide con otras peptidasas de la misma familia (Morcelle del Valle, 2004 a; Trejo *et al.*, 2001; Arribére, *et al.*, 1998, 1999; Priolo *et al.*, 2000; Cortadi, 2001).

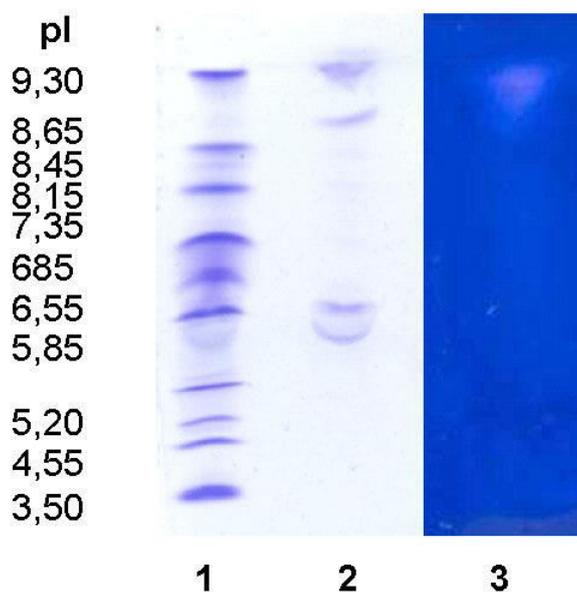


Fig. 19. IEF y Zimograma del E.C. de *Asclepias curassavica*. 1: patrones de pI
2: proteínas del E.C. 3: zimograma del E.C.

B.4.9. Determinación de la actividad endoesterolítica

Se determinaron las preferencias del E.C. por diversos sustratos sintéticos. En la figura 20 puede observarse que el extracto crudo de *Asclepias curassavica* posee mayor preferencia por el derivado de glutamina, seguido por alanina, asparagina, tirosina e isoleucina. La mayor afinidad que presentó por el derivado de glutamina es una característica que no comparte con la mayoría de las obtenidas por otros extractos crudos de la misma familia. En general estas enzimas demostraron poseer una alta afinidad por el derivado de alanina (Vairo Cavalli *et al.*, 2001, 2003, Trejo *et al.*, 2001). Sin embargo, es importante aclarar que en el presente ensayo el derivado de alanina ocupó el segundo lugar de preferencia. La baja afinidad que presentó por isoleucina se compara con resultados semejantes obtenidos para las peptidasas de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001).

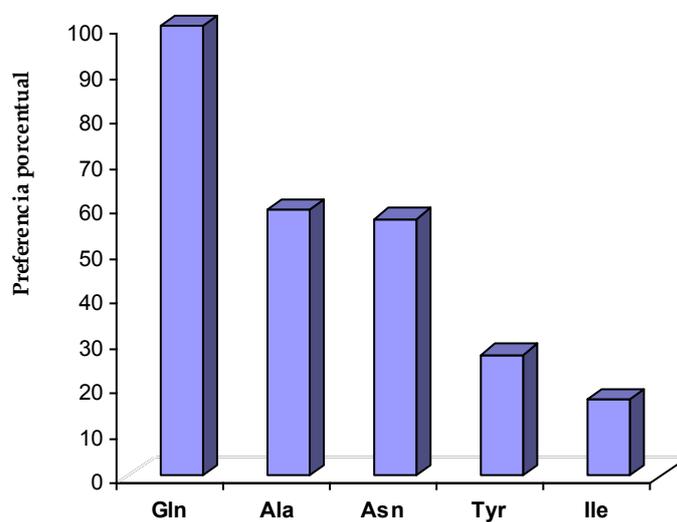


Fig. 20. Determinación de la preferencia del E.C. por los derivados de N-alfa-carbobenzoxy-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.

B.4.10. Actividad carboxipeptidasa del E.C.

La Actividad Carboxipeptidasa fue ensayada en el E.C. Esta experiencia demostró que el extracto crudo de *Asclepias curassavica* no tiene actividad carboxipeptidásica, como puede apreciarse en la figura 21.

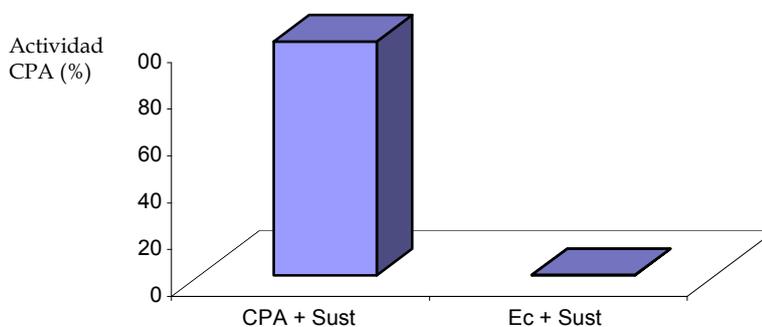


Fig. 21. Actividad carboxipeptidasa del E.C. de *Asclepias curassavica*.

B.4.11. Detección de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) en el E.C.

También la actividad inhibitoria de CPA fue ensayada sobre el E.C. Como es sabido la carboxipeptidasa A es una enzima que se caracteriza por ser una exopeptidasa, de tal modo que "corta" los extremos carboxilo de los péptidos y proteínas. En la figura 22 se observa que los componentes presentes en el extracto crudo inhiben a la CPA. En el caso de la inhibición directa la actividad enzimática residual fue de un 7%, mientras que el ensayo de inhibición con preincubación, la misma fue de 3%.

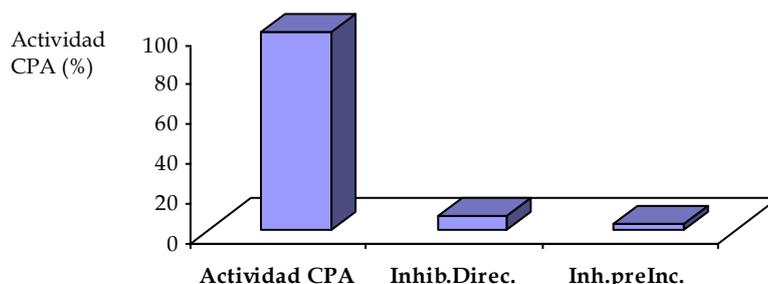
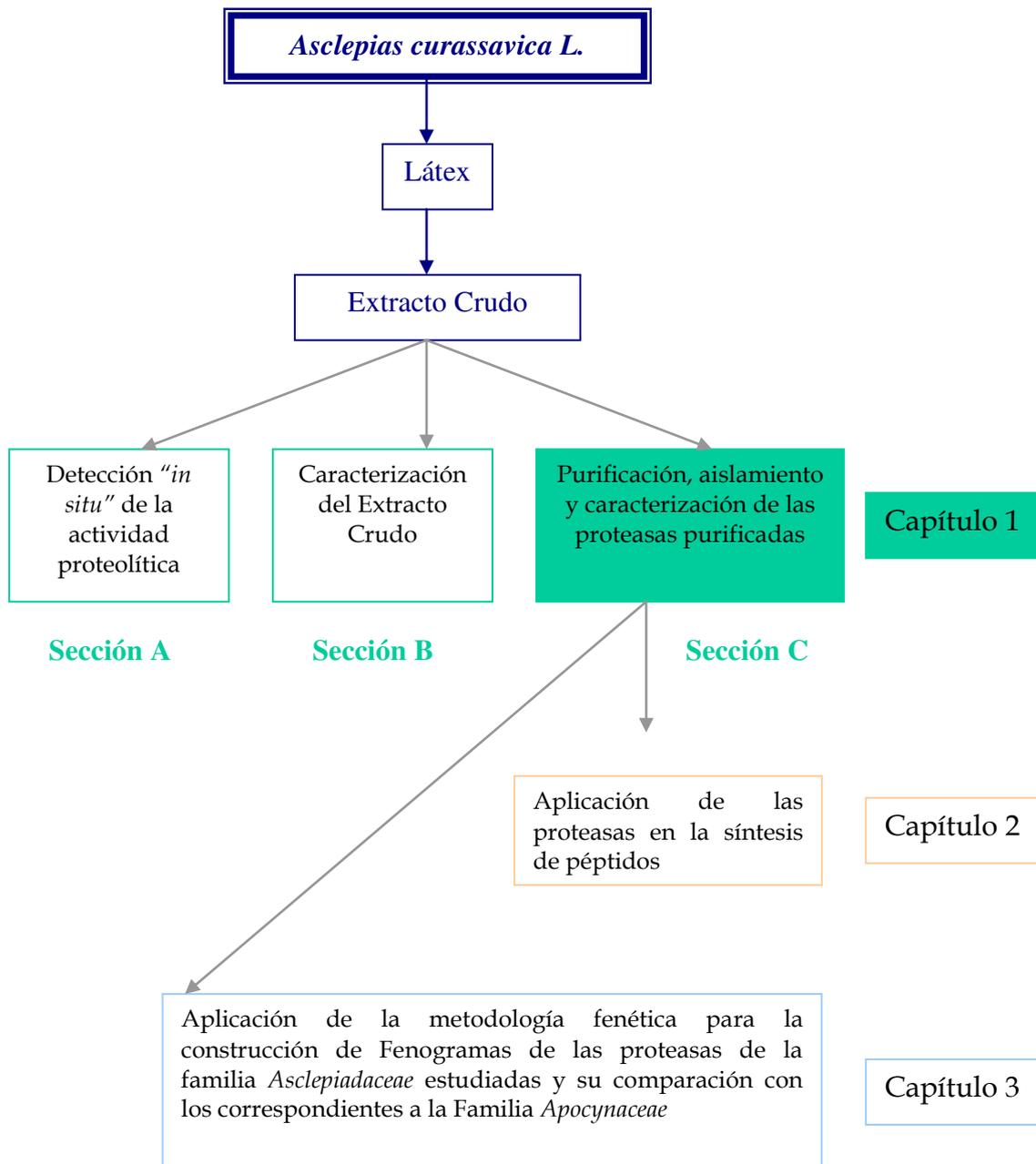


Fig. 22. Comparación del grado de inhibición del E.C. de *A. curassavica* frente a CPA.

Este comportamiento, fue semejante al obtenido con el extracto crudo de *Asclepias fruticosa* con valores de actividad residual de 12% y de 5%, respectivamente. En cuanto al extracto crudo de *Funastrum clausum*, la actividad residual resultó del 52% para la inhibición directa y del 4% para el ensayo con preincubación.



C. 3. Materiales y Métodos

C.3.1. Purificación cromatográfica. Cromatografía de intercambio iónico

Los resultados obtenidos por la técnica del IEF y de su respectivo zimograma reveló la presencia de fracciones con actividad proteolítica de naturaleza básica (figura 19). Esto llevó a diseñar una estrategia de purificación para separar la proteínas presentes en el E.C. utilizando una columna Pharmacia XK16 rellena con el intercambiador catiónico fuerte [SP (sulfopropil) Sepharose Fast Flow], equilibrada y lavada con buffer 0,05 M Tris-ClH; pH 8,25 conteniendo 5 mM de EDTA. Dicha cromatografía fue desarrollada en un equipo de FPLC (Pharmacia). Se sembró 1,5 ml del extracto crudo al que previamente se lo ultracentrifugó durante una h a 80.000 g. Seguidamente se inició la elución de las proteínas retenidas con un gradiente salino lineal de NaCl 0-0,6 M preparado en el buffer de partida. La velocidad de flujo fue de 0,75 ml/min.

Esta cromatografía fue monitoreada por absorbancia a 280 nm (proteínas eluidas) y por ensayo de actividad caseinolítica de cada fracción eluída siguiendo la metodología indicada en el punto B.3.2.1. Dichas fracciones fueron almacenadas a -20 °C para estudios posteriores.

C.3.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

A fin de corroborar la homogeneidad de las proteasas purificadas y de estimar sus masas moleculares, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en medio desnaturizante (SDS) con tricina, de acuerdo a la técnica de Shägger & Von Jagow (1987).

C.3.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras a ser sometidas a SDS-PAGE se prepararon en tubos eppendorf mediante precipitación con cinco volúmenes de acetona fría, redisolviendo luego el precipitado en buffer de muestra sin β -mercaptoetanol y con SDS conteniendo iodoacetato de sodio (50 mM) a fin de evitar la autodigestión y llevando a ebullición (5 min). Luego se les adicionó β -mercaptoetanol y se las calentó nuevamente durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 5.000×g durante 5 min en una centrifuga Hermle Z 323 K utilizando un rotor 22087 V01.

El *Buffer de muestra* se preparó de la siguiente manera:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Tris	787,4mg (0,0625M)
SDS	2,0g (2%)
β mercaptoetanol	5,0ml (5%)
Glicerol	8,0ml (10%)
Azul de bromofenol	6,0 mg (0,006%)
Llevar a pH 6,8 con HCl 1N	
Agua destilada	100 ml

El buffer de muestra se debe filtrar antes de usar y conservar en heladera.

C.3.2.2. Preparación de los geles

Los geles se prepararon utilizando como soporte el que provee a tal fin el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). En primer término se colocó la solución de poliacrilamida para la preparación del gel de resolución (3,2 ml) y luego de la polimerización del mismo se agregaron 1,16 ml de la solución con la que se prepara el gel de apilado (*stacking*). Luego de adicionar esta última se coloca el peine a fin de obtener diez calles o cavidades, en las que se siembran las muestras. La composición de las soluciones necesarias para la preparación

de ambos geles se describe a continuación. Las cantidades indicadas alcanzan para la preparación de dos geles.

Solución de poliacrilamida al 10%

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	4 ml
Gel buffer (Tris-HCl 3 M - pH 8,45 - 0,3 % SDS)	4 ml
TEMED	10 µl
Persulfato de sodio al 10%	100 µl
Agua destilada	3,7 ml

Solución de "stacking" al 5%

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	1,32 ml
Gel buffer	2,48 ml
TEMED	12 µl
Persulfato de amonio al 10%	0,12 ml
Agua destilada	6,2 ml

C.3.2.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las siembras de las muestras se realizaron bajo buffer con jeringa Hamilton. Los volúmenes sembrados fueron de 5 µl para los patrones de peso molecular y de 5-10 µl para las muestras. Las electroforesis se desarrollaron en un equipo vertical, Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad), manteniendo la corriente a 40 V durante el pasaje de las proteínas por el gel de stacking y a 150 V hasta que el colorante azul de bromofenol, utilizado como marcador, llegue al final del gel de resolución. Las composiciones del buffer anódico y catódico empleados fueron las siguientes:

Buffer anódico (Tris-HCl 0,2 M de pH 8,9)

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Tris	24,228 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Llevar a pH con HCl.

Buffer catódico (Tris-HCl 0,1 M de pH 8,25-Tricina 0,1 M-SDS 0,1%)

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Tris	12,11 g
Tricina	17,92 g
SDS	1 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Llevar a pH con HCl.

C.3.2.4. Fijación y coloración con Coomassie Blue

Luego de finalizada la corrida electroforética, los geles se sumergieron durante 12 h en la solución colorante, la que además actúa como fijadora, y seguidamente fueron sometidos a sucesivos lavados con solución decolorante hasta obtener un fondo incoloro.

Solución colorante

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,5 g (0,1%)
Metanol	125 ml (25 %)
Acido acético glacial	50 ml (25 %)
Agua destilada c.s.p.	500 ml

Esta solución colorante debe ser filtrada con anterioridad a su uso.

Solución decolorante

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Metanol	125 ml (25%)
Ácido acético	50 ml (10%)
Agua destilada c.s.p.	500 ml

C.3.2.5. Estimación de las masas moleculares

Con el fin de estimar las masas moleculares se sembró en todos los geles una mezcla de proteínas de masas moleculares comprendidas entre 14,4 kDa y 97,4 kDa (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad). Los geles fueron escaneados y las masas moleculares relativas se estimaron mediante el uso de la correspondiente curva de calibración mediante el empleo del software Scion Image (Scion Corporation, <http://www.scioncorp.com>).

C.3.3. Isoelectroenfoque y Zimograma

El pI de las fracciones purificadas se obtuvo a través de un IEF utilizando la misma metodología indicada en el punto B.3.10. seguida de un zimograma tal como se indicó en el ítem B.3.11.

C.3.4. Tinción con plata

Para visualizar pequeñas cantidades de proteínas (del orden de los ng) en geles de poliacrilamida en algunas oportunidades durante el presente trabajo, se utilizó la técnica de tinción con plata de Blum *et al.*, (1987). Para ello se procedió como sigue:

- 1 Fijar con 100 ml de solución fijadora durante 1 h. Si es posible, dejarlo toda una noche para pervenir la difusión de las proteínas, remover sustancias interferentes y obtener geles con menor *background*. Se puede mantener el gel por varios días en esa solución.
- 2 Lavar 3 veces (20 min cada una) con solución de lavado 1 para remover el ácido acético cuya acidez interferiría con el $S_2O_3^{-2}$ del paso 3.
El primer y el segundo paso se obvian en caso de coloración previa.
- 3 Pretratar con solución de pretratamiento 1 min exacto.
- 4 Lavar 3 veces con agua desionizada durante 20 s cada vez para remover el exceso de $S_2O_3^{-2}$ que podría generar *background* por combinación con el Ag_2S .

- 5 Tratar 20 min con solución de plata. El formaldehído de esta solución, además de servir como entrecruzador, aumenta la sensibilidad y el contraste sin aumento del background.
- 6 Lavar con agua bidestilada dos veces durante 20 s cada una para remover el AgNO_3 en exceso, el cual podría consumir el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ del paso 7 demasiado rápidamente.
- 7 Sumergir el gel en solución de desarrollo hasta que no aparezcan más bandas, evitando que se pase la coloración (un precipitado marrón aparece cuando el gel se pone en contacto con el desarrollador por consumo de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ libre y desaparece rápida y completamente por agitación; si así no ocurriese, la solución se cambia por desarrollador fresco). La velocidad del revelado depende del tipo y concentración de las proteínas; entre 30 s (banda de 500 ng) y 2 min (bandas de 50 ng).
- 8 Detener la reacción con solución de *stopping* durante 10 min.
- 9 Sumergir el gel en metanol 30% durante 30 min.

Composición de las soluciones

Solución Fijadora:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Metanol	50 ml
Ácido acético glacial	12 ml
Formaldehído al 37%	50 μl
Agua c. s. p.	100 ml

Solución de lavado 1

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Etanol	30 ml
Agua c. s. p.	100 ml

Solución de pretratamiento:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
S ₂ O ₃ Na ₂ ·5 H ₂ O	0,03 g
Agua desionizada	150 ml

Solución de plata:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
AgNO ₃	0,2 g
Formaldehído al 37%	75 µl
Agua desionizada c. s. p.	100 ml

Solución desarrolladora:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Na ₂ CO ₃	6 g
Solución de tiosulfato de sodio	1 ml
Formaldehído	50 µl
Agua desionizada c. s. p.	100 ml

Solución de stopping:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad</i>
Metanol	10 ml
Ácido acético glacial	12 ml
Agua desionizada c. s. p.	100 ml

C.3.5. pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de las fracciones purificadas se utilizó la misma metodología empleada en el punto B.3.4. utilizando buffers de "Good" preparados en el rango de pH 6,0-10,5 y a 41 °C.

C.3.6. Estabilidad al pH

Para medir la estabilidad al pH, se precipitaron 2 ml de las fracciones purificadas con 5 volúmenes de acetona. Las muestras se mantuvieron en freezer durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 x g durante 20 min y los precipitados fueron redissueltos en el buffer de Good ajustado a pH 8,0 para una de las fracciones y a pH 10,0 para la otra fracción. Luego se tomaron muestras de 0,1 ml de cada precipitado y se incubaron a 20 °C durante 1, 2 y 3 h. Finalmente se determinó la actividad caseinolítica residual de las mismas según la metodología indicada previamente (condiciones estándar de reacción, B.3.2.1.).

C.3.7. Estabilidad a la temperatura

Con el objeto de ensayar la estabilidad a la temperatura de las fracciones purificadas (asclepaína c I y asclepaína c II) se empleó la misma metodología indicada en el inciso B.3.6.

C.3.8. Medida de la actividad esterolítica utilizando los sustratos sintéticos

N- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres de aminoácidos

La determinación de este ensayo con las fracciones purificadas de *Asclepias curassavica* se realizó siguiendo la misma metodología que en el punto B.3.12., pero en este caso se ensayó sobre los sustratos *N*- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres de los siguientes aminoácidos: Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Trp, Pro y Val. Los datos se expresaron en U_{cbz} previamente definidas en el punto antes mencionado y su correspondiente porcentaje de preferencia.

C.3.9. Medida de la actividad amidolítica utilizando pFLNA

Dicha actividad, en las fracciones purificadas de *Asclepias curassavica*, se determinó por la hidrólisis del pFLNA siguiendo el método de Filippova *et al.*, (1984). Las velocidades iniciales de actividad amidolítica se llevaron a cabo por medición espectrofotométrica a 410 nm a pH 6,5 a 37 °C utilizando buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,5, conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM. Las concentraciones de sustrato estuvieron comprendidas entre 0,1 mM y 0,5 mM en la mezcla de reacción. Se utilizaron soluciones stock de pFLNA disuelto en DMSO. La actividad amidolítica se expresó en una unidad enzimática arbitraria (U_{pFLNA}), definida como la cantidad de peptidasa que libera 1 μ mol de *p*-nitroanilina.

El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: a 0,12 ml de solución de las fracciones purificadas se le añadieron 1,5 ml del buffer fosfatos. Finalmente, se agregaron 0,18 ml de la dilución correspondiente de sustrato, se agitó por inversión y se monitoreó a 410 nm cada 5 s durante 2 min.

C.3.10. Estudios cinéticos

C.3.10.1. Determinación de los parámetros K_m , V_m , k_{cat} y K_{cat}/K_m

El cálculo de dichos parámetros para las fracciones purificadas del látex de *Asclepias curassavica* se realizó con dos sustratos sintéticos seleccionados a tal fin. El derivado *p*-nitrofenilado de *N*- α -Cbz-Gln fue elegido por ser el preferido por el extracto crudo (ver B.3.12.), así como el pFLNA fue considerado un sustrato interesante, ya que se demostró que es específico para proteasas cisteínicas del tipo de la papaína (Filippova *et al.*, 1984).

C.3.10.1.1. Obtención de los parámetros cinéticos empleando *N*- α -Cbz-L-Gln *p*-nitrofeniléster como sustrato

Estos parámetros se obtuvieron según la técnica desarrollada en el punto B.3.12. En este caso en particular las concentraciones de los sustratos *N*- α -Cbz-L-Gln *p*-nitrofenil éster ensayadas estuvieron comprendidas entre 0,00125 y 0,02 mM.

Una vez conocidas las velocidades iniciales se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} , V_m , K_m y K_{cat}/K_m mediante el uso de una regresión hiperbólica (Sigma Plot) correspondiente al modelo enzimático de Michaelis-Menten.

C.3.10.1.2. Obtención de los parámetros cinéticos empleando *p*FLNA como sustrato

Este ensayo se realizó con la misma metodología empleada en el punto C.3.9. Las concentraciones de *p*FLNA ensayadas estuvieron comprendidas en el rango de 0,1 mM y 0,5 mM en la mezcla de reacción.

Los parámetros cinéticos k_{cat} , V_m , K_m y K_{cat}/K_m se calcularon una vez conocidas las velocidades iniciales, mediante las regresiones lineales de las ecuaciones de Lineweaver-Burk, Wolff-Hanes & Eadie-Hofstee.

C.3.11. Titulación del sitio activo

El ensayo consistió en preincubar alícuotas de las enzimas purificadas en presencia de concentraciones variables de E-64 (0-5 μ M) a 37°C durante 30 minutos y medir posteriormente la actividad caseinolítica residual. De esta manera se halló la concentración mínima de E-64 capaz de inhibir totalmente a la preparación. Este inhibidor de proteasas cisteínicas se une de manera irreversible a la cisteína del sitio activo en forma equimolecular. A continuación se calculó el porcentaje de enzima activa en la muestra.

C.3.12. Espectrometría de masas

El peso molecular de las fracciones purificadas y la determinación de sus grados de pureza fueron determinados por espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*). Volúmenes iguales de solución proteica y de solución matriz [solución saturada de ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) en ácido trifluoroacético 0,1% en agua/acetoneitrilo 2:1] fueron mezclados; 1 μ l de dicha mezcla se ubicó en una placa de siembra de acero inoxidable y se dejó secar al

aire. El espectro de masa se realizó en un MALDI-TOF MS Bruker Daltonics® modelo Ultraflex (Billerica, MA), equipado con un láser de N₂ (337 nm), en el modo lineal positivo, a un voltaje de aceleración de 25 kV. La muestra es bombardeada con pulsos de láser de corta duración (1-10 ns). La matriz exhibe una fuerte absorción a esa longitud de onda, de manera que la interacción con los pulsos del láser causa la desorción e ionización de la matriz y de las moléculas de proteína. Los iones son sometidos a la acción de un campo eléctrico de gran magnitud por aplicación de un alto potencial (25-30 kV). Los iones acelerados entran en un tubo de vuelo (200 cm), libre de campo eléctrico, donde viajan con una velocidad que es proporcional a la relación m/z. Un detector ubicado al final del tubo produce una señal para cada paquete de iones que lo alcanzan. Para la calibración interna se empleó tripsinógeno bovino.

C.3.13. Secuenciamiento de los aminoácidos de la porción N-terminal de las fracciones purificadas

Una muestra liofilizada de cada una de las fracciones purificadas se desaló mediante resuspensión en ácido trifluoroacético al 0,1%, inmovilización en una membrana de PVDF en un dispositivo de centrifugación (MILLIPORE, Billerica, MA) y lavado exhaustivo con agua. La secuencia N-terminal se realizó por degradación de Edman automática en un secuenciador de proteínas Beckman LF3000 (Beckman, Alemania) equipado con un analizador de PTH-aminoácidos. En el procedimiento de Edman, el feniltioisocianato reacciona cuantitativamente con el grupo amino libre de la proteína y rinde el correspondiente péptido feniltiocarbamilado. Por tratamiento con ácido anhídrico (trifluoroacético), el resto N-terminal se separa en forma de aminoácido feniltiocarbamilado, dejando intacto el resto de la cadena polipeptídica. El aminoácido feniltiocarbamilado en ácido diluido sufre una isomerización, con lo que se transforma en el correspondiente derivado de la feniltiohidantoína (PTH), que es separado e identificado

cuantitativamente por el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) dispuesto en línea con el secuenciador.

Los siguientes servicios disponibles en la red, PSI BLAST 2.1 (Altschul *et al.*, 1997; Schaffer, 1999; [http: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) y BLAST 2 (Tatusova & Madden, 1999 <http://embnet.cifn.unam.mx/blast/wblast2.html>) fueron empleados para llevar a cabo los estudios de homología de proteínas, por comparación con aquellas presentes en la base de datos Swiss Prot y las secuencias N-terminales de aquellas proteasas purificadas en nuestro laboratorio.

C.3.14. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) de la fracción no retenida (Nr) del E.C.

Debido a los resultados positivos obtenidos precedentemente de la actividad inhibitoria de la carboxipeptidasa A del E.C. (ítem B.4.11.), se decidió ensayar esta actividad en la fracción no retenida del extracto crudo eluída en la cromatografía de intercambio catiónica utilizando la misma metodología (ver B.3.14.).

C. 4. Resultados y Discusión

C.4.1. Purificación cromatográfica. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow permitió la separación de tres fracciones (figura 23). Para comprobar cuál de ellas presentaba actividad proteásica se empleó caseína al 1% como sustrato en las condiciones ya mencionadas. La primera de las fracciones como así también la fracción no retenida (Nr) no evidenciaron actividad caseinolítica. Las dos fracciones siguientes eluidas con el gradiente salino poseían actividad proteolítica y fueron denominadas *asclepaína c I* y *asclepaína c II*, según la nomenclatura recomendada para proteasas obtenidas de látex de especies de la familia *Asclepiadaceae* (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991). La medida de la actividad caseinolítica evidenció que *asclepaína c I* fue la fracción con mayor actividad proteolítica en relación con la correspondiente a *asclepaína c II*.

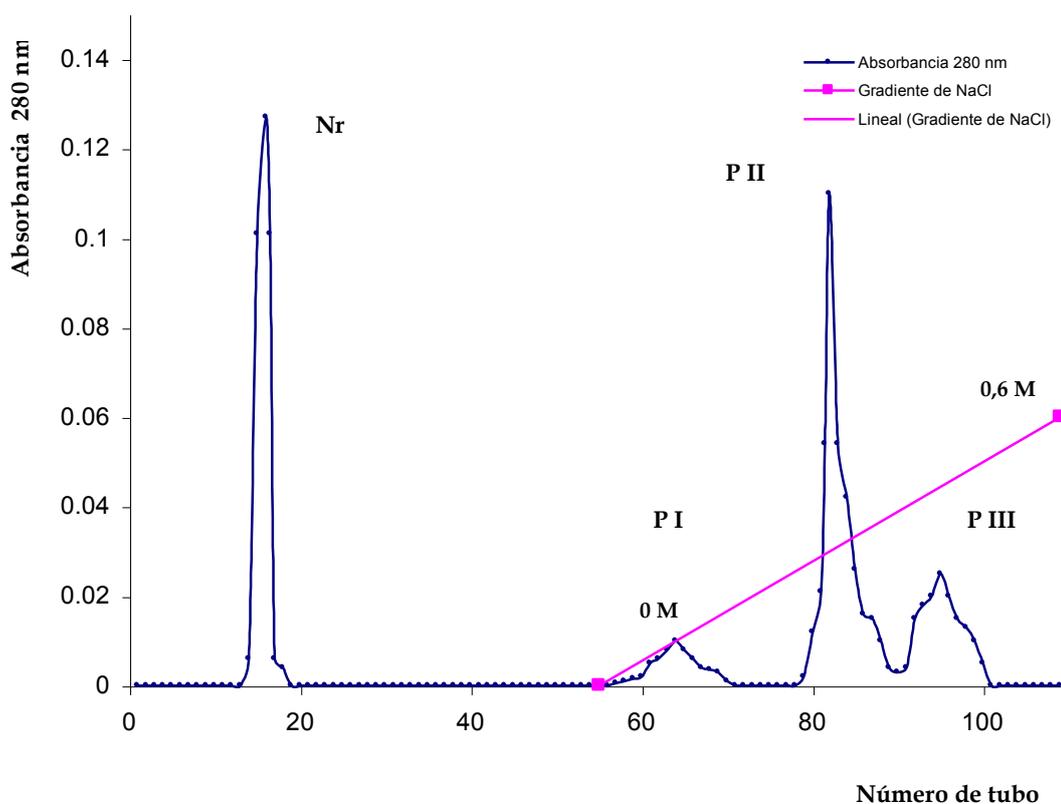


Fig.23. Cromatografía de intercambio catiónico. **Nr.** Fracción no retenida. **PI.** Fracción sin actividad proteolítica. **P II.** *asclepaína c I*. **P III.** *asclepaína c II*.

C.4.2. Esquema de purificación

El esquema de purificación (Tabla 5) muestra que asclepaína c I fue la principal fracción proteolítica purificada con un rendimiento del 26,80 % siendo la actividad específica de 10,887 UCAS/mg y el grado de purificación de 10,27. Por su parte asclepaína c II mostró un rendimiento de 9,80 %, una actividad específica de 12,836 UCAS/mg de proteínas y un grado de purificación de 12,125.

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas (mg/ml)</i>	<i>Actividad Casinolítica UCAS/ml</i>	<i>Actividad específica (UCAS/mg)</i>	<i>Veces de Purificación</i>	<i>Rendimiento</i>
Extracto Crudo	0,9333	0,988	1,05866	1	100
Asclepaína c I	0,0243	0,2649	10,877	10,27	26,80
Asclepaína c II	0,0075	0,0968	12,836	12,125	9,80

Tabla 5. Tabla de purificación.

C.4.3. Determinación de la homogeneidad de asclepaína c I y asclepaína c II: electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

Los resultados que se observan en las figuras 24 y 25 demostraron la homogeneidad de las fracciones proteolíticas purificadas.

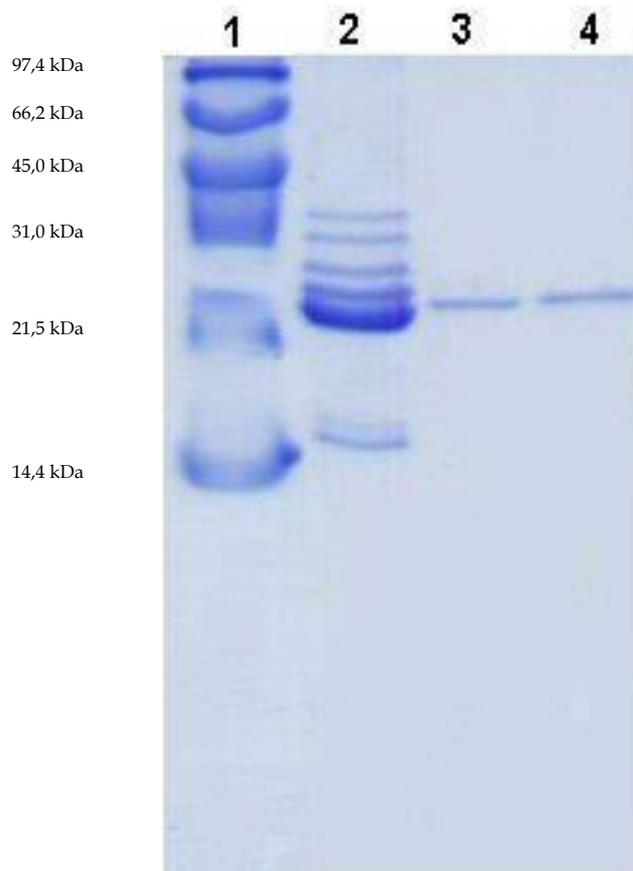


Fig. 24.. SDS-PAGE (Tinción Coomasie Blue)
1. Patrones de Peso Molecular 2. E.C.
3. asclepaína c I. 4. asclepaína c II

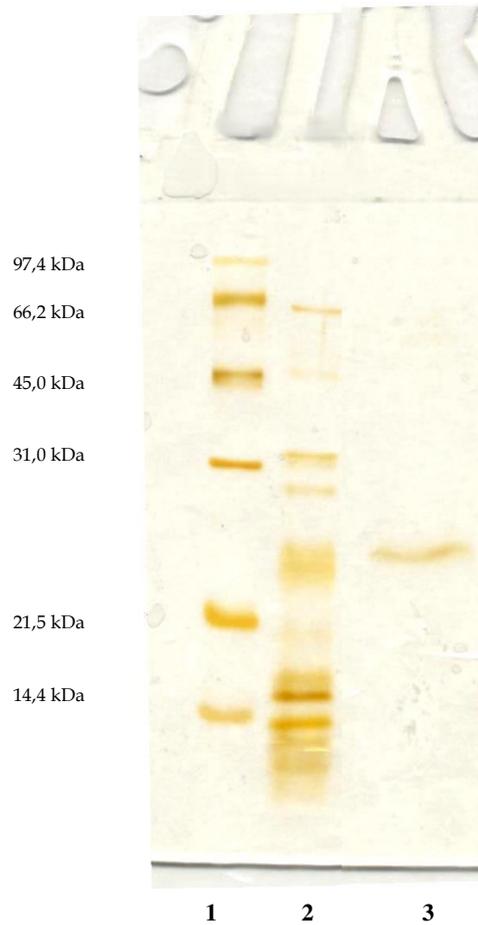


Fig. 25. SDS-PAGE (Tinción de Plata) 1. Patrones de P.M.
2. Extracto crudo. 3. asclepaína c I

C.4.4. Estimación de las masas moleculares

Las masas moleculares relativas obtenidas mediante SDS PAGE para las dos proteasas purificadas fueron de 23,1 kDa para asclepaína c I y 23,5 kDa para asclepaína c II. La aparición de una sola banda manifiesta que las enzimas son monoméricas. Estos resultados son similares a los obtenidos con otras especies del género *Asclepias*, como *Asclepias syriaca* que presenta proteasas de M_r 21.000 Da y 23.000 Da (Brockbank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980); *Asclepias glaucescens* con una proteasa de M_r 23.000 Da (Barragán *et al.*,

1985; Tablero *et al.*, 1991) y *Asclepias fruticosa* cuya proteasa posee una M_r de 23.652 Da (Trejo *et al.*, 2001). Estos datos, a su vez, son muy semejantes a los obtenidos para otras proteasas de la misma familia y que se encuentran en el rango de 20 a 35 kDa (Vairo Cavalli *et al.*, 2003; Morcelle del Valle, 2004a; Priolo *et al.*, 2000).

C.4.5. Isoelectroenfoque y Zimograma

Como puede observarse en la figura 26 tanto asclepaína c I como asclepaína c II presentan pI alcalinos (mayores de 9,3). Esto se corrobora con el zimograma en el cual se refleja la actividad proteolítica en el rango de los pI alcalinos. Esto significa que estas proteasas estarán cargadas negativamente a valores de pH muy elevados, mientras que a pH neutro la carga neta de las mismas será positiva. Estos valores de pI también son coincidentes con los correspondientes a otras proteasas de la misma familia (Trejo *et al.*, 2001; Morcelle del Valle, 2004a; Priolo *et al.*, 2000).

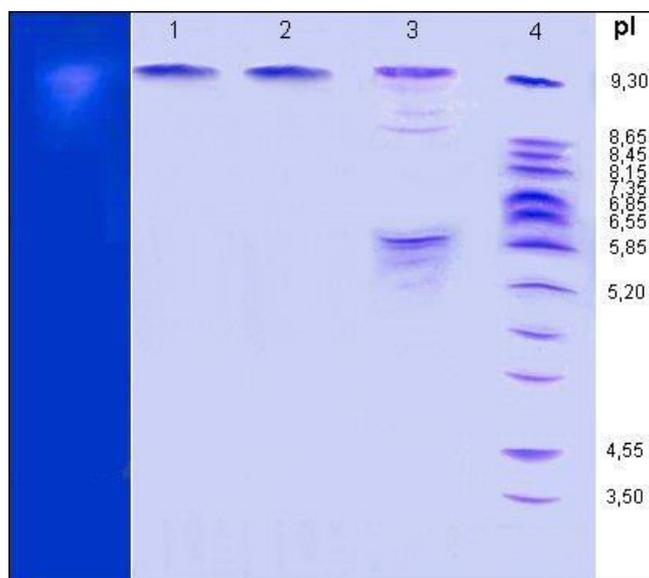


Fig. 26. IEF y Zimograma. 1. asclepaína c II 2. asclepaína c I
3. E.C. 4. Patrones de IEF (3-10).

C.4.6. pH óptimo de asclepaína c I y asclepaína c II

En la figura 27 puede apreciarse la actividad caseinolítica en función del pH para asclepaína c I como la correspondiente a asclepaína c II.

Para el primer caso el valor de pH óptimo está comprendido entre 8,0 y 8,5. En tanto que, asclepaína c II muestra dos picos de máxima actividad proteolítica, uno a pH 8,0 y otro a pH 10,0. El valor del primero de estos pH es coincidente con los del extracto crudo de *Asclepias curassavica* y el de asclepaína c I. El segundo valor es semejante al encontrado en funastraína c II (Morcelle *et al.*, 2004 b). Como en los resultados anteriores de los ensayos de caracterización de las proteasas, la mayor actividad proteolítica se manifiesta a valores de pH alcalinos (Trejo *et al.*, 2001; Morcelle del Valle *et al.*, 2004 b; Priolo *et al.*, 2000).

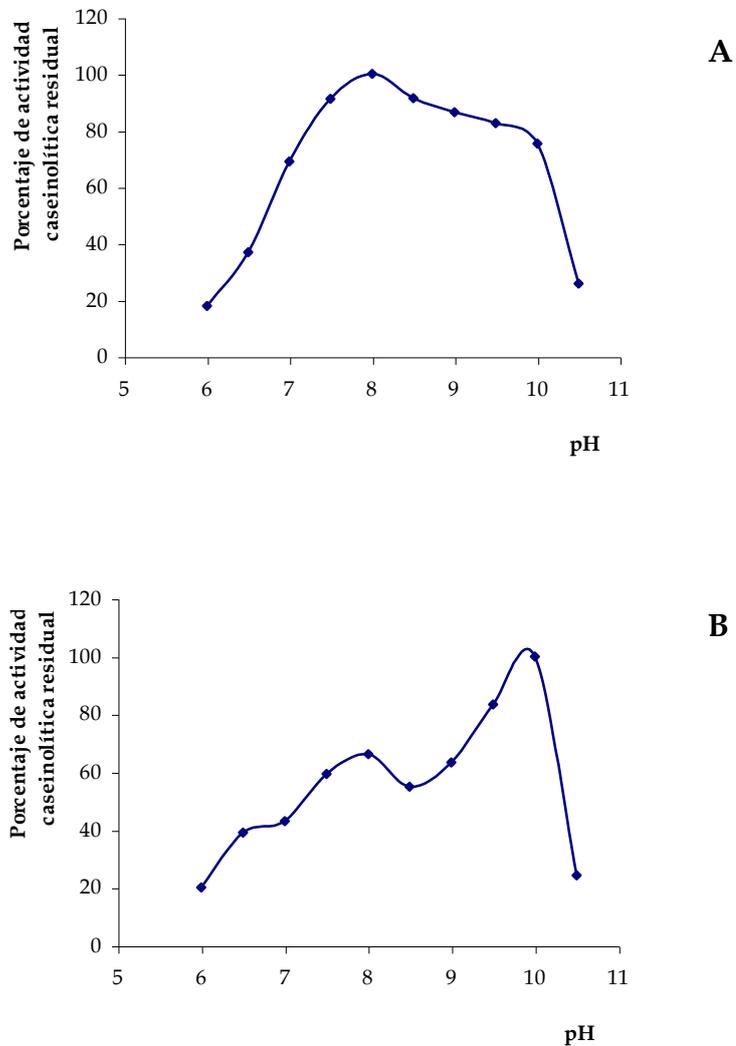


Fig. 27. pH óptimo. A. asclepaína c I. B. asclepaína c II.

C.4.7. Estabilidad al pH

Los resultados de la estabilidad al pH de asclepaína c I y asclepaína c II pueden observarse en la figura 28. Ambas proteasas exhiben una alta estabilidad a los valores de pH óptimo durante los primeros 60 minutos. Luego dicha estabilidad disminuye paulatinamente hasta los 120 minutos de incubación reteniendo el 50% de actividad asclepaína c I y el 60% asclepaína c II. Estos valores permanecen casi inalterables al cabo de 180 minutos de incubación.

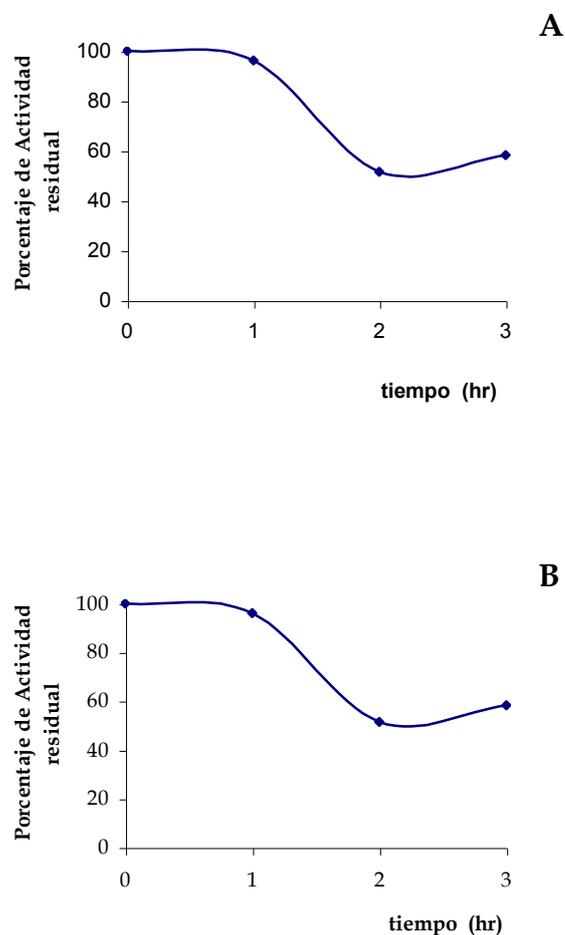


Fig. 28. Estabilidad al pH. A. Asclepaína c I. B. Asclepaína c II.

C.4.8. Estabilidad a la temperatura de asclepaína c I y asclepaína c II

Los resultados de dicha estabilidad se muestran en la figura 29. En estos gráficos se comprueba que asclepaína c I se comporta de manera similar al E.C. corroborando así su protagonismo en ser la fracción mayoritaria y la de mayor actividad proteolítica. Presenta gran termoestabilidad a temperaturas de 50 y 60 °C al cabo de 2 horas de incubación. Tanto a 60 como a 70 °C se inactiva a los 120 minutos Sin embargo a 60 °C retiene el 40% de actividad proteolítica a los 30 minutos y a los 60 minutos sólo se queda con el 10%. Mientras que a 70 °C la disminución de la actividad proteolítica va disminuyendo paulatinamente hasta inactivarse por completo a los 120 minutos. En cambio asclepaína c II pierde su termoestabilidad a los 50 °C reteniendo sólo el 40% de su actividad a los 90 minutos, quedando con el 30% de actividad al término de las dos horas de incubación. A temperaturas de 60 y 70 °C la pérdida de actividad es muy notable. Este comportamiento, de ser bastante estables a temperaturas moderadas y volverse inestables a 70 °C, es una característica común a otras proteasas del mismo tipo estudiadas en nuestro laboratorio (Cortadi, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2003; Priolo *et al.*, 2000).

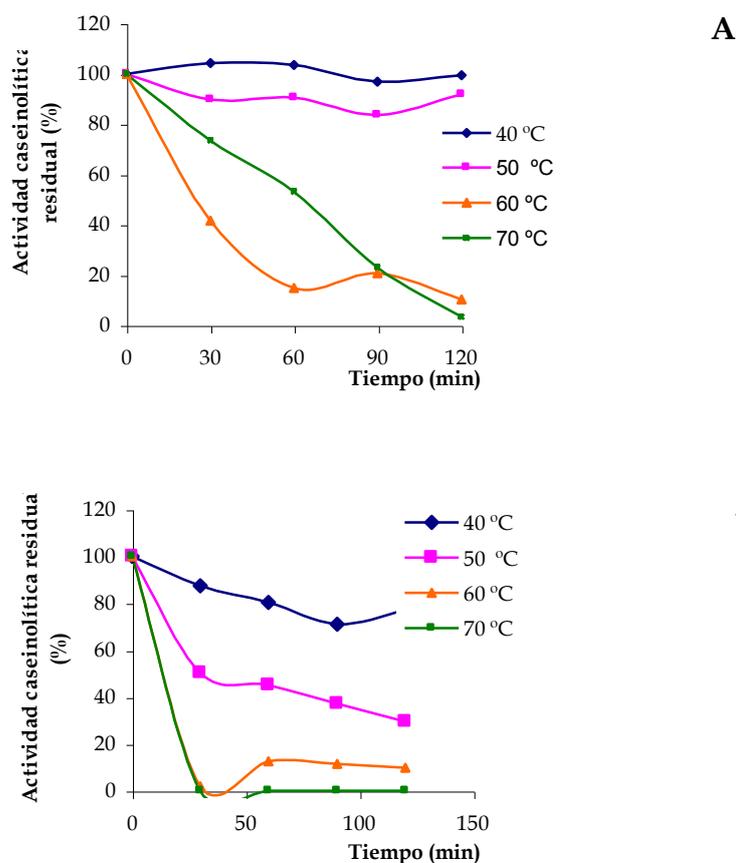


Fig. 29. Estabilidad a la temperatura. A. asclepaína c I.
B. asclepaína c II.

C.4.9. Medida de la actividad endoesterolítica

Las preferencias de las enzimas por los sustratos *N*- α -carbobozenoxi-*p*-nitrofenil ésteres de los aminoácidos ya indicados, se muestran en la figura 30 y las tablas 6 y 7. Como puede apreciarse en la figura 30 ambas proteasas exhibieron máxima preferencia por el derivado de glutamina tal como era de esperar por los resultados obtenidos para el mismo ensayo con el extracto crudo. La preferencia de estas enzimas por glutamina también se verificó en las proteasas aisladas de *Araujia hortorum* (araujaína h I, araujaína h II y araujaína h III) y *Araujia angustifolia* (araujaína a II). En el caso de la proteasa aislada de *Asclepias fruticosa* (asclepaína f), la misma mostró mayor preferencia por el

derivado de alanina, en tanto que el derivado de glutamina ocupó el segundo lugar con un 85% de preferencia (Obregón *et al.*, 2001; Trejo *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos con los ensayos de actividad esterolítica, fueron esperables ya que se comportaron de la misma forma que otras proteasas cisteínicas como papaína (Glazer & Smith, 1971) y bromelaína (Silvertein, 1974, Bruno *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2001).

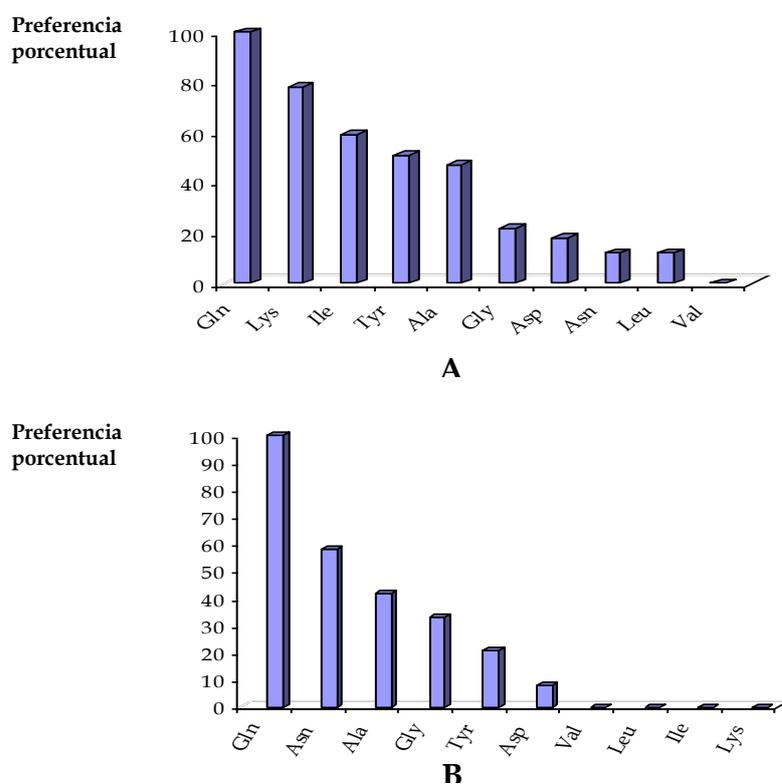


Fig. 30. Determinación de la preferencia por los derivados de N-alfa-carbobenzoxy-p-nitrofenil ésteres de aminoácidos.
A: asclepaína c I. **B:** asclepaína c II.

<i>NCBZ p-nitrofeniléster del aminoácido:</i>	<i>U_{NCBZ} (gr)</i>
Glutamina	11,49
Lisina	145,98
Isoleucina	194,64
Tirosina	224,58
Alanina	243,3
Glicina	530,84
Acido aspártico	648,81
Asparagina	973,2
Leucina	973,2
Valina	0

Tabla 6. U_{CBZ} de asclepaína c I.

<i>NCBZ p-nitrofeniléster del aminoácido:</i>	<i>U_{NCBZ} (gr)</i>
Glutamina	75,35
Asparagina	130
Alanina	181,28
Glicina	226,06
Tirosina	361,88
Acido Aspártico	904,26
Valina	0
Leucina	0
Isoleucina	0
Lisina	0

Tabla 7. U_{CBZ} de asclepaína c II.

C.4.10. Medida de la actividad amidolítica

Solamente asclepaína c I mostró actividad amidolítica sobre pFLNA. El valor de U_{pFLNA} fue de 2,3863, muy similar al de funastraína c II (Morcelle del Valle, 2004a).

C.4.11. Estudios Cinéticos

C.4.11.1. Parámetros cinéticos empleando *N*- α -Cbz-L-Gln *p*-nitrofeniléster como sustrato

	Km [mM]	Vm [mM/seg]	Kcat [seg ⁻¹]	Kcat/Km [seg ⁻¹ /mM]
asclepaína c I	0,0503	0,000868	66,15	1,3 10 ⁶
asclepaína c II	0,1634	0,000974	121,48	7,4 10 ⁵

Tabla 8. Parámetros cinéticos de asclepaína c I y asclepaína c II frente a *N*- α -Cbz-L-Gln *p*-nitrofeniléster.

En la tabla 8 pueden observarse los parámetros cinéticos correspondientes a asclepaína c I y asclepaína c II.

De los parámetros cinéticos estudiados los que se tomaron para analizar y comparar con los correspondientes a otras proteasas son el Km y la relación Kcat/Km. Este último representa la cantidad cinética que mejor expresa la eficiencia catalítica. Los valores obtenidos son similares a los correspondientes a araujaína h II y araujaína h III de la especie *Araujia hortorum* (Obregón *et al.*, 2001). Los valores obtenidos en el rango de 10⁵-10⁶ reflejan una muy buena afinidad de las enzimas con el sustrato.

C.4.11.2. Parámetros cinéticos empleando *p*FLNA como sustrato

Los resultados de los parámetros cinéticos de asclepaína c I con *p*FLNA se muestran en la Tabla 9.

	Km [mM]	Vm [mM/seg]	Kcat [seg ⁻¹]	Kcat/Km [seg ⁻¹ /mM]
Ecuación de Lineweaver-Burk	0,7284	0,0001643	46,961	6,44
Ecuación de Wolf-Hanes	0,8175	0,0001879	53,701	6,57
Ecuación de Eddie-Hofstee	0,8192	0,0001999	57,13	6,97

Tabla 9. Parámetros cinéticos de asclepaína c I frente a *p*FLNA.

Los resultados obtenidos son similares a los que mostraron otras proteasas cisteínicas como funastraína c II (Morcelle *et al.*, 2004 c) y philibertaína g I (Sequeiros *et al.*, 2005) estudiadas en nuestro laboratorio.

C.4.12. Titulación del sitio activo de las asclepaínas purificadas

A partir de los datos obtenidos por titulación del sitio catalítico con E-64 se calculó el porcentaje de asclepaína c I activa en la muestra, que resultó ser cercano al 44% (figura 31). Este valor es ligeramente inferior al de hieronimaína I cuyo valor fue de 57% (Bruno *et al.*, 2003). Esta determinación se puede realizar ya que este inhibidor se une en forma equimolecular y específica con la cisteína del sitio activo de las endopeptidasas cisteínicas. Con respecto al porcentaje de asclepaína c II activa no se pudo determinar debido a que dicha enzima en ninguna de las concentraciones de E-64 ensayadas se inhibió totalmente. Esto pudo haberse debido a cuestiones de esteroespecificidad entre

la enzima y el inhibidor. Es por esto, entonces, que en la figura 32 se muestra solamente la curva de inhibición de asclepaína c II por el inhibidor E-64.

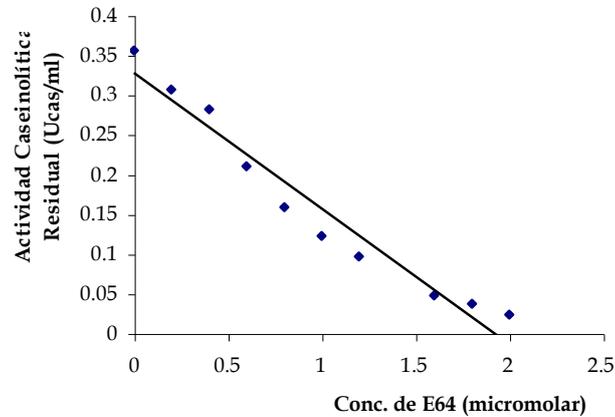


Fig. 31. Titulación del sitio activo de asclepaína c I.

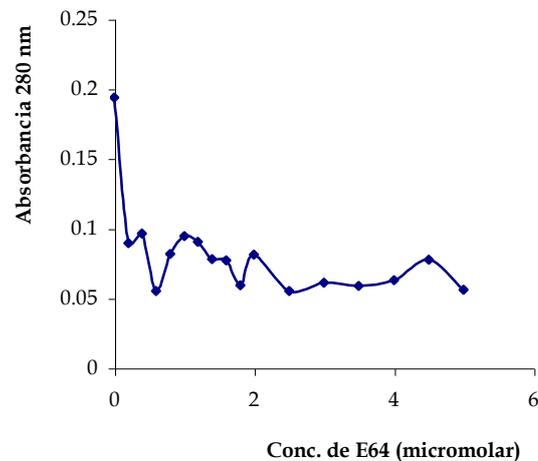


Fig. 32. Curva de inhibición de asclepaína c II frente a E-64.

C.4.13. Espectrometría de Masas de las asclepaínas purificadas

El resultado de la espectrometría de masas MALDI-TOF (figura 33) permitió corroborar el grado de pureza obtenido para las dos proteasas estudiadas, así como establecer sus pesos moleculares, los que resultaron ser muy similares a los obtenidos por SDS-PAGE (ver ítem C.4.3.). Así, el peso

molecular de asclepaína c I fue de 23,200 kDa y el correspondiente a asclepaína c II de 23,590 kDa. Los valores obtenidos son similares a otras proteasas tal como se discutió en el ítem C.4.4.

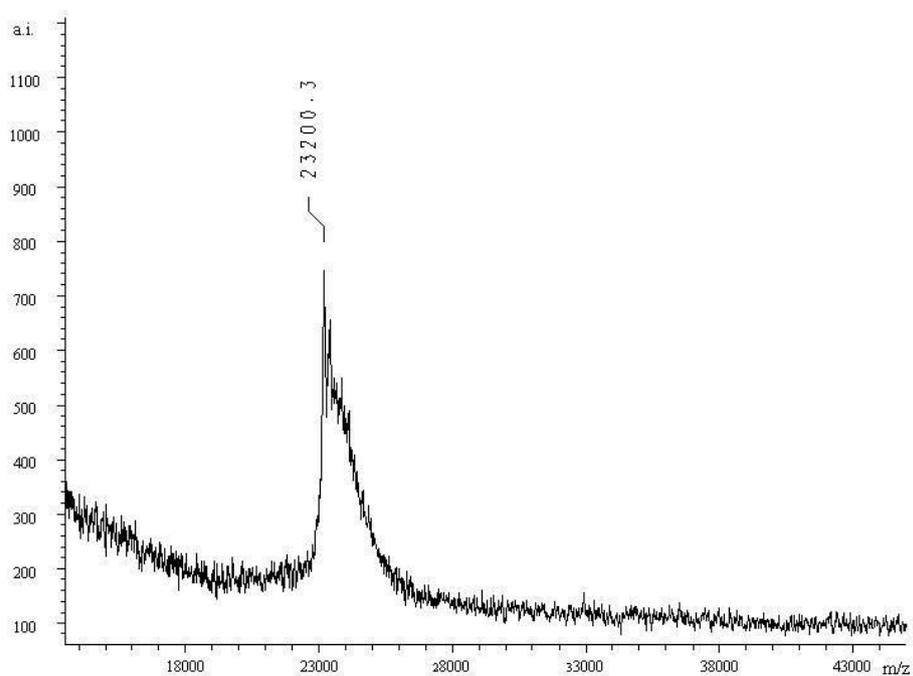
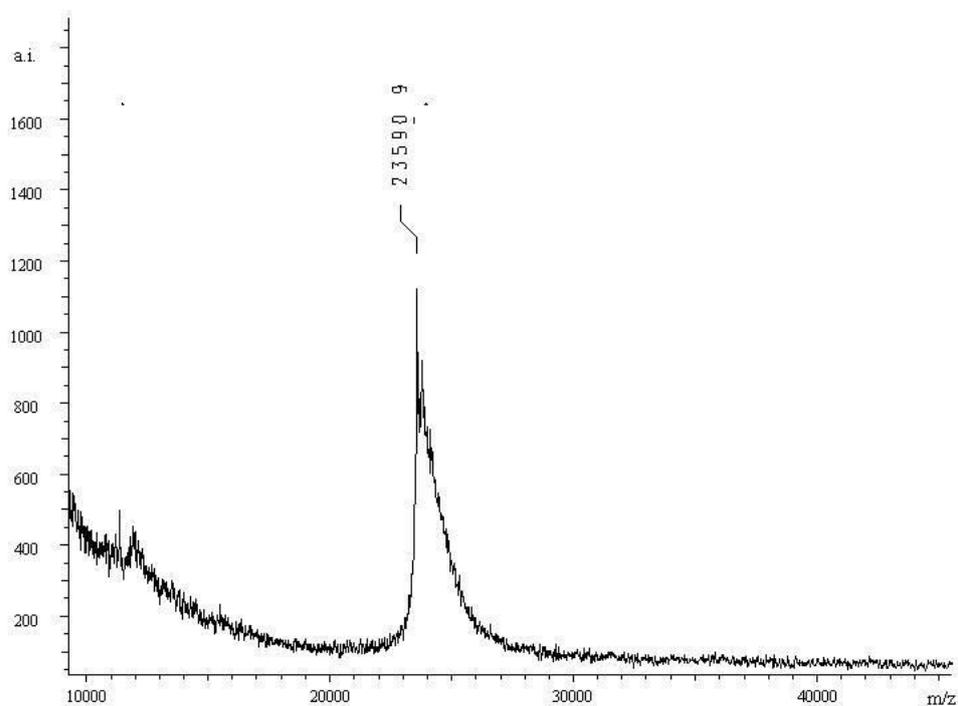
**A****B**

Fig. 33. Espectros de Masas. A . asclepaína c I. B. asclepaína c II.

C.4.14. Análisis de las secuencias aminoacídicas N-terminales

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias aminoacídicas de asclepaína c I y c II fueron **LPNSVDWRQKGVVFPIRDQGKCGSCWTFSAV** y **LPSFVDWRQKGVVFPARNQGQCGSCWTFSA**, respectivamente. Ambas secuencias se compararon con otras secuencias aminoacídicas terminales de otras proteasas como se observa en las Tablas 10 y 11. Como puede apreciarse en estas tablas tanto asclepaína c I como asclepaína c II presentan un elevado porcentaje de identidad (aminoácidos iguales ubicados en posiciones equivalentes) con las otras proteasas analizadas. En el caso de asclepaína c I dicha identidad se da con funastraína c II (87%) y asclepaína f (86%), mientras que en el caso de asclepaína c II se observa con asclepaína c I (86%), asclepaína b (85%), funastraína c II y asclepaína f (80%).

La presencia de cisteína en ambas proteasas en la posición 25 es característica del sitio catalítico de las peptidadasas cisteínicas pertenecientes a la familia de la papaína. Los motivos *CGS* y *WTFS* ubicados cerca de la cisteína catalítica y que se encuentran presentes en las dos proteasas estudiadas son característicos de la mayoría de las secuencias analizadas. El residuo glutamina en la posición 19 (sistema de numeración de papaína) se encuentra conservado en todas las proteasas cisteínicas como parte del sitio activo. Por otro lado, asclepaína c I y asclepaína c II tienen el residuo prolina en la posición 15, mientras que, funastraína c II posee alanina en dicha posición. Ambos residuos presentan características hidrofóbicas lo que hace que se espere un modelo de plegamiento similar en ese sitio. Es importante destacar que en asclepaína c I existe la forma amida Asn en la posición 3 y Asp en la posición 18; mientras que en asclepaína f la posición 3 es ocupada por el aminoácido ácido (Asp) y la posición 18 por la forma amida (Asn). El aminoácido Gln de la posición 9 de asclepaína c I es reemplazado por Glu en asclepaína f. Como sucede en la mayoría de las proteasas maduras de la familia C1 como en papaína, el residuo de prolina ubicado en la posición 2 muestra un alto grado de conservación al cual se le atribuye un rol protector frente al ataque de aminopeptidasas (Barrett, 2004c). Es notorio que los géneros *Asclepias* y *Funastrium* poseen un

porcentaje alto de identidad (igual o mayor al 80%) entre las especies que se incluyen en estas tablas lo que permite deducir una relación evolutiva muy cercana entre ellos.

<i>Material vegetal</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Identidad (%)</i>	<i>Referencias</i>
<i>Asclepaína c I</i>	LPNSVDWRQKGVVFPPIRDQGKCGSCWTFSAV	100 (31/31)	
<i>Funastraína c II</i>	LPNSVDWRQKGVVSAIRNQGKCGSCWAFSAV	87 (27/31)	Morcelle del Valle <i>et al.</i> (2004 c)
<i>Asclepain f</i>	LPDSVDWREKGVVFPPIRNQ GK	86 (18/21)	Trejo <i>et al.</i> (2001)
<i>Carica candamarcensis</i> (proteasa cisteínica I)	SIDWRQKGA VTPVRNQGSCGSCWTFSSV	75 (21/28)	Walreavens <i>et al.</i> (1993)
<i>Morrenain o II</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKXGSXWTFSAV	74 (23/31)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2001)
<i>Hordeum vulgare</i>	LPESVDWRQKGA VTPVKDQGKCGSCWAFSTV	74 (23/31)	Koehler & Ho (1990)
<i>Oryza sativa</i>	LPESVDWREKGA VAPVKNQCGSCWAFSAV	70 (22/31)	Watanabe <i>et al.</i> (1991)
<i>Carica papaya</i> (proteasa Papaya III)	LPESVDWREKGA VAPVKNQCGSCWAFSAV	70 (22/31)	Dubois <i>et al.</i> (1988)
<i>Carica candamarcensis</i> (proteasa cisteínica II)	PGSVDWRQKGA VTPVKDQNPCGSCWAFSTV	70 (21/30)	Walreavens <i>et al.</i> (1993)
<i>Morrenaína b II</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKKG	69 (16/23)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2001)
<i>Brassica napus</i> (proteasa Cisteínica COT44)	VPVTVDWRQKGA VNAIKDQGTGSCWAFS	69 (20/29)	Dietrich <i>et al.</i> (1989)
<i>Carica papaya Papaya</i> (proteasa I)	IPEYVDWRQKGA VTPVKNQCGSCWAFSAV	68 (21/31)	Dubois <i>et al.</i> (1988)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LPESIDWREKGVLVGKVDQSGCGSCWAFSAV	68 (21/31)	Schaffer & Fischer (1988)
<i>Pisum sativum</i>	LPEDFDWREKGA VTPVKDQGSCGSCWAFS	65 (19/29)	Guerrero <i>et al.</i> (1990)
<i>Lycopersicon esculentum</i> (proteasa Cisteínica III)	LPETKDWRKDGIVSPVKAQGKCGSCWTF S	65 (19/29)	Drake <i>et al.</i> (1996)
<i>Zea mays</i> (proteasa Cisteínica II)	LPETKDWREKGVVFPVKNQGHCGSCWTF S	65 (19/29)	Domoto <i>et al.</i> (1995)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPDEVDRANGAVVSVKDGNCGSCWAFSAV	64 (20/31)	Sato <i>et al.</i> (2000)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (proteasa Cisteínica EP-C1)	VPPSVDWRKKGAVTDVKDQGCGSCWAFSTV	64 (20/31)	Ogushi <i>et al.</i> (1992)
<i>Carica papaya</i> (proteasa Papaya IV peptidasa papaya B)	LPESVDWRAKGA VTPVKHQGYCESCWAFST	64 (20/31)	Ritonja <i>et al.</i> (1989)

Tabla 10. BLAST para asclepaína c I.

<i>Material vegetal</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Identidad (%)</i>	<i>Referencias</i>
<i>Asclepaína c II</i>	LPSPVDWRQKGVVFPPIRNQGGCGSCWTFSA	100 (30/30)	
<i>Asclepaína c I</i>	LPNSVDWRQKGVVFPPIRDQGGCGSCWTFSA	86 (26/30)	Liggieri <i>et al.</i> (2004).
<i>Asclepaína b</i>	LPNFVDWRKNGVVFPPIRNQGG	85 (18/21)	Lynn <i>et al.</i> (1980)
<i>Asclepaína f</i>	LPDSVDWREKGVVFPPIRNQGGK	80 (17/21)	Trejo <i>et al.</i> (2001)
<i>Funastráina cII</i>	LPNSVDWRQKGVVSAIRNQGGCGSCWAFSA	80 (24/30)	Morcelle del Valle <i>et al.</i> (2004 c)
<i>Asclepaína a</i>	LPNSIDWRQKNVVFPPIKNQGG	75 (15/20)	Lynn <i>et al.</i> (1980)
<i>Oryza sativa</i>	LPASVDWRGKGAIVNPVKNQGGCGSCWAFSA	73 (22/30)	Watanabe <i>et al.</i> (1991)
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSVDWRKKGAVSPVKNQGGCGSCWAFS	72 (21/29)	Ye & Varner (1996)
<i>Proteinasa papaya omega PP III</i>	LPENVDWRKKGAVTPVRHQGGCGSCWAFSA	70 (21/30)	Revell <i>et al.</i> (1993)
<i>Proteinasa papaya PP I</i>	IPEYVDWRQKGAIVTPVKNQGGCGSCWAFSA	70 (21/30)	Cohen <i>et al.</i> (1986).
<i>Arabidopsis thaliana</i> (proteasa cisteínica)	LPVSVDRKKGAVTPIKNQGGCGCCW	70 (21/30)	Asamizu <i>et al.</i> (1998)
<i>Morrenáina o II</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVNRQGGKXGSXWTFSA	70 (21/30)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2001)
<i>Brassica oleracea</i> (proteasa cisteínica)	LPDEVDRAKGAVFPVNRQGGCGSCWTFSA	66 (20/30)	Coupe <i>et al.</i> (2003)
<i>Araujiaína h III</i>	LPESVDWRKKNLVFPVNRQGGQXGSXXAFSA	66 (20/30)	Obregón <i>et al.</i> , (2001)
<i>Morrenáina b II</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVNRQGGKKG	65 (15/23),	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2001)
<i>Zea mays</i> (proteasa cisteínica)	LPETKDWREDDGIVSPVKNQGGHCGSCWTFSA	63 (19/30)	Domoto <i>et al.</i> (1995)
<i>Solanum tuberosum</i>	LPESVDWRDKGVLVGVKDDQGGCGSCWAFSA	63 (19/30)	Avrova <i>et al.</i> (1999)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LPESIDWREKGVVGVKDDQGGCGSCWAFSA	60 (18/30)	Harrak <i>et al.</i> (2001)
<i>Araujiaína h II</i>	VPDSIDWREKDAVLPPIRNQGGQXGSIWAFXA	60 (18/30)	Obregón <i>et al.</i> (2001)
<i>Morrenáina b I</i>	VPDKIDYREKGAIVLDPIRNQGGDGIWAFXA	53 (16/30)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2003)

Tabla 11. BLAST para asclepaína c II.

C.4.15. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) de la fracción no retenida (Nr) del E.C.

Los resultados de la actividad inhibitoria de la CPA pueden observarse en la figura 34 donde se verifica que la fracción no retenida (Nr), resultante de la purificación del extracto crudo, inhibe la actividad de esta enzima. Este comportamiento fue muy similar al obtenido con el extracto crudo (ver ítem B.4.11). En el ensayo de inhibición directa la actividad enzimática residual fue del 30%, mientras que en el caso de la inhibición con preincubación, la actividad enzimática fue nula.

Como la fracción no retenida (Nr) es parte del proceso de purificación del extracto crudo, esto podría sugerir que los inhibidores quedan en esta fracción separados de las proteasas purificadas. Este comportamiento permitirá en un futuro el aislamiento y caracterización de los mismos.

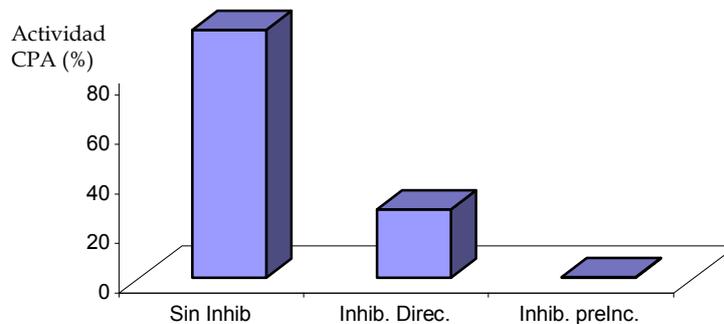


Fig. 34. Comparación del grado de inhibición de la fracción no retenida (Nr) liofilizada frente a CPA.

5. Conclusiones

Sección A: Actividad proteolítica “*in situ*”

- ✓ Se detectó la presencia de actividad proteolítica en cortes longitudinales frescos de tallo de *Asclepias curassavica* L. (*Asclepiadaceae*), mediante la técnica histoquímica de Denker específica para enzimas proteolíticas. Se demostró además que dichas enzimas están localizadas en el interior de los tubos laticíferos.

Sección B: Características del Extracto Crudo

- ✓ El Extracto crudo presenta máxima actividad proteolítica en un rango de pH 8,0-8,5. Su actividad enzimática se mantiene estable en ese rango de pH, reteniendo el 70% de la misma al cabo de 3 horas de incubación en esas condiciones.
- ✓ Manifiesta una importante estabilidad térmica en el rango de temperaturas de 40 a 60 °C. Se inactiva completamente a los 70 °C.
- ✓ Es notablemente estable en condiciones de elevada fuerza iónica, aún a concentraciones en las que muchas proteasas resultarían inactivadas.
- ✓ La aplicación de inhibidores específicos de grupo, como E-64, demostró que las enzimas presentes corresponden a una cisteinilendopeptidasa, como todas las proteasas de *Asclepiadaceae* aisladas hasta el momento. Los resultados

obtenidos sugieren que grupos -SH participan del mecanismo catalítico de las enzimas presentes.

- ✓ Para poder manifestar plenamente su actividad enzimática, las peptidasas cisteínicas requieren un medio reductor tal como el que proporciona la presencia de cisteína (tiol-reductor), situación que se alcanza cuando la concentración de la misma es 12 mM y permanece estable en este valor aún a concentraciones mayores del activador.
- ✓ Los puntos isoeléctricos de las proteasas presentes son alcalinos (superiores a 9,3).
- ✓ La mayor actividad endoesterolítica sobre los sustratos sintéticos *N*- α -carbобензохи-*p*-nitrofenil ésteres de aminoácidos, se ve reflejada con el derivado de glutamina.
- ✓ No presenta actividad carboxipeptidasa A.

Sección C: Características de las fracciones purificadas

El método de purificación empleado permitió la separación de dos fracciones proteolíticamente activas: asclepaína c I y aclepaína c II.

asclepaína c I

- ✓ Es la fracción enzimática purificada con mayor actividad proteolítica.
- ✓ Posee un pI mayor que 9,3 y resultó ser homogénea por SDS-PAGE. El peso molecular obtenido por MS fue de 23.200 Da.

- ✓ Es muy estable en su rango de pH óptimo (8,0-8,5).
- ✓ Es termoestable. Se inactiva totalmente recién a los 70 °C.
- ✓ Mostró actividad endoesterásica manifestando mayor preferencia por el derivado de glutamina y en orden decreciente por los derivados de lisina, isoleucina, tirosina, alanina, glicina, ácido aspártico, asparagina y leucina.
- ✓ Evidenció actividad amidolítica con un valor en U_{PFLNA} de 2,3863.
- ✓ Presentó los siguientes parámetros cinéticos:

	PFLNA (Ecuación de Eddie-Hofstee)	<i>N</i> - α -Cbz-L-Gln <i>p</i> -nitrofeniléster
Km [mM]	0,8192	0,0503
Vm [mM/seg]	0,000199	0,000868
Kcat [seg ⁻¹]	5,71	66,15
Kcat/Km [seg ⁻¹ /mM]	6,97	1,3 10 ⁶

- ✓ Su secuencia N terminal:

LPNSVDWRQKGVVFPIRDQKCGSCWTFSAV

por comparación con las secuencias N-terminales de otras especies vegetales resultó tener un alto grado de similitud con aquellas especies que contienen proteasas cisteínicas de la familia de la papaína.

asclepaína c II

- ✓ Posee un pI mayor que 9,3 y resultó ser homogénea por SDS-PAGE. El peso molecular obtenido por MS fue de 23.590 Da.
- ✓ Es muy estable a valores de pH alcalinos (8,0 y 10,0), en los que manifiesta máxima actividad enzimática.

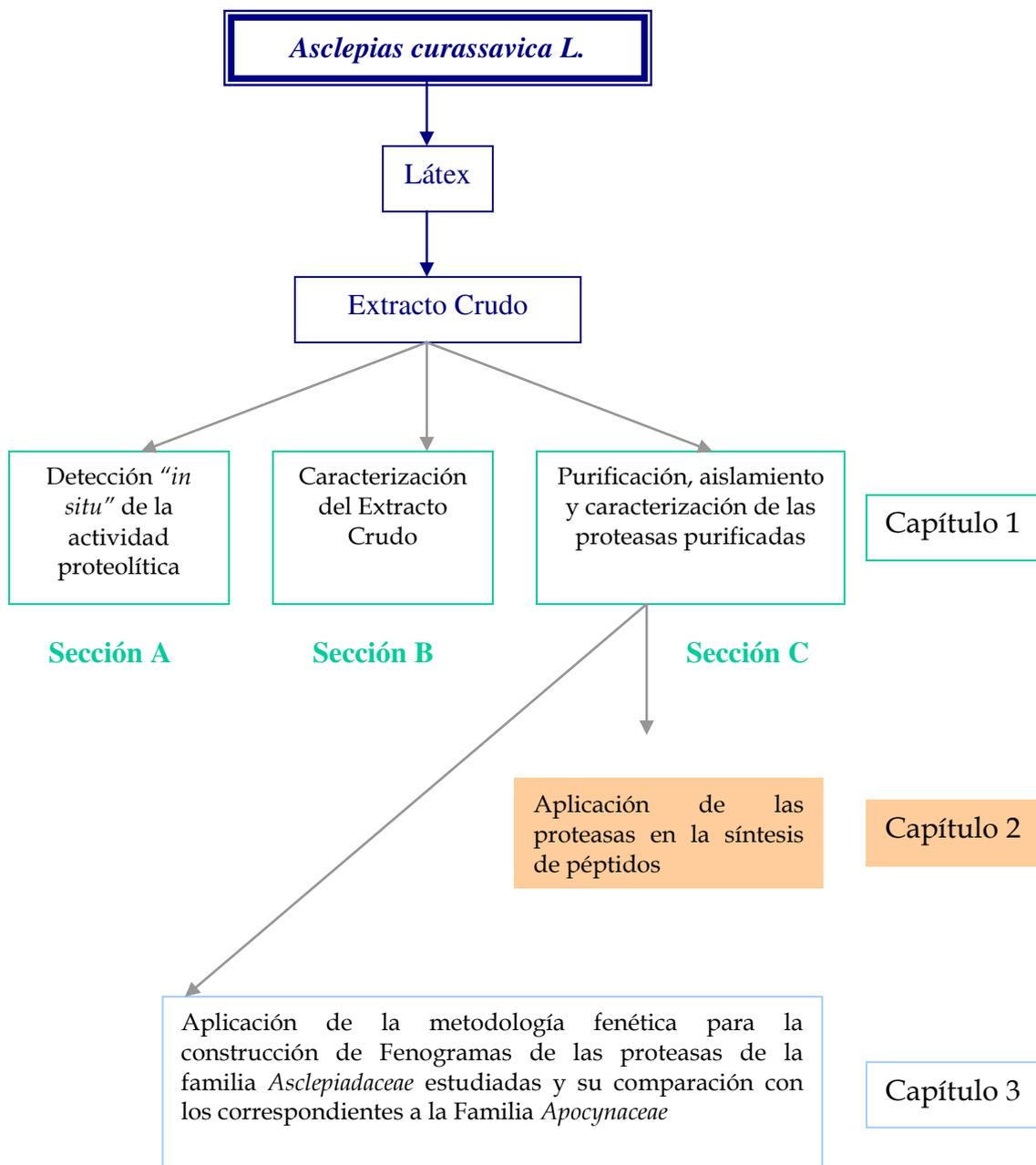
- ✓ A diferencia de asclepaína c I no es muy termoestable. A 50 °C de temperatura pierde gran parte de su actividad.
- ✓ Al igual que asclepaína c I mostró actividad endoesterásica manifestando mayor preferencia por el derivado de glutamina. Sin embargo se diferenció en sus preferencias por los otros derivados en el siguiente orden decreciente: asparagina, alanina, glicina, tirosina y ácido aspártico.
- ✓ A diferencia de asclepaína c I no evidenció actividad amidolítica.
- ✓ Presentó los siguientes parámetros cinéticos

	<i>N</i> -α-Cbz-L-Gln <i>p</i> -nitrofeniléster
K _m [mM]	0,1634
V _m [mM/seg]	0,000974
K _{cat} [seg ⁻¹]	121,48
K _{cat} /K _m [seg ⁻¹ mM]	7,4 10 ⁵

- ✓ Su secuencia N terminal:

LPSFVDWRQKGVVFPINQQCGSCWTFSA

por comparación con las secuencias N-terminales de otras especies vegetales resultó tener un elevado grado de similitud con aquellas especies que contienen proteasas cisteínicas de la familia de la papaína.



1. Introducción

1.1. Importancia de los péptidos biológicamente activos

Conjuntamente con los avances de la medicina y más tarde de la biotecnología, se ha demostrado que algunos péptidos participan activamente en la regulación y mantenimiento de muchas funciones biológicas. Los *péptidos biológicamente activos* constituyen un diverso grupo de moléculas que incluyen a agentes antibióticos y antivirales, péptidos neuroactivos, enzimas reguladoras e inhibitorias, péptidos hormonales, péptidos fisiológicamente activos y péptidos inmunoactivos (Gill *et al.*, 1996). Estos péptidos han sido aislados de bacterias, hongos, plantas y animales y han sido debidamente caracterizados.

Los péptidos son nutricional y fisiológicamente diferentes a los aminoácidos libres y proteínas. Algunos poseen actividad biológica como la angiotensina y otros tienen sabor como el aspartamo (Kimura *et al.*, 1990a). Es por ello que los péptidos representan nuevas oportunidades para usarlos en la formulación de drogas farmacéuticas y agroquímicos, en reactivos de diagnóstico como así también en aditivos para la industria alimentaria con el fin de modificar el sabor de los alimentos (Clapés *et al.*, 1995; Calvet *et al.*, 1996; Björup *et al.*, 1999; Trusek-Holownia, 2003). Debido a esto, se da que en la actualidad ha aumentado el interés por investigar este campo con el objeto de obtener importantes rendimientos, alto grado de pureza y la producción a gran escala de dichos péptidos para emplearlos en variados procesos industriales. (Clapés *et al.*, 1995).

Es así, como Kimura *et al.*, (1990b) lista una serie de péptidos formados por aminoácidos esenciales obtenidos mediante síntesis enzimática utilizando papaína, alfa-quimotripsina y termolisina. En la Tabla 1 se citan algunos ejemplos.

<i>Péptido</i>	<i>Unión peptídica formada</i>	<i>Enzima utilizada</i>	<i>Referencia</i>
Aspartamo	Asp-Phe	Termolisina	Kuhn <i>et al.</i> , 2002; Erbeldinger <i>et al.</i> , 2001
Kiatorfina	Tyr-Arg	α -Quimotripsina	Clapes <i>et al.</i> ,1987
Péptido Nutricional	Tyr-Trp-Val	α -Quimotripsina papaína	Kimura <i>et al.</i> ,1990a
Péptido Lisina dulce	Phe-Lys	α -Quimotripsina	Aso, 1989
Somatostatina	(-Ala-Gly-Cys- Lys-Phe-Phe-Trp- Lys-Thr-Phe-Thr- Ser-Cys-) ^a	Termolisina Quimotripsina	Bille <i>et al.</i> , 1991
Vasopresina	Tyr-Phe Phe-Gln	Termolisina Quimotripsina	Rizo & Gierasch, 1992
Oxitocina	Cys-Tyr Tyr-Ile Pro-Leu Leu-Gly	Papaína Termolisina Quimotripsina	Rizo & Gierasch, 1992

Tabla 1. Péptidos biológicamente activos sintetizados empleando proteasas. ^a:Formación de unión peptídica entre el primer residuo de aminoácido y el último para la ciclación del oligopéptido somatostatina (Kumar & Bhalla, 2005).

1.2. Mecanismos utilizados para la síntesis peptídica

Para la síntesis de estos péptidos existen dos caminos posibles:

- a) la síntesis química
- b) la síntesis enzimática

1.2.1. Síntesis química

El primer acercamiento hacia la síntesis química de péptidos reportados en la bibliografía fue específicamente el correspondiente al dipéptido glicil-glicina (Fischer & Fourneau, 1901).

La técnica más comúnmente usada para lograr la síntesis química de péptidos es la denominada *síntesis química en fase sólida* (Nilsson *et al.*, 2005). En este método, el componente carboxílico terminal de un aminoácido (con el grupo alfa-amino y la cadena lateral protegidos) es unido covalentemente a un polímero insoluble o resina, y el péptido se va formando sobre dicho polímero uniendo un residuo aminoacídico cada vez. El grupo protector alfa-amino

puede ser un grupo ter-butoxicarbonil (Boc) o un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), los cuales son completa y fácilmente removidos (Wellings & Atherton, 1997). El ciclo de desprotección y acoplamiento es repetido tantas veces hasta obtener la secuencia deseada completa (Stewart, 1997; Guy & Fields, 1997). Luego el péptido unido a la resina se separa del resto de los reactantes, de impurezas y de los productos secundarios solubles, por medio de un simple proceso de filtración. Finalmente, la unión del péptido a la resina (unión éster) se cliva utilizando HF líquido o una mezcla de ácido trifluorometanosulfónico y ácido trifluoroacético, sin alterar las uniones peptídicas (uniones amidas) formadas (Marc Loudon, 1988).

La síntesis química posee varias desventajas (Gill *et al.*, 1996), entre ellas se cita que:

- ✓ durante la formación de la unión peptídica aparecen restos de racemización.
- ✓ la protección de las cadenas funcionales laterales incrementa el costo de los sustratos lo cual deja pérdidas en el rendimiento durante la desprotección.
- ✓ es muy dificultoso reciclar el reactivo de acoplamiento y el acil donador empleado para lograr una acilación rápida y completa del nucleófilo.
- ✓ la naturaleza tóxica de los solventes y la de los reactivos que se acoplan en las etapas finales de la producción de un determinado alimento pueden traer aparejadas consecuencias importantes en la salud y en el ambiente.
- ✓ puede suceder que la reacción de acoplamiento sea incompleta conduciendo a la formación de productos secundarios unidos covalentemente al soporte, con lo cual la separación del producto se vuelve dificultosa.
- ✓ es un método lento producto de los sucesivos y necesarios procesos de protección y desprotección.

Sin embargo, la ventaja principal del método de la síntesis química, es la facilidad con la cual el péptido puede ser separado de las impurezas y de otros productos.

1.2.2. Síntesis enzimática

Para llevar a cabo esta síntesis en los últimos años se está utilizando con éxito a las *proteasas*. Actualmente, la aplicación de proteasas en la producción de pequeños péptidos, ha recibido mucha atención ya que constituye una alternativa viable a la síntesis química (Fan *et al.*, 2001).

Bajo condiciones normales, las proteasas catalizan la hidrólisis de las uniones peptídicas, pero también, en condiciones debidamente controladas, pueden catalizar la reacción inversa en medios con bajo contenido de agua (figura 1).

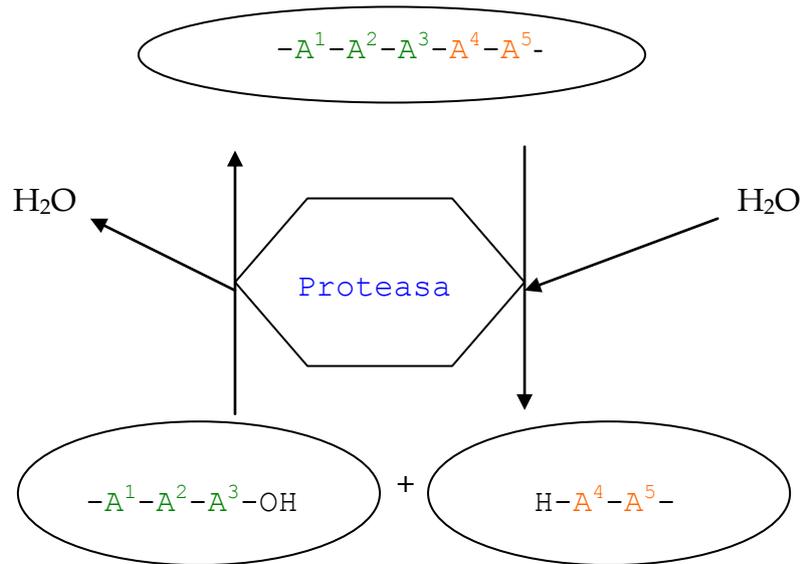


Fig 1. Representación esquemática de la reacción catalizada por una proteasa específica para la unión peptídica A³-A⁴.

Los métodos enzimáticos de síntesis ofrecen varias ventajas sobre los métodos químicos (Moriyama, 1987; Bhalla *et al.*, 1999). Dichas ventajas están asociadas con las características inherentes de las enzimas como la elevada especificidad y regioespecificidad de la reacción, la ausencia de cualquier requisito de protección de la cadena lateral y el uso de condiciones de

reacciones no peligrosas (Cheetham, 1994). Estas propiedades hacen de las proteasas herramientas útiles para clivajes específicos, hidrólisis regioespecífica de ésteres y resolución de racematos. Es por ello que para el desarrollo de esta tecnología es necesario intensificar la búsqueda de proteasas con especificidades bien definidas para su utilización en la síntesis peptídica, principalmente de dipéptidos en las diversas áreas industriales como alimentos, productos farmacéuticos y nutrición animal, tal como ya ha sido mencionado con anterioridad (Sergeeva *et al.*, 1997).

Las enzimas son, generalmente, catalizadores muy lábiles, lo que ocasiona que las reacciones a escala industrial deben ser muy cuidadosas en cuanto a su desarrollo. Es decir, es importante estudiar previamente los efectos de las diferentes variables que van actuar en el medio de reacción (pH, temperatura, la presencia de solventes orgánicos) como así también los intereses industriales (actividad/estabilidad del catalizador, solubilidad de reactivos, estabilidad de los reactivos y productos, rendimiento del producto).

1.3. Especificidad de las proteasas

Las proteasas para la síntesis de péptidos fueron seleccionadas, como ya se indicó precedentemente, en base a su especificidad. Ejemplos de algunas de ellas pueden observarse en la Tabla 2 (Kumar & Bhalla, 2005).

<i>Nombre de la enzima</i>	<i>Clivaje de la unión peptídica</i>
Proteasas serínicas	
Tripsina	-A-A'- (-A=Lys, Arg, -A'=no específico)
Quimotripsina	-A-A'- (-A=Trp, Phe, Leu, -A'= no específico)
Catepsina	-A-A'- (-A= Phe, Leu, Trp, -A'= no específico)
Elastasa	-A-A'- (-A=Ala, Ser, -A'= no específico)
Subtilisina	-A-A'- (-A=neutral, aminoácido ácido preferentemente, -A'= no específico)
Carboxypeptidasa y Prolina -proteasa específica	-A-A'- (no específico) -A-A'- (-A=Pro)
Proteasas cisteínicas	
Papaína	-A-A'- (-A=Arg, Lys, -A'= no específico)
Bromelaína	-A-A'- (no específico)
Clostripaína	-A-A'- (-A=Arg, -A'=pro preferentemente)
Catepsina B	-A-A'- (sustrato-dependiente)
Metaloproteasas	
Termolisina	-A-A'- (-A=Leu, Phe, -A'=Leu, Phe, Val, Met, Ala, Ile)
Proteasas aspárticas	
Pepsina	-A-A'- (-A=Phe, Tyr, Leu, -A'=Trp, Phe, Tyr)
Catepsina D	-A-A'- (-A= Phe, Leu, -A'=no puede ser ni Val ni Ala)

Tabla 2. Sitios específicos de varias proteasas.

Como puede observarse en la tabla 2, las proteasas que fueron usadas para la síntesis peptídicas incluyen a la mayoría de las comercialmente disponibles como las endo y exopeptidasas serínicas, cisteínicas, aspárticas y metaloproteasas. La gran especificidad de las proteasas restringe su aplicación en la síntesis peptídica. Así, el producto peptídico que se acumula durante la reacción puede ser atacado simultáneamente por la proteasa de la reacción de síntesis (Schellenberger *et al.*, 1991).

1.4. Estrategias utilizadas en la síntesis peptídica

La síntesis de péptidos catalizada por proteasas puede realizarse por dos mecanismos (figuras 2y 3):

- a) por control termodinámico
- b) por control cinético

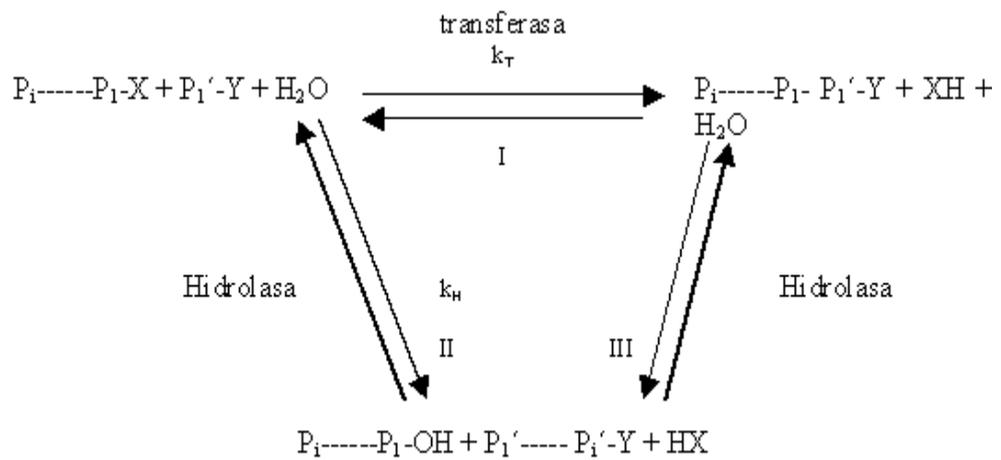


Fig. 2. Síntesis por control termodinámico y por control cinético. X: grupo activador del -COOH terminal del péptido $P_1\text{-----}P_1$. Y: grupo protector del -COOH terminal del péptido (aa) $P_1'\text{-----}P_1'$. Control cinético (I+II+III). Control termodinámico (III). k_T , k_H : constantes de velocidad de la enzima usada, de segundo orden (aparente).

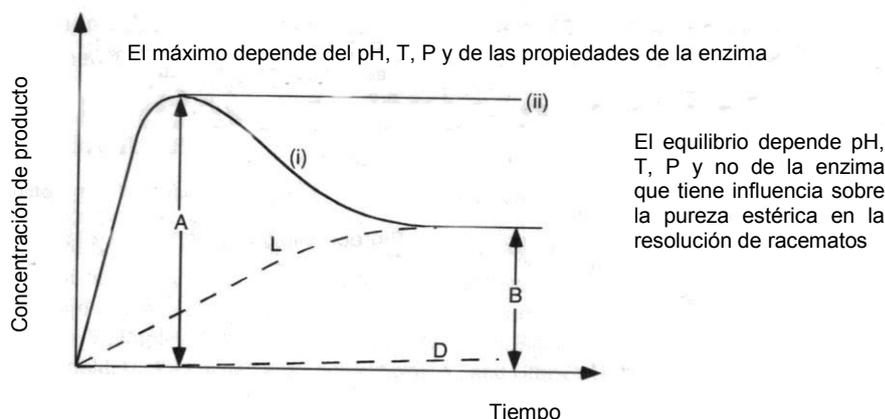


Fig. 3 Dependencia con el tiempo en síntesis peptídica por control cinético (línea continua) y por control termodinámico (línea discontinua). Para la síntesis por control cinético se consideran dos casos: (i) la velocidad de síntesis es del mismo orden de magnitud que la velocidad de hidrólisis del péptido producido, (ii) la velocidad de síntesis es mucho mayor que la de hidrólisis.

El *control termodinámico* representa la reacción inversa de la proteólisis. Las ventajas de este método son la posibilidad de *usar la función carboxilato libre* como donador de acilo y la *posibilidad de aplicarse a cualquier proteasa*, independientemente de su mecanismo catalítico. Las desventajas son las bajas velocidades, el alto requerimiento de enzima y la necesidad de manipular la reacción para desplazar la posición del equilibrio hacia la síntesis. En última instancia, se trata de manipulaciones que influyen sobre el equilibrio de ionización. Esto se debe a que la barrera termodinámica para revertir la hidrólisis está predominantemente determinada por la energía requerida para la transferencia de un protón desde el grupo reactivo del nucleófilo al carboxilato negativamente cargado del donador de acilo por el agregado de solventes orgánicos que disminuyen la constante dieléctrica del medio, reduciendo la acidez del carboxilato del donador de acilo y provocando el aumento de la constante de equilibrio para la transferencia de este protón (K_{ion}), promoviendo así la reacción inversa. Además, las condiciones de la reacción que conducen a la precipitación del producto o extracción del mismo también aumentan la eficiencia de la reacción reversa.

Analizando las figuras precedentes se deduce que el equilibrio de la reacción en agua, finalmente, será desviado hacia la izquierda (hidrólisis peptídica). El reemplazo del agua por un solvente orgánico es una buena alternativa para desviar el equilibrio hacia la síntesis. De esta forma, la presencia de un solvente orgánico provoca una disminución en la constante dieléctrica del medio, resultando en una reducción de la acidez del grupo carboxílico del donante de acilo promoviendo así, la reacción reversa. La adición de altas concentraciones de solventes orgánicos miscibles frecuentemente producen la disminución de la actividad enzimática de una proteasa (Jakubke *et al.*, 1985).

Contrariamente, la *síntesis cinéticamente controlada* solamente ocurre exitosamente con *proteasas serínicas y cisteínicas*, que forman intermediarios reactivos acil-enzima durante la catálisis. El uso de *grupos acilo levemente activados*, tales como ésteres o amidas activadas, como *donores* que aceleren significativamente la velocidad de la reacción y minimicen el requerimiento de enzima, son algunas de las características de este método. En principio, esos donores de acilo se unen a la proteasa formando un complejo tetraédrico enzima-sustrato, llevando a un intermediario E-Ac (figura 4).

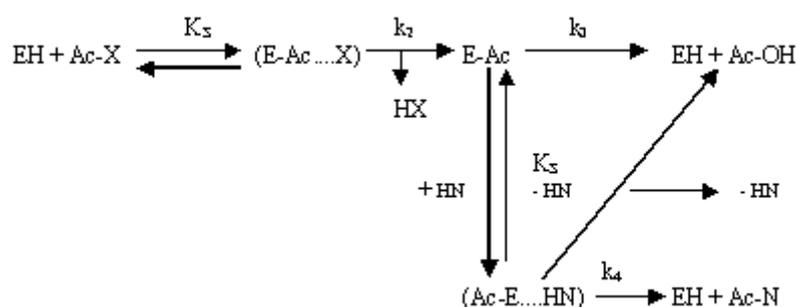


Fig. 4 . Formación del intermediario acil-enzima (Ac-E).

Los grupos carboxilato activados son esenciales para esta aplicación, en tanto que los carboxilatos libres usualmente no reaccionan con la enzima bajo condiciones cinéticamente controladas. El valor del método cinético para síntesis orgánica está basado en el hecho de que el intermediario Ac-E puede ser interceptado no solamente por agua, sino también por

nucléofilos alternativos (NH) tales como aminas, alcoholes y tioles, los que compiten con el agua para la deacilación. En este contexto, control cinético quiere decir que el producto que aparece con la mayor velocidad y desaparece con mínima velocidad debería acumularse. En tanto que la síntesis por control termodinámico llega a un equilibrio verdadero, en el método cinético solamente se está formando un producto intermedio que llega a un máximo antes de que la hidrólisis más lenta del producto comience a ser importante. Entonces, el producto será hidrolizado si la reacción no se acaba después de que el donador de acilo se consuma y se establezca así el verdadero equilibrio. Las proteasas que pueden actuar en este modo cinético pueden verse como reactivos suaves y selectivos capaces de activar un grupo ácido carboxílico esterificado genérico o grupo amida y transferirlo a un amplio número de nucleófilos. El éxito de las síntesis depende de muchos factores, en tanto que los parámetros fundamentales de reacción, como temperatura, fuerza iónica, concentración de reactivos y pH juegan un papel importante. Como regla general, se puede considerar que un aumento en la concentración del nucleófilo (NH) y el pH también aumentan el rendimiento en producto. La razón es que ambas manipulaciones aumentan la eficiencia del ataque nucleofílico en el intermediario acil-enzima por el aceptor de acilo (NH) en tanto que el último resulta del hecho de que sólo la forma básica libre del nucleófilo puede reaccionar con la enzima acilada. Así, el pH de la mezcla de la reacción debería ser preferiblemente más alto que el pK del nucleófilo. Por último, la enzima por sí misma afecta significativamente la eficiencia de la síntesis. En tanto que la velocidad de reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima hacia el donador de acilo, es crucial la unión específica del nucleófilo al subsitio S' de la proteasa para obtener altos rendimientos. Ya que la especificidad de unión del dominio al donador de acilo y al aceptor son parámetros individuales de cada enzima, la eficiencia de síntesis y la utilidad sintética de las proteasas para la síntesis orgánica difiere de una enzima a otra (Bordusa, 2002).

1.5. Papel de las proteasas en la síntesis enzimática en medios orgánicos

Es sabido que muchas enzimas pueden funcionar adecuadamente en medios no convencionales como en solventes orgánicos anhidros, debido a que se requiere muy poca cantidad de agua para mantener la conformación catalítica nativa de la enzima. Es así, que se las ha utilizado en procesos que no podían llevarse a cabo exitosamente en fase acuosa, demostrando que las mismas pueden, no sólo hidrolizar sino también sintetizar compuestos (Navigatore Fonzo *et al.*, 2000; Quiroga, 2005). Es por ello que, muchos autores, han aplicado las reacciones enzimáticas en medios orgánicos para realizar síntesis peptídica (Dordick, 1989; Khemlnitsky *et al.*, 1988; Klibanov, 1986,1990; Zaks & Klibanov 1988a; Gill *et al.*,1996; Zaks & Russell, 1988; Kise *et al.*,1990; Morcelle del Valle, 2004).

Uno de los aspectos a tener en cuenta para la catálisis enzimática en medios orgánicos es evitar que la estructura del sitio activo de la enzima se altere por la presencia de un solvente orgánico y que exista suficiente cantidad de agua para promover un nivel crítico de flexibilidad del sitio catalítico para que la enzima pueda actuar en dichas condiciones (Zacks & Klibanov, 1988b; Klibanov, 1990; Dordick, 1992; Grupta, 1992).

Proteasas cisteínicas de origen vegetal han sido utilizadas para la síntesis de péptidos en medios no convencionales como por ejemplo papaína (Mitin *et al.*, 1984); ficina (Monter *et al.*, 1991) y fitoproteasas de las especies *Morrenia brachystephana* y *Funastrum clausum* ambas pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae* (Barberis *et al.*, 2002; Morcelle del Valle, 2004).

Estos sistemas biocatalíticos permiten la expresión de la funcionalidad de las enzimas como así también presentan algunas ventajas relevantes respecto de los tradicionales sistemas de biocatálisis en fase acuosa. Ejemplo de ello es la posibilidad de utilizar sustratos poco solubles en agua, cambios en el equilibrio de la reacción como consecuencia de la alteración de los coeficientes de partición de sustratos y productos entre las fases de interés, cambios en el equilibrio termodinámico a favor de la síntesis cuando el agua es uno de los productos de la reacción, reducción de la inhibición debida a

sustratos y a productos, facilidad de recuperación de productos y biocatalizador, aumento en la termoestabilidad del biocatalizador, variación en la especificidad de algunas enzimas por sus sustratos, aumento de la estereoespecificidad en la resolución de mezclas racémicas, aumento de la solubilidad de los sustratos no polares, reducción en reacciones laterales indeseables, fácil separación del producto del biocatalizador, la recuperación y reutilización del biocatalizador y reducción en la contaminación microbiana (Kise *et al.*, 1990; Khemlnitsky *et al.*, 1988; Gill *et al.*, 1996, Kise, 1992).

Es así, que varios modelos de dipéptidos y tripéptidos han sido sintetizados en medios con bajo contenido acuoso empleando para ello, enzimas libres, inmovilizadas en distintos tipos de soporte, suspendidas y químicamente modificadas. También se ha logrado con éxito la síntesis de varios oligopéptidos por Gill *et al.*, 1996, Clapés *et al.*, 1997; Noritomi & Kise, 1987; Kimura *et al.*, 1990 a,b,c; Wong *et al.*, 1988; Barbas & Wong, 1987).

Sin embargo, a pesar de las ventajas ya mencionadas, las proteasas no actúan como catalizadores universales y perfectos. De este modo, las aplicaciones sintéticas se pueden ver limitadas por sus especificidades y selectividades por lo que sólo serán significantes las reacciones con compuestos muy relacionados con los aminoácidos por los que demuestren mayor preferencia. También en este tipo de reacciones las enzimas rinden no sólo el producto deseado sino también pueden formar productos secundarios. Esto se refleja especialmente cuando se sintetizan péptidos de cadenas largas aunque es posible que se produzcan reacciones de hidrólisis no deseadas, tanto del producto formado como de los sustratos reaccionantes. Por último, la utilización de medios no convencionales, aditivos y condiciones de reacción como pH y temperatura pueden afectar significativamente la actividad y la estabilidad de la enzima (Bordusa, 2002).

1.6. Estrategias empleadas en la síntesis enzimática de péptidos

Para lograr exitosamente la síntesis enzimática empleando proteasas se han ideado numerosos mecanismos tendientes a superar los inconvenientes enumerados en párrafos anteriores. Dichos mecanismos se refieren a la *Ingeniería de medios*, *Ingeniería de sustratos* e *Ingeniería enzimática*.

1.6.1. Ingeniería de medios

Este término se refiere a la posibilidad de modificar las propiedades de la enzima alterando la naturaleza del solvente en donde la reacción se lleva a cabo (Wescott & Klivanov, 1994). Esta metodología se ha aplicado históricamente al comportamiento de las proteasas en solventes orgánicos, pudiendo actuar como cosolventes o como solventes puros. Sin embargo, se incluye también a reacciones en medios acuosos congelados, en soluciones orgánicas congeladas o sobreenfriadas, en fluidos supercríticos y sistemas de reacción sólidos (Bordusa, 2002).

1.6.1.1. Síntesis en mezclas de solventes acuoso-orgánicos

Las razones por las cuales se elige reemplazar el agua por mezclas orgánicas-acuosas, se basan en la baja solubilidad que presentan la mayoría de los sustratos hidrofóbicos en un medio acuoso puro, y a la hidrólisis que experimentan los productos peptídicos en agua.

Los *sistemas homogéneos, monofásicos o miscibles* están formados por la enzima disuelta en agua y un solvente orgánico miscible (Guisán *et al.*, 1987; Rodger *et al.*, 1987). En estos casos existe interacción de la enzima con el solvente que posee un alto grado de hidrofiliidad, provocando así la disminución de la actividad enzimática a medida que aumenta la concentración del solvente orgánico en el medio de reacción (Klivanov, 1986; Zacks & Klivanov, 1988 a; Laane *et al.*, 1987 a y b; Mozhaev *et al.*, 1989; Levitsky *et al.*, 1999). Las causas que explican este fenómeno, posiblemente, serían la disminución en la flexibilidad de la enzima y una menor estabilidad de la misma, mediada por el efecto desnaturizante de los solventes orgánicos

(Nelson & Cox, 2000). Otras causas que también podrían afectar las propiedades de la enzima disuelta en estos medios es la capacidad de los solventes hidrofílicos de solubilizar la capa de agua que rodea y mantiene catalíticamente activa a la enzima como así también los cambios conformacionales en la molécula enzimática (Klibanov, 1986; Deetz & Rozzell, 1988).

Por ejemplo, para realizar esta síntesis en estas mezclas homogéneas acuoso-orgánicas tales como DMF, DMSO, acetonitrilo o metanol en pequeñas o moderadas cantidades son los métodos preferidos en las síntesis por control cinético o control termodinámico. Autores como Guisán *et al.*, 1987; Rodger *et al.*, 1987; Lobell & Schneider, 1998; Morcelle del Valle, 2004., han obtenido excelentes resultados en la síntesis peptídica en estas mezclas. Se ha demostrado que los polioles producen un notable efecto estabilizante de la estructura enzimática debido a su capacidad de formar puentes de hidrógeno. Pero a pesar de esto, las enzimas no siempre manifiestan en estos solventes su mayor expresión catalítica, ni una mayor actividad de síntesis que de hidrólisis. Esto evidencia la dificultad de encontrar condiciones óptimas para la biocatálisis en solventes orgánicos miscibles y la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de expresión de actividad y estabilidad de cada catalizador enzimático en estos sistemas.

Debido a la disminución de la actividad catalítica de la enzima por el agregado de solventes orgánicos se ideó otro tipo de mezcla de reacción llamada *sistema bifásico* o *mezcla de dos líquidos inmiscibles*, formada por la mezcla de un solvente orgánico hidrofóbico y diferentes contenidos acuosos (Kuhl *et al.*, 1980; Martinek *et al.*, 1981). En estos sistemas la enzima se encuentra disuelta en la fase acuosa, donde justamente ocurre la catálisis, independientemente de la partición de los reactivos. Los sustratos pueden estar disueltos tanto en la fase orgánica como en la fase acuosa. De esta manera la fase orgánica cumpliría una doble función, ya que por un lado, extrae al producto formado, y por otro evita que se produzca una hidrólisis indeseada del mismo, desviando así, la posición de equilibrio hacia la formación de más

producto (Bordusa, 2002). Entre las muchas desventajas, la principal es la limitación en la aproximación de productos hidrofóbicos con baja solubilidad en agua. Mediante una agitación intensa se puede aumentar la velocidad de transferencia de masa a través de la interfase, pero también se acelera la desnaturalización de la enzima y su inactivación debida a la tensión interfacial (Khmelnitsky *et al.*, 1988). Un área interfacial grande entre el agua y los solventes orgánicos acelera la inactivación; este defecto queda salvado por el uso de surfactantes (Tween 80). Sin embargo, cuando se adicionan pequeñas cantidades de agua a grandes volúmenes de solventes hidrofóbicos conteniendo surfactantes y se mantiene en agitación, se forma espontáneamente un sistema de *micelas reversas* (Khmelnitsky, *et al.*, 1988). En estos agregados, a diferencia de las miscelas normales, las colas hidrofóbicas de las moléculas del surfactante se orientan hacia el exterior (solvente orgánico), mientras que las cabezas polares hidrofílicas quedan orientadas hacia el interior de la micela (fase acuosa). Esto se ha comprobado con éxito en la síntesis de péptidos hidrofílicos (Chen *et al.*, 1999). A pesar de esto, la mayor desventaja en el uso de estas micelas reversas es la falta de métodos racionales tendientes a optimizar estos sistemas multicomponentes, siendo además dificultosa la posterior separación y purificación de los productos debida a la presencia de surfactante.

Clapés y colaboradores (2001) han desarrollado un sistema consistente en una emulsión de agua en aceite (W/O) como medio de reacción para la síntesis catalizada por quimotripsina controlada cinéticamente. Estas emulsiones son sistemas coloidales líquido-líquido con baja concentración de aceite y surfactante (<5%) y con un alto contenido acuoso (>95%), una composición justamente opuesta a las de la micelas reversas. Es así que estas emulsiones de gel W/O pueden solubilizar grandes cantidades de compuestos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos.

1.6.1.2. Síntesis en solventes orgánicos puros

Estos sistemas se utilizan para aquellas reacciones que son normalmente imposibles de realizarse en medio acuoso (esterificación,

transesterificación, reacciones sobre nucleófilos o componentes acilo no específicos sensibles al agua), y de esta forma ocurren frecuentemente con altas eficiencias en solventes orgánicos (Zaks & Klibanov, 1985).

Las suspensiones de enzimas en solventes orgánicos puros pueden ser consideradas como sistemas bifásicos sólido-líquido en los cuales una fase está formada por un solvente orgánico y la otra por la enzima sólida hidratada, protegida del contacto con el solvente orgánico por una capa de proteína desnaturalizada (Klibanov, 1986; Kanerva & Klibanov, 1989; Castro, 1999). Estos sistemas se han ensayado con preparados comerciales de la enzima, enzimas en estado cristalino o liofilizadas y enzimas precipitadas con acetona desde una solución acuosa (Zacks & Klibanov, 1984; Rusell & Klivanov, 1988).

Se ha demostrado que el resultado del empleo de estos sistemas es más exitoso con solventes hidrofílicos que con solventes hidrofóbicos. Esto es debido al mayor efecto inactivante de estos últimos por solubilizar la capa de agua que rodea a la enzima y la mantiene activa (Zacks & Klibanov, 1985). Pero ante esto, existen algunas excepciones donde se ha verificado que enzimas suspendidas en solventes miscibles con el agua mantienen su actividad (Zacks & Klibanov, 1984, 1986; Castro, 1999, 2000). El hecho que las enzimas tengan una memoria del pH, hace que el estado de protonación de una enzima en solventes orgánicos refleje el pH de la última solución acuosa donde estuvo la enzima, un fenómeno que pudo ser elucidado directa y cuantitativamente según estudios por espectroscopía FTIR (Constantino *et al.*, 1997). La actividad enzimática máxima puede alcanzarse sólo si el pH de esta última solución, la cual es usualmente aquella de donde la enzima se liofilizó o precipitó, corresponde al pH óptimo de la misma. Finalmente, el proceso de liofilización podría alterar la estructura de la enzima y así puede disminuir la actividad enzimática debido a la rigidez de las enzimas en los solventes orgánicos, los que impiden el plegamiento propio de la conformación catalíticamente activa.

Las suspensiones de enzimas sólidas en solventes orgánicos presentan ventajas tales como permitir llevar a cabo procesos a muy altas temperaturas, cambiar la especificidad de la enzima por los sustratos o

recuperar fácilmente el biocatalizador debido esto último, a que al detenerse la agitación de la enzima, decanta y puede ser separada del solvente y de los productos, obteniéndose un alto rendimiento y reteniéndose una alta estereoespecificidad (Zacks & Klivanov, 1984, 1985; Klivanov, 2001; Dickinson & Fletcher, 1989). En solventes orgánicos anhidros las enzimas son muy rígidas, quedando cinéticamente atrapadas en su conformación nativa previa. El solvente orgánico no es el que estabiliza la enzima en sí mismo evitando la desnaturalización, sino que la ausencia de agua en el medio es la causa del retardo en el desenrollamiento enzimático. Este efecto es mayor en los solventes orgánicos puros que en los medios orgánicos-acuosos.

El empleo de estos sistemas en muchos casos ha sido ventajoso, pero en otros no tanto, ya que puede provocar, por ejemplo, la disminución de la actividad enzimática y la insolubilización de los sustratos en muchos de los solventes hidrofóbicos utilizados.

Los medios orgánicos puros al igual que las mezclas orgánicas-acuosas ya mencionadas, no son los únicos medios para realizar reacciones catalizadas por enzimas. Existen otros mecanismos como por ejemplo, el empleo de fluidos supercríticos, medios acuosos frizados, soluciones orgánicas sobreenfriadas y conversión sólido a sólido. Alguno de estos medios tienen relación con los solventes orgánicos tales como los fluidos supercríticos y las mezclas orgánicas sobreenfriadas; en tanto que otros métodos, como la síntesis en estado frizado, usualmente utilizan agua frizada como solvente (Bordusa, 2002).

1.6.1.3. Síntesis en sistemas heterogéneos sólido-líquido

Estos sistemas corresponden a aquellos en el que el biocatalizador se presenta en forma inmovilizada. Esta inmovilización puede realizarse mediante modificaciones físicas y químicas de las enzimas que participan en estas reacciones (Khmelnitsky *et al.*, 1988; Adlercreutz, 1991; Arroyo, 1998).

Un ejemplo de inmovilización enzimática por modificación física se puede realizar por unión no covalente (adsorción) a matrices sólidas inertes

(vidrios porosos, poliamida, celite, sílica, polipropileno, alúmina, etc). La actividad y estabilidad de las enzimas inmovilizadas por adsorción dependerán de la naturaleza del soporte utilizado (Zhang *et al.*, 1996; Capellas *et al.*, 1996; Xing *et al.*, 2000; Van Unen *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003).

La inmovilización no covalente de las enzimas puede llevarse a cabo por entrapamiento del catalizador en hidrogeles. Estos hidrogeles son complejos enzima-polímeros coloidales hidratados sin uniones covalentes. Las ventajas de esta inmovilización es que necesita una baja concentración de enzima para obtener derivados activos y de no alterar la estructura enzimática. La desventaja es que el entrapamiento requiere controles muy rigurosos de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la enzima (Fukuy *et al.*, 1980; Brink & Tramper, 1987; Kise *et al.*, 1990; Arroyo, 1998).

Las enzimas también pueden ser unidas covalentemente a la superficie de un soporte sólido lo que se refleja en una elevada estabilidad catalítica debido principalmente al decrecimiento en la movilidad conformacional y, además de esto permite una fácil recuperación del biocatalizador (Weetall, 1985; Illianes, 1999; Giorno & Drioli, 2000). Un ejemplo de esto lo constituyen los microcristales de enzima entrecruzada (CLECs, *cross-linked enzyme crystals*) que son preparaciones de biocatalizadores con altas actividades y estabilidades (Håring & Scheier, 1999). En los cristales, las enzimas están ordenadas en un arreglo espacial preciso, originalmente unido por puentes covalentes. Por difracción de rayos X, se vio que el gran espacio entre las enzimas contiene usualmente agua. El entrecruzamiento irreversible dentro de los cristales se logra con un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. Estas condiciones de entrecruzamiento deben estar cuidadosamente optimizadas para asegurar tanto la alta estabilidad como la actividad de la catálisis en los CLECs, ya que las limitaciones dadas por la transferencia de masa de los sustratos son desventajas conocidas de estos sistemas. Tanto subtilisina como termolisina inmovilizadas en forma de CLECs fueron utilizadas exitosamente para acilaciones regioselectivas (Wang *et al.*,

1997), resolución de racematos (Shah *et al.*, 1999), síntesis de péptidos e hidrólisis suave de amidas peptídicas (Wang *et al.*, 1996).

En general para mejorar la solubilidad y actividad de las proteasas no se necesitan esencialmente modificaciones covalentes, ya que puede alcanzarse por modificaciones físicas con lípidos (Okahata, 1997), surfactantes (Okazaki, 1997), PEG y otros polímeros. Este tipo de modificaciones puede lograrse por liofilización de la enzima en presencia de los aditivos apropiados. El aumento significativo de la actividad enzimática en solventes orgánicos que se puede obtener recubriendo la enzima con surfactantes excede usualmente al que se obtiene por modificaciones químicas. Así, la liofilización de las enzimas en presencia de lioprotectores preservantes de la estructura, tales como ligandos similares a los sustratos (Russell & Klibanov, 1988; Prestrelski *et al.*, 1993), azúcares y polioles (Debulis & Klibanov, 1993; Adlercreutz, 1993; Dai & Klibanov, 1999), ciertas sales inorgánicas (Khmelnitsky *et al.*, 1994) o éteres corona (Broos *et al.*, 1995) frecuentemente producen preparaciones enzimáticas que son hasta cuatro veces más activas que aquellas obtenidas sin aditivos. El amoldamiento molecular dejado en la enzima por aquellos ligandos similares al sustrato sería una posible explicación. Esta conformación alterada del sitio activo de la enzima permanecería luego de la liofilización, seguida de la extracción del ligando en un solvente anhidro adecuado. La conformación altamente activa inducida por el ligando permanece inmutable en el medio anhidro debido a la rigidez estructural de las enzimas en solventes orgánicos. La naturaleza del ligando usado para el amoldamiento de la subtilisina también permite el control racional de las especificidades enzimáticas (Rich & Dordick, 1997). El modelamiento molecular y los estudios dinámicos revelaron que los cambios estructurales en el sitio activo de las enzimas amoldadas, parecieran ser mayores que lo esperado, influyendo tanto en la unión del sustrato como en la maquinaria catalítica de la enzima. La única limitación aparente a esta aplicación sería que el ligando molde debe ser soluble en el solvente orgánico del medio de reacción para poder ser removido.

El proceso de inmovilización se hace en medio acuoso. De este modo, cuando la enzima es introducida a un sistema bifásico (líquido-líquido) se forma un sistema sólido-líquido-líquido, y queda así protegida del contacto directo con la interfase solvente orgánico-agua y por ello es frecuentemente más estable que un sistema líquido-líquido (Khmelnitsky *et al.*, 1988).

Las ventajas que poseen los sistemas sólido-líquido-líquido con respecto a los sistemas líquido-líquido son por un lado, facilitar la separación de la enzima desde el medio de reacción para su posterior reutilización, y por otro, poseen una velocidad de reacción superior debida a la presencia de una mayor interfase que asegura menores restricciones difusionales durante la transferencia de sustratos y/o productos. La limitación en la transferencia de masa ocasionada por la presencia de la fase sólida constituye una desventaja para el empleo de estos sistemas. Esto se acentúa, principalmente, cuando existen diferencias marcadas en la hidrofobicidad de la matriz y los reactantes que difunden.

1.6.2. Ingeniería de sustratos

La mayoría de las proteasas son capaces de reconocer más de un aminoácido, pero no todas las enzimas son capaces de acoplar cualquier secuencia aminoacídica. Debido a la especificidad que las proteasas tienen hacia un determinado aminoácido, sólo aquellos donantes de acilo que posean un residuo aminoacídico específico en posición C-terminal, pueden ser acoplados sin posibles reacciones laterales. Así, por ejemplo, tripsina necesita de la presencia de residuos de Arg o Lys como componentes carboxílicos terminales en la estructura del donante de acilo (Bordusa, 2002). En el caso de observarse formación de productos secundarios, el grupo saliente del éster donador de acilo constituye la única variable manipulable para suprimirla. Dicho grupo es el que se modifica comúnmente en el método cinético. De esta forma, la manipulación del grupo saliente es útil para aumentar la especificidad enzimática hacia un aminoácido originalmente menos específico para la enzima, acelerando así la velocidad de la reacción (Miyazawa *et al.*, 2001 a, b). Contrariamente al efecto

directo sobre la especificidad enzimática y sobre la relación aminólisis/hidrólisis de un donante de acilo y, en consecuencia, sobre el rendimiento de la reacción, debido a que el acil intermediario formado es siempre el mismo, independientemente del cambio producido en el grupo saliente.

La metodología de la manipulación del grupo saliente está orientada para aumentar la especificidad de la enzima, en contraposición a esto, surgieron los sustratos miméticos. Estos son excelentes herramientas para la síntesis peptídica mediada por enzimas ya que dichos sustratos son preparados para unirse dentro del sitio activo de la enzima (Bordusa, 2002). Esto hace que proteasas serínicas y cisteínicas reaccionen con aminoácidos o secuencias peptídicas no específicas, sin necesidad de alterar ni la enzima ni el medio de reacción. La ventaja de esta aplicación es que la unión peptídica formada no es reconocida por el biocatalizador y, por lo tanto, no está sujeta a las reacciones hidrofílicas secundarias (Bordusa, 1997).

1.6.3. Ingeniería de enzimas

Este término se refiere a un conjunto de técnicas que incluyen modificaciones químicas o de ingeniería genética de las enzimas participantes en este tipo de reacciones.

De este modo, la disolución de la enzima en solventes anhidros puede lograrse también por modificación química de la enzima, evitando las reacciones colaterales indeseadas. Dichas modificaciones van desde una acetilación no específica de los grupos amino libres de la enzima hasta la unión de compuestos anfipáticos a la superficie enzimática (DeSantis, 1999). Por ejemplo, la unión covalente de polietilenglicol (PEG) o del metoxipolietilenglicol (MPEG), que representan los polímeros anfipáticos más comúnmente usados, median la solubilidad enzimática tanto en agua como en numerosos solventes orgánicos. Las cadenas hidratadas de PEG crean una caparazón acuosa alrededor de la molécula enzimática, que estabiliza la conformación activa del sitio catalítico, promoviendo así la actividad catalítica

de la enzima en solventes orgánicos anhidros (Bovara *et al.*, 1997). Por dicroísmo circular y medidas de la fluorescencia intrínseca de las proteínas (Bovara *et al.*, 1997), se demostró que PEG-subtilisina adoptan conformaciones idénticas en agua y dioxano. Por análisis cinético de inactivación enzimática combinado con modelamiento molecular computacional, se observó que el aumento del número de puentes de hidrógeno para MPEG-tripsina sería el responsable del aumento de la estabilidad enzimática.

Otra alternativa para el mejoramiento de la actividad catalítica de una enzima es el uso de técnicas orientadas a la manipulación genética de las proteasas (Jaeger & Reetz, 2000; Arnold, 1990, 2001). Un ejemplo de estas técnicas genéticas es la mutagénesis dirigida, la cual analiza la relación entre la estructura y la función enzimática.

2. Objetivos

- 1) Estudiar la estabilidad de las proteasas presentes en el extracto crudo del látex de *Asclepias curassavica* en distintos sistemas buffer acuoso:solvente orgánico, a fin de poder seleccionar el más apropiado para la síntesis de péptidos.
- 2) Lograr la síntesis de un dipéptido en los medios seleccionados.

3. Materiales y Métodos

3.1. Elección de los solventes a ensayar: Sistemas monofásicos y sistemas bifásicos

Para sistematizar el estudio de los medios en los cuales probar la estabilidad de las proteasas presentes en el extracto crudo de *Asclepias curassavica*, se hizo un diseño estadístico de solventes orgánicos, que fueron agrupados en distintos clusters de acuerdo a la similitud de sus parámetros fisicoquímicos (descriptores) extraídos de la literatura:

- ✓ π^* : índice de polaridad/polarizabilidad,
- ✓ β : capacidad para aceptar puentes de hidrógeno,
- ✓ α : capacidad dadora de puentes de hidrógeno,
- ✓ $E_T(30)$: unión al colorante 4-(2,4,6-trifenilpiridino)-2,6-difenilfenóxido de betaína,
- ✓ δ^2_H : parámetro de solubilidad de Hildebrand,
- ✓ V_x : volumen característico molecular,
- ✓ η_{25} : índice de refracción,
- ✓ $\log P$: logaritmo del coeficiente de partición de un soluto en un sistema bifásico estándar octanol-agua,
- ✓ ϵ : constante dieléctrica,
- ✓ μ : momento dipolar.

Los descriptores π^* , α y β , son llamados parámetros solvatocrómicos. El primero mide la habilidad del solvente para estabilizar una carga o un dipolo debido a su efecto dieléctrico; el segundo, la capacidad de un solvente de donar un protón a un enlace hidrógeno entre el solvente y el soluto; el tercero, la habilidad de un solvente de aceptar un protón (donado como un par electrónico) en un enlace de hidrógeno entre el solvente y el soluto. El parámetro de Hildebrand (δ^2_H) es una medida de las interacciones solvente-solvente que son interrumpidas por la creación de una cavidad para el soluto (densidad de energía cohesiva total de una solución). $E_T(30)$ está relacionado con la polaridad del solvente (Kamlet *et al.*, 1983).

Para agrupar los solventes según sus propiedades a partir de los valores experimentales de los descriptores mencionados (que están reportados para 72 solventes: Abraham & McGowan, 1987; Abboud & Notario, 1999; Burke, 1984; Reichardt, 1994) se hizo un análisis de cluster empleando el software estadístico MINITAB vs 13.20. De este análisis se obtuvieron 17 grupos de solventes; los solventes de cada grupo resultante tendrían, entonces, propiedades similares en relación a las variables empleadas (Tabla 3). Los solventes marcados con (*) son los más adecuados para emplear porque sus parámetros se diferencian más con el grupo anterior o con el siguiente.

<i>Grupo</i>	<i>Solventes</i>
I	Etilenglicol (*), formamida(*)
II	Trifluoroetanol, hexafluoro-2-propanol
III	Iodobenceno, bromobenceno, clorobenceno (*), anisol (*), fenetol
IV	Benceno (*), tolueno (*), <i>o</i> -xileno, <i>m</i> -xileno, <i>p</i> -xileno 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, diclorometano
V	1,1,2,2-tetracloroetileno, tetraclorometano, 1,1,2-tricloroetileno, 1 bromobutano
VI	1-bromoheptano, 1,1,1-tricloroetano
VII	Decalina, hexadecano
VIII	Ciclohexano (*), decano, octano, heptano, isooctano, hexano, pentano
IX	<i>n,n</i> -butiléter, dietiléter (*), diisopropiléter
X	Metanol (*), ácido acético
XI	Etanol (*), 1-propanol
XII	2-propanol, 1-butanol (*), 3-metil butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, <i>t</i> -butanol, 1-heptanol, 1-octanol
XIII	Benzonitrilo, nitrobenceno, acetofenona, piridina (*) benzoato de etilo
XIV	Dimetilsulfóxido, <i>N,N</i> -dimetilformamida (*), <i>N</i> -metilpirrolidinona, dimetilacetamida
XV	Carbonato de propileno, nitrometano, acetonitrilo (*), nitroetano
XVI	Propionitrilo, ciclohexano (*), acetona, butanona
XVII	Tetrahidrofurano, dioxano, acetato de etilo, 1,2-dimetoxietano, acetato de butilo, acetato de pentilo

Tabla 3. Grupos de solventes orgánicos resultantes del diseño estadístico (software MINITAB vs 13.20) en base a los parámetros fisicoquímicos de dichos solventes.

Para los ensayos de estabilidad se seleccionó un solvente orgánico de cada cluster.

Los solventes ensayados fueron los detallados en la Tabla 4.

<i>Sistemas monofásicos</i>	<i>Sistemas bifásicos</i>
Etanol	Benceno
Metanol	Octanol
DMSO	Dietil éter
Dioxano	Dicloroetano
Acetonitrilo	Hexano
Etilenglicol	Clorobenceno
Acetona	Acetofenona
	Tricloroetileno
	Acetato de etilo

Tabla 4. Solventes orgánicos utilizados en los sistemas monofásicos y bifásicos para los ensayos de estabilidad de las proteasas del E.C. de *Asclepias curassavica*.

3.2. Ensayos de estabilidad en los distintos sistemas

Dichos ensayos se llevaron a cabo en un medio de reacción conteniendo solvente orgánico y buffer acuoso bórico/borato 0,1 M pH 8,5 en una relación de 50:50. En este medio de reacción se incubaron, a temperatura ambiente, diluciones del extracto crudo de *Asclepias curassavica* en la fase acuosa del medio de tal forma que tuvieran una concentración final en el sistema de 2 mg de proteínas/ml.

En el caso de los sistemas bifásicos, la incubación se hizo con agitación magnética continua a 120 rpm. Las muestras fueron extraídas de la fase acuosa por triplicado a tiempo 0, 1, 2, 3, 6, y 24 hr de incubación. Se determinó la actividad caseinolítica residual para cada tiempo indicado, tal como se especificó en el ítem B.3.2.1.(capítulo 1), y se expresó en porcentaje de actividad residual. La actividad obtenida al tiempo cero fue considerada el 100% y el resto de las medidas obtenidas fueron referidas a ésta. Previo a los ensayos de estabilidad de los sistemas monofásicos y de los bifásicos, el buffer bórico-borato junto con el solvente orgánico permanecieron en contacto para llegar al estado de saturación durante 24 hr debido a su escasa solubilidad en agua.

3.3. Selección del pH y de la temperatura para los ensayos de síntesis de péptidos

La selección del pH óptimo en las condiciones de reacción para los ensayos de síntesis se realizó conforme a los resultados experimentales indicados en el ítem B.4.2. (capítulo 1), el cual resultó ser de 8,5. Se prestó especial énfasis en seleccionar cuidadosamente este parámetro puesto que su valor es decisivo para estos ensayos, no solamente debido a que es un parámetro esencial para que las enzimas puedan desarrollar su máxima actividad, sino también para que los sustratos (derivados de aminoácidos) se encuentren en el estado de ionización más favorable para interactuar con el sitio activo de las proteasas.

Para la elección de la temperatura óptima de síntesis, se tuvo en cuenta el ensayo de estabilidad a la temperatura del extracto crudo (ver inciso B.4.4., capítulo 1) y la temperatura utilizada en el mismo tipo de ensayo por otros autores (Morcelle del Valle, 2004; Trusek-Holownia, 2003). Así, la temperatura elegida fue de 25 °C.

3.4. Inmovilización de las enzimas para los ensayos de síntesis

Las enzimas presentes en el extracto crudo de *Asclepias curassavica* liofilizado fueron inmovilizadas por deposición sobre un soporte sólido (poliamida-6, EP-700, tamaño de partícula <800 µm, diámetro de poro promedio 50-300 nm, área superficial según el método BET 8,4 m²/g; Azko, Alemania) según el siguiente procedimiento: 100 mg del extracto crudo en polvo fueron disueltos en 1 ml de buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,2 con EDTA 1 mM y luego mezclado con 1 gr de soporte en presencia de 50 mg de DTT. La mezcla resultante fue luego secada al vacío (aproximadamente 40 µbar) durante 24 h (Clapés *et al.*, 1999).

El empleo del extracto crudo y no de las fracciones purificadas, se debe a que el mismo podría contener sustancias que influyen en la distribución del agua en los sistemas empleados ayudando a la enzima a retener agua (Zacks & Klibanov, 1985) o estabilizándolo frente al disolvente orgánico, obteniéndose

así mayores grados de conversión y mejores rendimientos que mediante el empleo de las fracciones enzimáticas puras (Clapés *et al.*, 1999).

3.5. Selección de los sustratos (donor de acilo y nucleófilo) a emplear en los ensayos de síntesis de péptidos

La selección del donador de acilo se hizo en base a los resultados obtenidos en el ensayo de preferencias por los sustratos sintéticos *N*-Cbz-aminoácido *p*-nitrofenilados (ítem B.4.9., capítulo 1) de las proteasas presentes en el extracto crudo, a fin de elegir el derivado aminoacídico por el que las mismas mostraran mayor afinidad. Si bien la mayor preferencia la exhibieron por el derivado de glutamina (*N*-Cbz-Gln *p*-nitrofenilo), también demostraron tener una significativa preferencia por el derivado de alanina (*N*-Cbz-Ala *p*-nitrofenilo). Por este motivo, por la solubilidad en los sistemas de reacción elegidos y debido a la disponibilidad del derivado *Z*-AlaOMe (*N*-Cbz-Ala oximetil-éster), éste fue el sustrato seleccionado como donador de acilos para la síntesis péptidica planteada. Dicho sustrato, se comportó exitosamente en varios ensayos de síntesis (Trusek-Holownia, 2003; Kumar & Bhalla, 2005).

En el caso del nucleófilo, AlaOMeHCl (L-Alanina metil éster Clorhidrato), la selección se hizo en base a su solubilidad en los sistemas de reacción elegidos y también a la alta hidrofiliidad del mismo, a fin de que fuera lo suficientemente fuerte para poder competir con el agua del medio. Los sustratos utilizados son de Bachem, California.

Las concentraciones de ambos sustratos se indican en el punto 3.7. de este mismo apartado.

3.6. Síntesis en sistemas bifásicos con enzima liofilizada sin inmovilizar

En algunos de los ensayos de síntesis en sistemas bifásicos se debió emplear el extracto crudo liofilizado sin inmovilizarlo en ningún soporte. Para ello, los cálculos se basaron en función del porcentaje de asclepaína c I activa (fracción proteásica principal) en el extracto crudo de *Asclepias curassavica* el cual fue cercano al 44% (ítem C.4.12., capítulo 1). La concentración de enzima

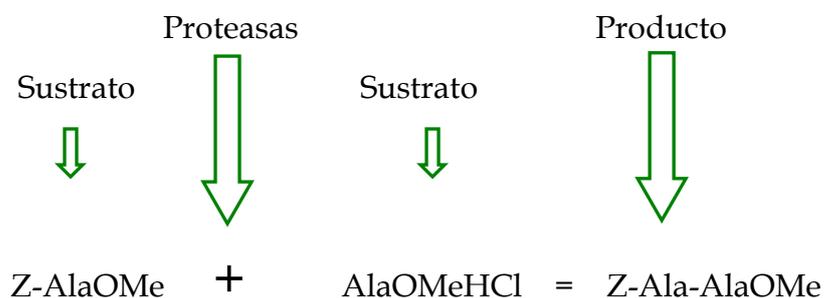
fue de 0,5325 μM en el medio de reacción, siendo la relación de concentraciones entre el sustrato donador de acilo y la enzima de 56.340.

3.7. Ensayos de síntesis de péptidos por control cinético

Los experimentos realizados en los sistemas monofásicos y en algunos de los sistemas bifásicos se llevaron a cabo en viales conteniendo 200 mg de preparación inmovilizada, 30 mM del acil donador (Z-AlaOMe), 50 mM del nucleófilo (AlaOMeHCl), 50 mM de TEA, 1ml de buffer bórico-Borato 0,1 M pH 8.5 y 1 ml de solvente orgánico (monofásico: DMSO, bifásico: acetato de etilo). Las reacciones tuvieron lugar bajo atmósfera de argón para evitar la oxidación de los sitios catalíticos de las peptidasas, en un agitador orbital (120 rpm) termostatzado a 25 °C

Por otro lado, también se realizaron experiencias en sistemas bifásicos utilizando extracto crudo liofilizado, cuya concentración ya se indicó previamente (inciso 3.6.). Los ensayos se realizaron en viales conteniendo 0,5325 μM del polvo enzimático, 30 mM del acil donador (Z-AlaOMe), 50 mM del nucleófilo (AlaOMeHCl), 50 mM de TEA, 1ml de buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5 y 1 ml del solvente orgánico acetato de etilo.

La reacción esperada se muestra a continuación:



El producto de síntesis, Z-Ala-AlaOMe, posee una elevada hidrofobicidad y se disolvió adecuadamente en los solventes seleccionados para la síntesis peptídica (ver ítem 4.1, capítulo 2). Esta característica es significativa, especialmente para los medios de reacción bifásicos, puesto que

permite desviar el equilibrio de la reacción hacia la síntesis por partición del producto en la fase orgánica. Esto significa que a medida que el producto se va formando es extraído por la fase orgánica, facilitando también su posterior separación de la enzima. La selección de este sustrato, se hizo en base a su factibilidad de obtener un patrón comercial que simplifique su determinación analítica en los procesos de síntesis. A pesar de la existencia del patrón en el mercado, no se encontró evidencia bibliográfica que indicara un origen del sustrato por catálisis enzimática, aunque sí por catálisis química (Plass, 2000; Stanley, 2001).

Se realizaron los siguientes blancos de reacción: un blanco sin enzima para descartar la síntesis química y un blanco de enzima sin sustratos a fin de descartar la liberación de péptidos que pudieran confundirse con el producto deseado. El tiempo cero se tomó cuando se agregó la enzima. La composición de cada ensayo simultáneo fue la detallada en la Tabla 5.

	<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Blanco sin enzima</i>	<i>Blanco sin sustratos</i>
Z-AlaOMe	30 mM	30 mM	-----
AlaOMeHCl	50 mM	50 mM	-----
Enzima Inmovilizada	200 mg	-----	200 mg
Buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5	1 ml	1 ml	1 ml
DMSO	1 ml	1 ml	1 ml

A

	<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Blanco sin enzima</i>	<i>Blanco sin sustratos</i>
Z-AlaOMe	30 mM	30 mM	-----
AlaOMeHCl	50 mM	50 mM	-----
Enzima Inmovilizada	200 mg	-----	200 mg
Buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5	1 ml	1 ml	1 ml
Acetato de Etilo	1 ml	1 ml	1 ml

B

Tabla 5. Composición de los medios de reacción de síntesis y de los blancos. **A.** Sistema monofásico. **B.** Sistema bifásico.

Las reacciones se llevaron a cabo en recipientes cerrados durante 72 h con agitación magnética constante (120 rpm). Se tomaron muestras (tiempos 0, 1, 3, 6, 24, 48 y 72 hr) de 50 µl del medio de reacción para el caso de los sistemas monofásicos y 50 µl de la fase orgánica y el mismo volumen de la fase acuosa para el caso de los sistemas bifásicos. La reacción se detuvo por el agregado de 10 µl de ácido acético glacial y se mantuvo en freezer hasta el momento de su utilización.

3.8. Seguimiento de las reacciones de síntesis enzimática

3.8.1. Por cromatografía en capa fina (TLC)

Dichas cromatografías en capa fina se realizaron utilizando cromatofolios de silica gel F₂₅₄ (Merck, Alemania). La fase móvil empleada fue cloroformo/metanol 9/1 (v/v). Los compuestos se pusieron de manifiesto por pulverización con solución etanólica de ninhidrina al 2% con posterior calentamiento en platina hasta aparición de las manchas.

Para determinar la identidad de las manchas, se sembraron las muestras junto con los blancos y patrones de sustratos y producto esperado (Z-Ala-Ala-OMe, Bachem, California). Los patrones AlaOMeHCl y Z-AlaOMe y el producto se prepararon en DMSO para la síntesis en los sistemas monofásicos y en acetato de etilo para los correspondientes a los sistemas bifásicos. La concentración de los mismos fue equivalente a la utilizada en los ensayos. En cada corrida fueron sembrados 10 µl de patrones y muestras.

3.8.2. Por Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Para la confirmación de la aparición del producto en forma analítica cualitativa, las muestras del sistema monofásico (tiempo: 6 hr) y las correspondientes al sistema bifásico, tanto el ensayo con enzima inmovilizada

como con el extracto crudo liofilizado (tiempo: 72 hr), fueron analizadas por HPLC (KNK 500-A Series, Konik) empleando una columna cuya fase estacionaria fue RP C-18 (Lichrospher 100 RP 18 5 μ m, 125 \times 4 mm, Merck, Alemania), fase móvil metanol/agua/ácido fosfórico 65/35/0,05 (v/v/v), velocidad de flujo 1 ml/min. Se inyectaron 200 μ l de patrones de concentración 0,1 mg/ml e igual volumen de muestras disueltas en fase móvil. La detección se hizo por absorbancia de los solutos eluidos a 254 nm.

4.2. Seguimiento de las reacciones de síntesis enzimática

4.2.1. Por cromatografía en capa fina (TLC)

4.2.1.1. Sistemas monofásicos

Los resultados obtenidos de la síntesis peptídica por control cinético en medios monofásicos por acción de las enzimas presentes en el extracto crudo de *A. curassavica* se muestran en la figura 7.

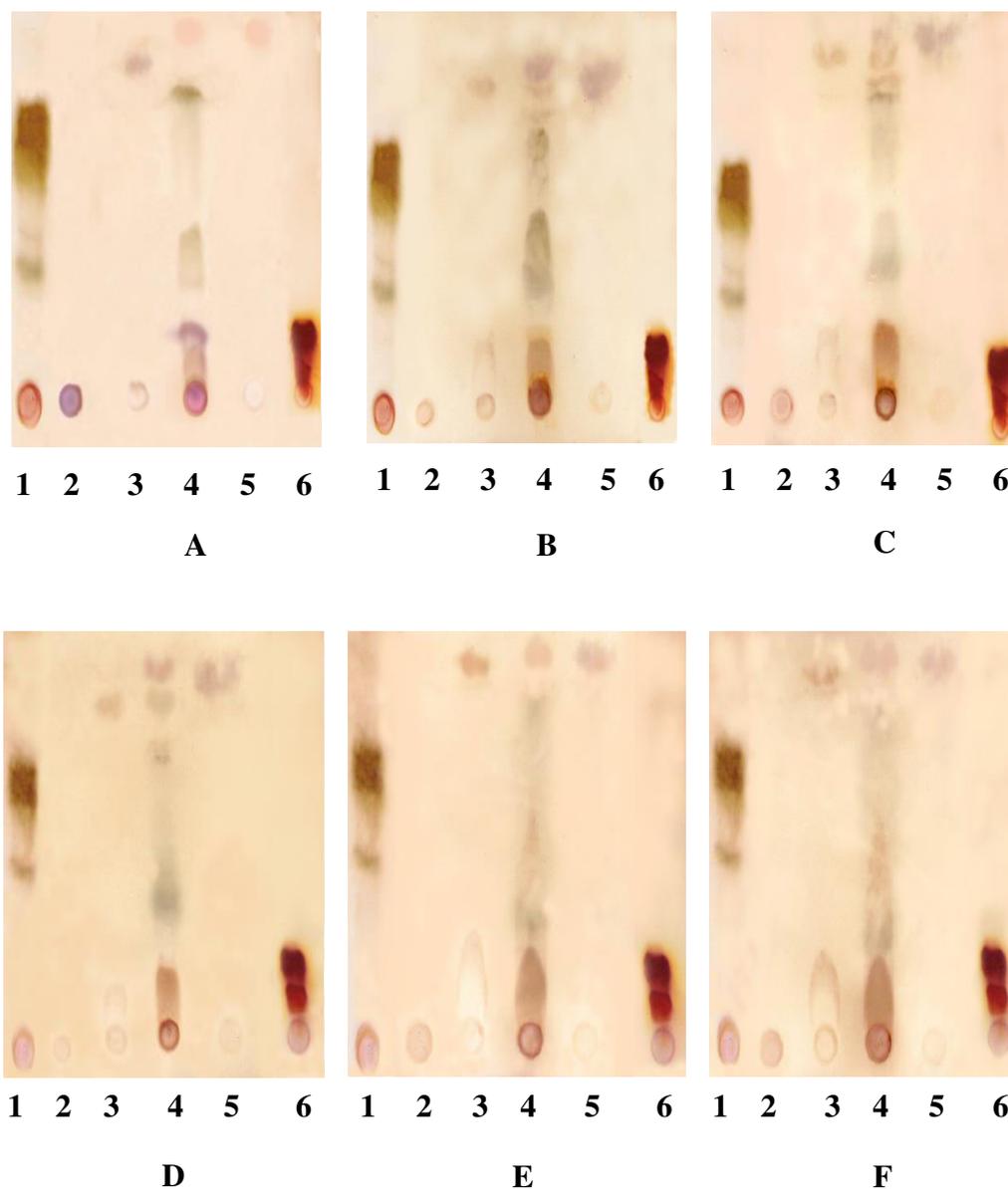




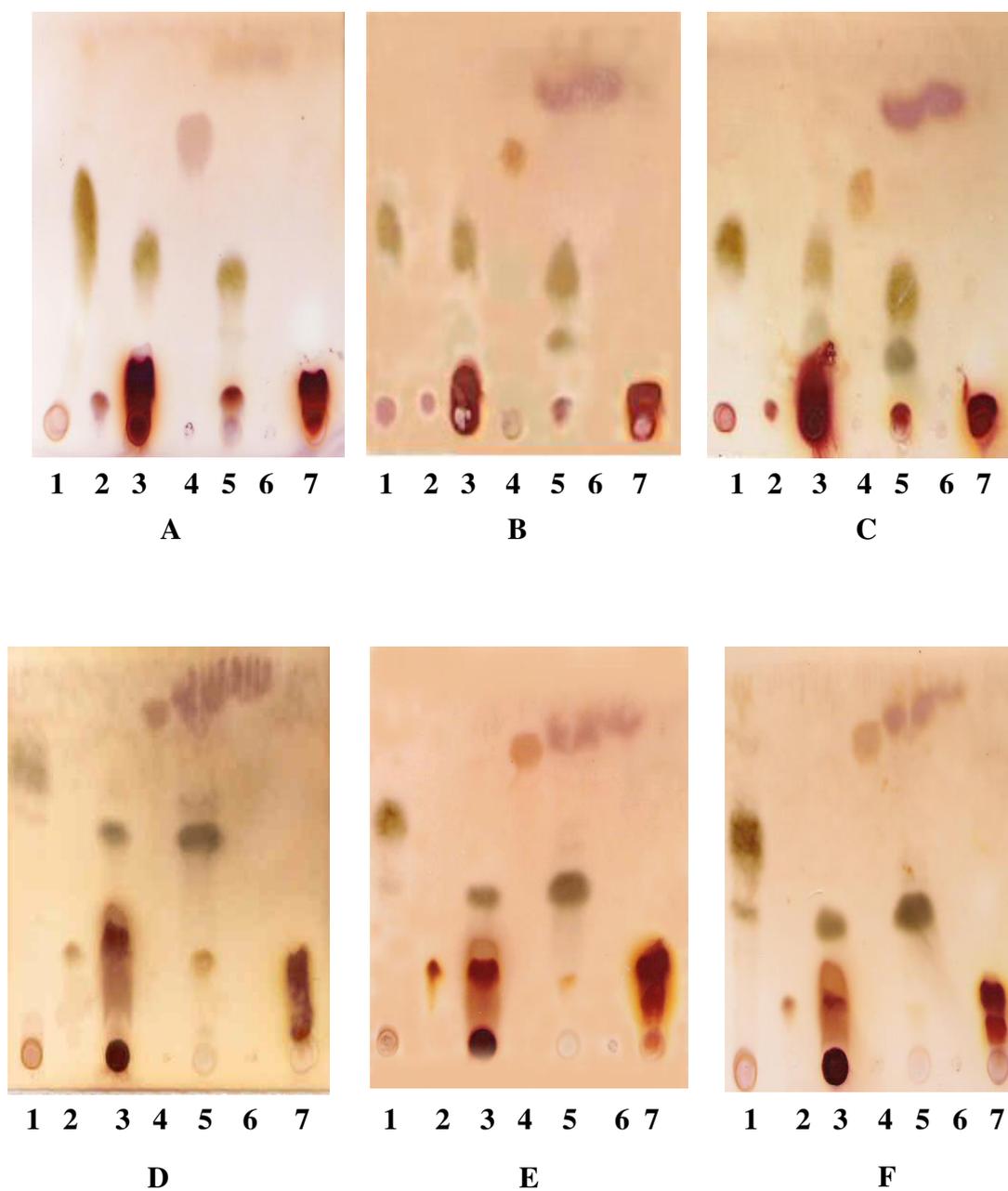
Fig. 7. Síntesis de N-Cbz-Ala-Ala-OMe en medios monofásicos. **A.** Tiempo 0. **B.** 1 hr de reacción. **C.** 3 hr de reacción. **D.** 6 hr de reacción. **E.** 24 hr de reacción. **F.** 48 hr de reacción. **G.** 72 hr de reacción. **1.** Blanco sin sustratos. **2.** Patrón de Ala-OMe.HCl. **3.** Patrón de N-Cbz-Ala-Ala-OMe. **4.** Mezcla de reacción. **5.** Patrón de N-Cbz-Ala-OMe. **6.** Blanco sin enzima.

Como era de esperar, en la figura 7 **A** que corresponde al tiempo 0 de reacción, no se observa formación del producto. En cambio, en la figura 7 **B**, **C** y **D** correspondientes a los tiempos 1 hr, 3 hr y 6 hr, respectivamente, se observa en forma notoria la aparición del producto de la síntesis enzimática. Sin embargo, el producto ya no se visualiza en las siguientes figuras correspondientes a uno, dos y tres días de reacción. Esto puede ser debido a que la enzima se hidroliza, lo cual se correlaciona con la estabilidad de la enzima en el sistema monofásico buffer/solvente dimetilsulfóxido de la figura 5 **C**. En dicha figura puede notarse que a partir de las 6 hr aproximadamente baja en un 10 % la actividad enzimática.

Otro aspecto a destacar, es la ausencia de la formación del producto por medio de síntesis química, como puede apreciarse en la figura 7, en el blanco sin enzima (**6**) de las figuras **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F** y **G**. Esto indicaría la capacidad de las peptidasas de la especie estudiada para realizar uniones peptídicas en el medio de reacción probado.

4.2.1.2. Sistemas bifásicos utilizando peptidasas inmovilizadas

Los resultados obtenidos en la síntesis peptídica por control cinético en medios bifásicos se muestran en la figura 8.



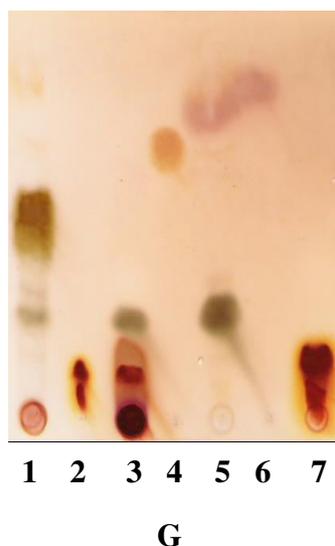


Fig. 8. Síntesis de N-Cbz-Ala-Ala-OMe en medios bifásicos con peptidasas inmovilizadas. **A.** Tiempo 0. **B.** 1 hr de reacción. **C.** 3 hr de reacción. **D.** 6 hr de reacción. **E.** 24 hr de reacción. **F.** 48 hr de reacción. **G.** 72 hr de reacción. **1.** Blanco sin sustratos. **2.** Patrón de Ala-OMe.HCl. **3.** Fase acuosa de la mezcla de reacción. **4.** Patrón de N-Cbz-Ala-Ala-OMe. **5.** Fase orgánica de la mezcla de reacción. **6.** Patrón de N-Cbz-Ala-Ala-OMe. **7.** Blanco sin enzima.

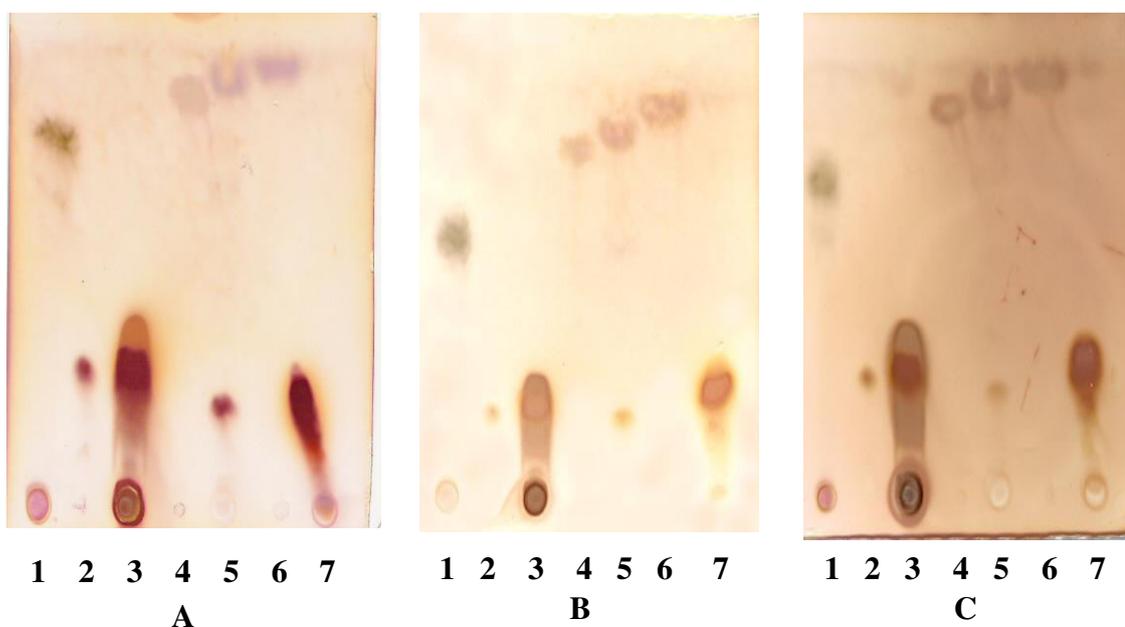
Los resultados de esta figura revelan que no se produjo formación del producto en ninguna de las fases (acuosa y orgánica) del medio de reacción como así tampoco en ninguno de los tiempos ensayados. La ausencia de la síntesis peptídica puede atribuirse al hecho que como la poliamida interacciona en forma significativa con el agua, desplaza a la enzima inmovilizada, y ésta se desnaturaliza en la interfase sólido-líquido, por consiguiente no puede actuar para catalizar la reacción de síntesis (Fitzpatrick & Klibanov, 1991; Schneider, 1991; Wescott & Klibanov, 1994).

Es importante destacar que tanto en los sistemas monofásicos como los bifásicos no se produjo síntesis química. Este resultado no se ha observado con otras proteasas en las mismas condiciones en las que se ha verificado importante síntesis química en el medio de reacción (Morcelle del Valle, 2004).

4.2.1.3. Sistemas bifásicos utilizando extracto crudo liofilizado

Esta experiencia se diseñó con el objeto de investigar si la ausencia de la síntesis peptídica en el punto anterior (ítem 4.2.1.2), se debió al sistema de reacción empleado (solvente acuoso-solvente orgánico) o si era la forma en que se presentaba el biocatalizador, es decir inmovilizado en un soporte de poliamida.

Los resultados se observan en la figura 9.



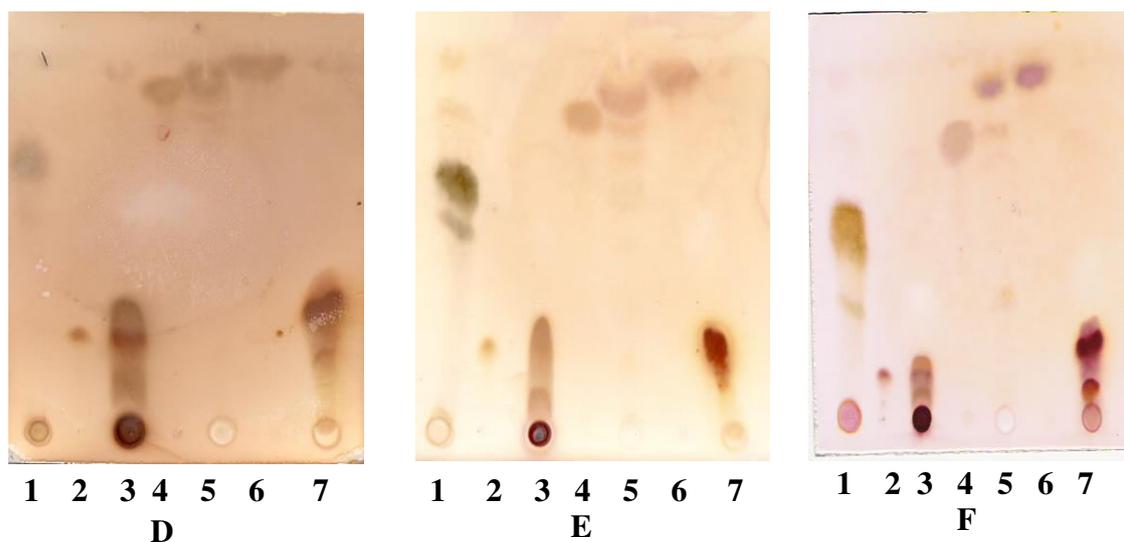


Fig. 9. Síntesis de N-Cbz-Ala-Ala-OMe en medios bifásicos con extracto crudo liofilizado. **A.** 1 hr de reacción. **B.** 3 hr de reacción. **C.** 6 hr de reacción. **D.** 24 hr de reacción. **E.** 48 hr de reacción. **F.** 72 hr de reacción. **1.** Blanco sin sustratos. **2.** Patrón de Ala-OMe.HCl. **3.** Fase acuosa de la mezcla de reacción. **4.** Patrón de N-Cbz-Ala-AlaOMe. **5.** Fase orgánica de la mezcla de reacción. **6.** Patrón de N-Cbz-Ala-OMe. **7.** Blanco sin enzima.

Los resultados demostraron que recién a las 24 hr de estar en contacto la enzima con los sustratos, acil donador y nucleófilo, se formó el producto esperado sólo en la fase orgánica, aunque en muy poca concentración (figura 9 D). Si se observa con detenimiento, la cantidad de producto formado aumenta con el tiempo, pero no llega según esta estimación cualitativa por TLC, a la concentración que rindió en los solventes monofásicos. La escasa cantidad de producto en este ensayo pudo deberse a que el mismo experimentó una hidrólisis parcial por la lentitud del mismo de particionar a la fase orgánica.

4.2.2. Por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Esta técnica fue empleada con la finalidad de confirmar de manera analítica la presencia del producto originado por la catálisis enzimática de las proteasas de *Asclepias curassavica*, tanto en el medio monofásico como en el medio bifásico empleando, en este último caso, la enzima inmovilizada y el extracto crudo liofilizado.

4.2.2.1. Sistemas monofásicos

Los resultados de los cromatogramas confirmando la formación del producto Z-Ala-Ala-OMe en el sistema monofásico pueden observarse en la figura 10.

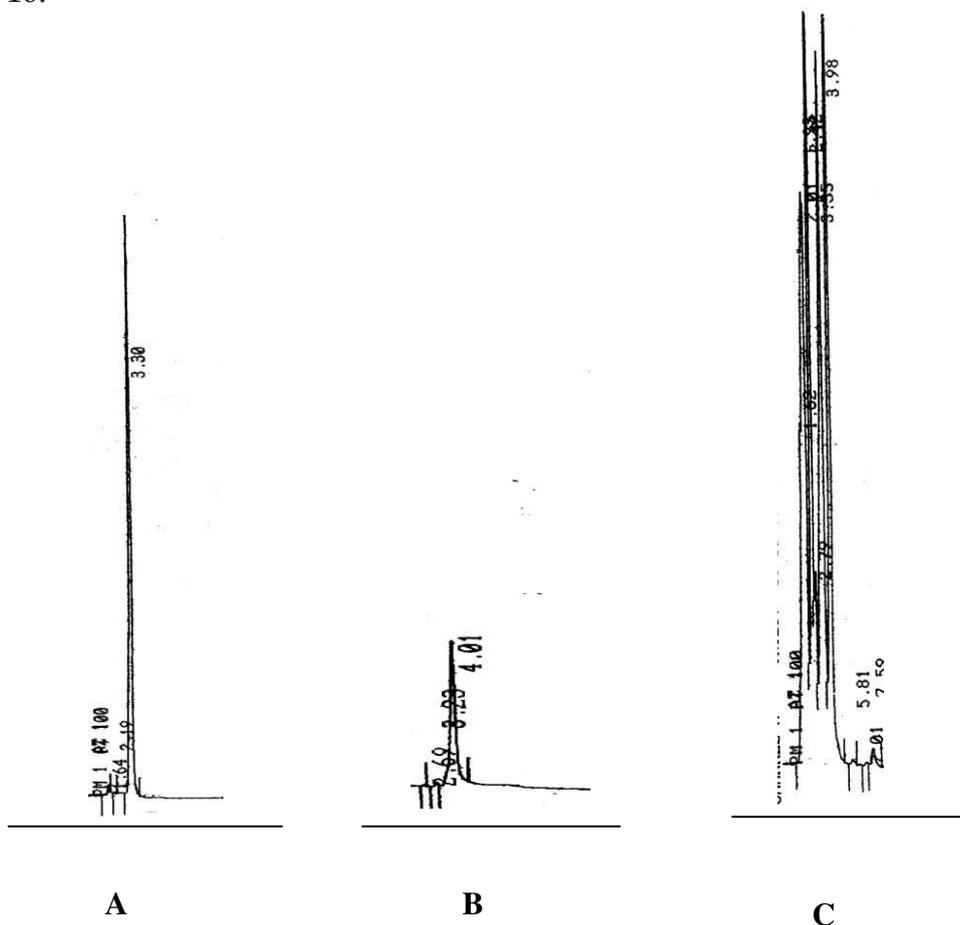


Fig. 10. Cromatogramas obtenidos por HPLC de la síntesis de Z-Ala-Ala-OMe. A. Patrón Z-Ala-Ala-OMe. B. Patrón de Z-Ala-OMe. C. Mezcla de reacción luego de 6 hr de reacción.

Como puede observarse en la figura 10 C aparece el producto formado con un tiempo de retención $t_r = 3.35$, que es compatible con el patrón del mismo $t_r = 3.30$ de la figura 10 A. La sustancia que aparece con un $t_r = 3.98$ en esta misma figura (10 C) corresponde al patrón del nucleófilo con un $t_r = 4.01$ de la figura 10 B. Cabe aclarar que el patrón del acil donador no se pudo mostrar debido a que no absorbe a 254 nm que es la longitud de onda que mide el equipo utilizado para esta determinación.

4.2.2.2. Sistemas bifásicos

Los resultados de los cromatogramas con la enzima inmovilizada se muestran en la figura 11 y los correspondientes al extracto crudo liofilizado en la figura 12.

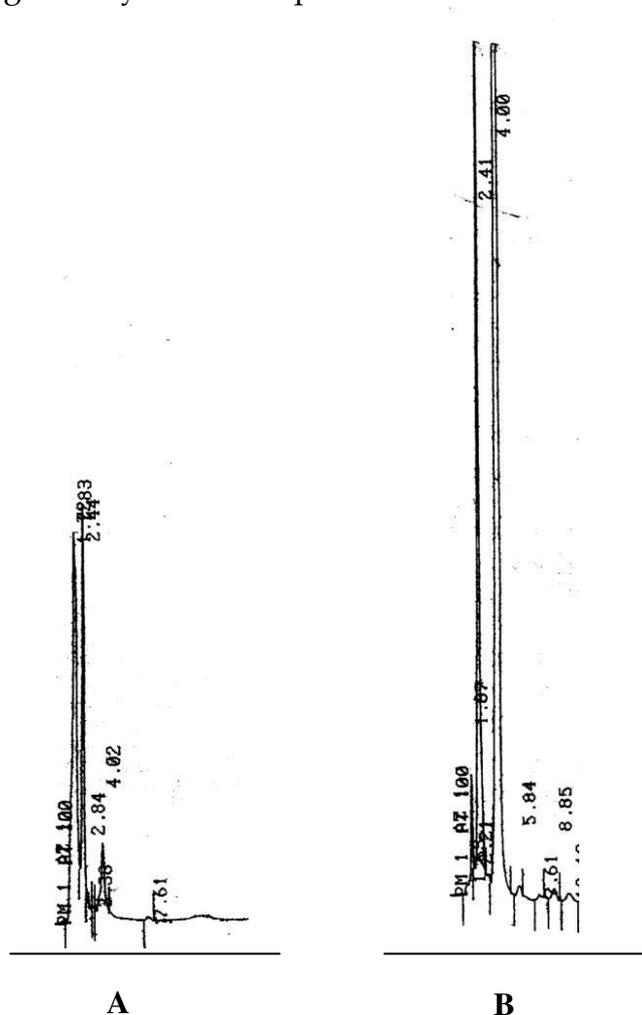


Fig. 11. Cromatogramas obtenidos por HPLC en medio bifásico con enzima inmovilizada. **A.** Fase acuosa de la mezcla de reacción luego de 72 hr de reacción. **B.** Fase orgánica de la mezcla de reacción luego de 72 hr de reacción.

En la figura 11 puede apreciarse que no existe formación de producto en ninguna de las fases testadas. Tanto en la figura 11 A ($t_r = 4.02$) como en la B ($t_r = 4.00$), sólo aparece el pico correspondiente al patrón Z-Ala-OMe ($t_r = 4.01$). Los patrones son los correspondientes a la figura 10.

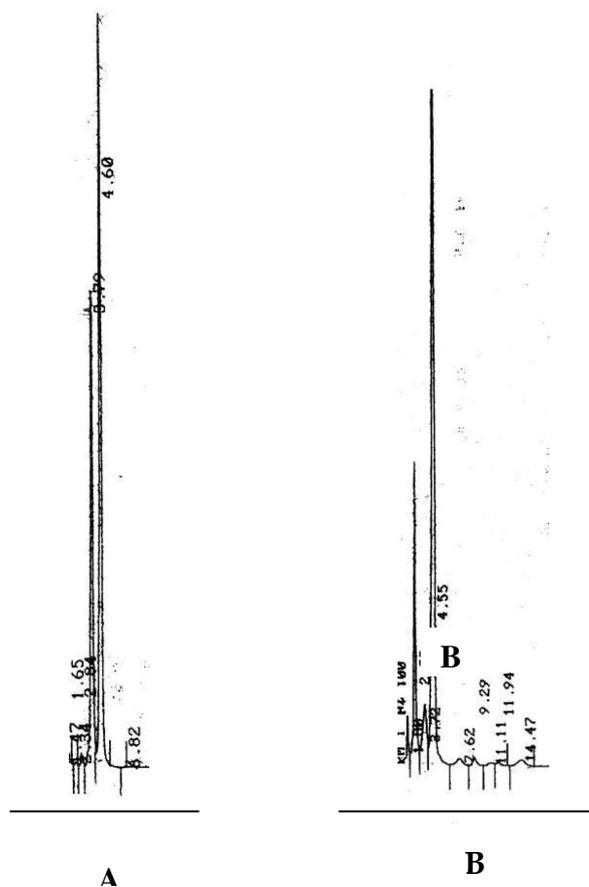


Fig. 12. Cromatogramas obtenidos por HPLC en medio bifásico con extracto crudo liofilizado. **A.** Patrones de Z-AlaOMe y Z-Ala-AlaOMe. **B.** Fase orgánica de la mezcla de reacción luego de 72 hr de reacción.

En la figura 12 **B** puede apreciarse la formación del producto con un $t_r = 3,72$ que se corresponde con el patrón del mismo de la figura 12 **A** ($t_r = 3,79$). En esta misma figura se observa el patrón del acil donador ($t_r = 4,60$) que se correlaciona con el pico que aparece en la figura 12 **B** ($t_r = 4,55$).

5. Conclusiones

- ✓ Las proteasas de *Asclepias curassavica* L. demostraron ser muy estables en solventes miscibles con el agua. En cuanto a los solventes inmiscibles las mismas no mostraron un igual comportamiento en los sistemas ensayados. Las mayores estabilidades se evidenciaron en aquellos solventes orgánicos más polares. Este comportamiento demuestra el carácter hidrofílico de las proteasas.
- ✓ La síntesis del producto Z-Ala-Ala-OMe con enzima inmovilizada fue posible mediante la catálisis de las proteasas presentes en el E.C. de la especie estudiada en los sistemas monofásicos. En el sistema Buffer/DMSO 50:50, el producto se formó en tiempos cortos de reacción, aunque dicho producto no se pudo mantener como tal a tiempos mayores posiblemente debido a su propia hidrólisis.
- ✓ La síntesis del producto Z-Ala-Ala-OMe con enzima inmovilizada no fue posible en los sistemas bifásicos.
- ✓ La síntesis del producto Z-Ala-Ala-OMe con la preparación liofilizada, en el sistema bifásico ensayado (buffer/acetato de etilo 50:50) rindió el producto deseado, aunque el mismo recién se hizo evidente por TLC a las 24 hr de reacción y sólo en la fase orgánica. Esto no quiere decir que a tiempos más cortos no haya habido producto, pero los ensayos analíticos correspondientes por HPLC a dichos tiempos no se pudieron llevar a cabo. Estos resultados merecen un análisis más profundo de tal manera de investigar las posibles razones del bajo rendimiento del producto deseado con la enzima liofilizada, por un lado; y por otro, la ausencia del producto con la enzima inmovilizada en solventes inmiscibles con el agua.

6. Bibliografía

- Abboud, J.M.L. & Notario, R. (1999). "Critical compilation of scales of solvent parameters. Part I. Pure, non-hydrogen donor solvents Pure". *Appl. Chem.* **71**: 645-718.
- Abraham, M.H. & McGowan, J.C. (1987). "The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography". *Chromatographia* **23**:243-246.
- Adlercreutz, P. (1991). "On the importance of support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity". *Eur. J. Biochem.* **199**:609-614.
- Arakawat, T. & Timasheff, S.N. (1985). "Mechanism of poly (ethylene glycol) interaction with proteins". *Biochem.* **24**: 6756-6762.
- Arnold, F.H. (1990). "Engineering enzymes for non-aqueous solvents". *Tibtech.* **8**: 244-249.
- Arnold, F.H. (2001). "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst desing". *Nature.* **409**:253-257.
- Arroyo, M. (1998). "Inmovilización deenzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones". *Ars. Pharmaceutica.* **39**: 23-39.
- Barbas, C.F. & Wong, C. H. (1987). "Papain catalysed peptide synthesis: control of amidase activity and the introduction of unusual amino acids". *J. Chem.Soc.* **1987**:533-534.
- Barberis, S., Quiroga, E. Arribére, M.C. & Priolo, N. (2002). "Peptide síntesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae)". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **17**:39-47.
- Bhalla, T.C., Kumar, D., Gajju, H., Agrawal, H.O. (1999). "Thermophilic bacterial proteases". *J. Punjab. Acad. Sci.* **1**:77-91.
- Björup, P., Adlercreutz, P., Clapés, P. (1999). "Useful methods in enzymatic synthesis of peptide: a comparative study focussing on kinetically controlled synthesis of Ac-Phe-Leu-NH₂ catalyzed by α -chymotripsin". *Biocatal.Biotransform.* **17**:319-345.
- Bordusa, F. Ullmann, D., Elsner, C. & Jakubke, H.D. (1997). "Substrate mimetics mediated peptide synthesis: an irreversible liagation strategy that in independent of substrate specificity". *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**:2473-2475.
- Bordusa, F. (2002). "Proteases in organic synthesis". *Chem. Rev.* **102**:4817-4868.
- Bovara, R., Carrea, G., Gioachini, A.M., Riva, S., Secundo, F. (1997). "Activity, stability, and conformation of methoxypoly(ethylene glycol)-subtilisin at different concentrations of water in dioxane". *Biotechnol. Bioeng.* **54**:50-57.
- Brink, L.E.S. & Tramper, S.J. (1987). "Desing of an organic liquid-phase/inmobilized-cell reactor for the microbial epoxidation of propene". En *Biocatalysis in Organic Media* (C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, eds.), Elsevier Science Publishing Company, Inc. New York, pp.:133-146.
- Bross, J., Sakodinskaya, I.K., Engbersen, J.F.J., Verboom, W., Reinhoudt, D.N. (1995). "Large activation of serine proteases by pretreatment with crown ethers". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2**:255-256.
- Burke, J. (1984). "Solubility parameters: theory and application. <http://sul-server-2.stanford.edu/byauth/burke/solpar>.
- Calvet, S., Torres, J.T., Clapés, P. (1996). "Enzymatic peptide synthesis in organic media. Synthesis of CCK-8 dipeptide fragments". *Biocatal. Biotransform.* **13**: 201-216.
- Cassells, J & Halling, P. (1990). "Protease catalysed peptide synthesis in aqueous-organic two-phase systems: reactant precipitation and interfacial inactivation". *Enzyme Microb. Technol.* **10**:486-491.
- Capellas, M., Benaiges, M.D., Caminal, G., Gonzalez, G., López-Santín, J., Clapés, P. (1996). "Influence of water activity and support material on the enzymatic síntesis of a CCK-8 tripeptide fragment". *Biocatal. Biotransform.* **13**:165-178.
- Castro, R.C. (1999). "Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents". *Enzyme Microb. Technol.* **25**:689-694.
- Castro, R.C. (2000). "Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and qater". *Enzyme Microb. Technol.* **11**:6-11.

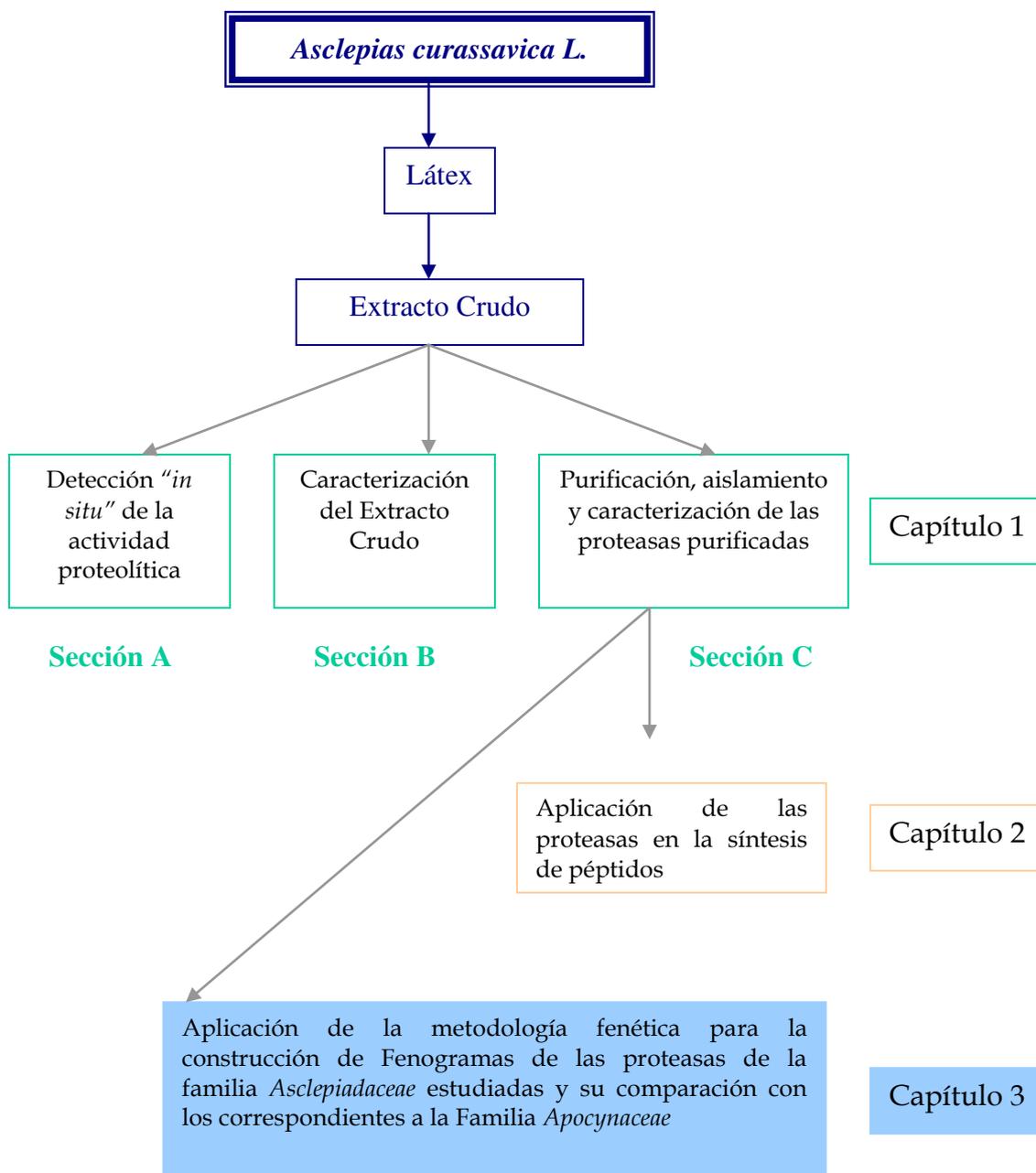
- Clapés, P., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1990 a). "Enzymatic peptide synthesis in organic media: nucleophile specificity and medium engineering in α -chymotrypsin-catalyzed reactions". *J. Biotechnol.* **15**: 23-338.
- Clapés, P., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B. (1990 b). "Enzymatic peptide synthesis in organic media: a comparative study of water-miscible and water-immiscible solvent systems". *Biotechnol. App. Biochem.* **12**: 76-386.
- Clapés, P., Espelt, L., Navarro, M.A., Solans, C. (2001). "Highly concentrated water-in-oil emulsions as novel reaction media for protease-catalysed kinetically controlled peptide synthesis". *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **2**:1394-1399.
- Clapés, P., Morán, C., Infante, M.R. (1999). "Enzymatic synthesis of arginine based surfactants". *Biotechnol. Bioeng.* **63**:333-343.
- Clapés, P., Pera, E. & Torres, J. L. (1997). "Peptide bond formation by the industrial protease, neutrase, in organic media". *Biotechnol. Lett* **19**:1023-1026.
- Clapés, P., Torres, J. L., Aldercreutz, P. (1995). "Enzymatic Peptide Synthesis in Low Water Content Systems: preparative Enzymatic Synthesis of [Leu]- and [Met]-Enkephalin Derivatives". *Bioorg. Med. Chem.* **3**:245-255.
- Constantino, H.R., Griebenow, K., Langer, R. Klibanov, A.M. (1997). "On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups". *Biotechnol. Bioeng.* **53**:345-348.
- Cheetham, P.S.J. (1994) "Case studies in applied biocatalysis from ideas to products". En: *Cabral JMS, Best D, Boros L, Tramper, JS. (eds) Applied biocatalysis. Harwood Academic, Chur, Switzerland.* pp.:47-109.
- Chen, Y.-X., Zhang, X.-Z., Chen, S.-M., You, D.-L., Wu, X.-X., Yang, X.-C., Guang, W.-Z. (1999). "Kinetically controlled syntheses catalyzed by proteases in reverse micelles and separation of precursor dipeptides of RGD. Enzyme" *Microb. Technol.* **25**:310-315.
- Dai, L. & Klibanov, A.M. (1999). "Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:9475-9478.
- Debulis, K & Klibanov, A.M. (1993). "Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants". *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 566-571.
- Deetz, J.A. & Rozzell, J. (1988). "Enzyme-catalysed reactions in non-aqueous media". *J. Tibtech.* **6**: 5-19.
- DeSantis, G. & Jones, J.B. (1999). "Chemical modification of enzymes for enhanced functionality". *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:324-330.
- Dickinson, M. & Fletcher, P. (1989). "Enzymes in organic solvents". *Enzyme Microb. Technol.* **11**:55-56.
- Dordick, J.S. (1989). "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents". *Enzyme Microb. Technol.* **11**:194-211.
- Dordick, J.S. (1992). "Designing enzymes for use in organic solvents". *Biotechnol. Prog.* **8**:259-267.
- Fan, K-K., Ouyang, P., Wu, X., Lu, Z. (2001). "A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems". *Enzyme Microb. Tech.* **28**:3-7.
- Ferreira, L., Ramos, M.A., Dordick, J.S., Gil, M.H. (2003). "Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg)". *J. Molec. Catal. B: Enzymatic.* **21**:189-199.
- Fischer E. & Fourneau E. (1901). "Ueber einige derivate des glykocolls". *Ver. Deutsch. Chem. Ges.* **34**:2868-2877.
- Fitzpatrick, A.P. & Klibanov, A.M. (1991). "How can the solvent affect enzyme enantioselectivity?". *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 3166-3177.
- Fukuy, S., Ahmed, S.A., Qmata, T., Tanaka, A. (1980). "Transformation of lipophile conversions of testosterone by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells". *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **10**:289-301.
- Gill, I., Fandino, R.L., Jobra, X., Vulfson, E.N. (1996). "Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production". *Enzyme Microb. Technol.* **18**:162-183.
- Giorno, L. & Drioli, E. (2000). "Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives". *J. Tibtech.* **18**: 339-349.
- Gupta, M.N. (1992). "Enzyme function in organic solvents". *Eur. J. Biochem.* **203**: 25-32.

- Guisán, J.M., Alvaro, G., Blanco, R.M. (1987). "Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of penicillin acylase from *Kluyvera citrophilak*". En *Biocatalysis in Organic Media* (C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, eds.), Elsevier Science Publishing Company, Inc. New York. pp.:331-337.
- Guy, C.A. & Fields, G.B. (1997). "Trifluoroacetic acid cleavage and desprotectin of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry". *Methods Enzymol.* **289**:67-83.
- Häring, D. & Scheier, P. (1999). "Cross-linked enzyme crystals". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:35-38.
- Huang, P., Dong, A. & Caughey, W.S. (1995). "Effects of dimethyl sulfoxide, glycerol and ethylene glycol on secondary structures of cytochrome c and lysozyme as observed by infrared spectroscopy". *J. Pharma. Sc.* **84**:387-392.
- Illianes, A. (1999). "Stability of biocatalysts". *E.J. Biotech.* **2**:1-9.
- Jaeger, K.-E. & Reetz, M. (2000). "Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**:68-73.
- Jakubke, H.D., Kuhl, P., Konnecke, A. (1985). "Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation". *Angew. Chem. Edn. Engl.* **24**:85-93.
- Kamlet, M.J., Abboud, J.L., Abraham, M.H., Taft, R.W. (1983). "Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation". *J. Org. Chem.* **48**:287-2887.
- Kanerva, L.T. & Klivanov, A.M. (1989). "Hammett analysis of enzyme action in organic solvents". *J. Am. Chem. Soc.* **111**:6864-6865.
- Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. (1988). "Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content". *Enzyme Microb. Technol.* **10**:710-718.
- Khmelnitsky, Y.L., Welch, S.H., Clark, D.S., Dordick, J.S. (1994). "Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents". *J. Am. Chem. Soc.* **116**:2647-2648.
- Kimura, Y., Muraya, K., Araki, Y., Matsuoka, H., Nakanishi, K., Matsuno, R. (1990a). "Synthesis peptides consisting of essential amino acids by a reactor system using three proteinases and an organic solvent". *Agric. Biol. Chem.* **54**:3331-3333.
- Kimura Y, Nakanishi K, Matsuno R (1990b). "Enzymatic synthesis of the precursor of Leu-enkephatin in water-immiscible organic solvent systems". *Enzyme Microb. Technol.* **12**:273-280.
- Kimura, Y., Yoshida, T., Muraya, K., Nakanishi, K., Matsuno, R. (1990c). "Continuous synthesis of a tripeptide by successive condensation and transesterification catalyzed by two immobilized proteinases in organic solvent". *Agric. Biol. Chem.* **54**:1433-1440.
- Kise, H. (1992). "Grafting of enzymes with synthetic polymers for use in organic solvents". En: Imanishi Y (ed) *Synthesis of biocomposite materials*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. Pp.:183-212
- Kise, H., Hayakawa, A., Noritomi, H. (1990). "Protease catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzyme in hydrophilic organic solvents". *J. Bacteriol.* **14**:239-254.
- Klibanov, A.M. (1986). "Enzymes that work in organic solvents". *Chemtech.* **16**:354.
- Klibanov, A.M. (1990). "Asymmetric transformations catalysed by enzymes in organic solvents". *Acc. Chem. Res.* **23**: 114-120.
- Klibanov, A.M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents". *Nature.* **409**:241-246.
- Kuhl, P., Könnecke, A., Döring, G., Däumer, H., Jakubke, H.-D. (1980). "Enzyme-catalyzed peptide synthesis in biphasic aqueous-organic systems". *Tetrahedron Lett.* **21**:893-896.
- Kumar, D. & Bhalla, T.C. (2005). "Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**(6): 726-36.
- Laane, C., Boeren, S., Hilhorst, R. & Veeger, C. (1897a). "Optimization of biocatalysis in organic media". En *Biocatalysis in Organic Media* (C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, eds.), Elsevier Science Publishing Company, Inc. New York. pp.: 65-84.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987b). "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents". *Biotechnol. Bioeng.* XXX:81-87.
- Levitsky, V.Y., Lozano, P. & Iborra, J.L. (1999). "Kinetic análisis of deactivation of immobilized α -chymotrypsin by water-miscible organic solvent in kyotorphin synthesis". *Biotechnol. Bioeng.* 65:170-175.
- Lobell, M. & Schneider, M.P. (1998). "Pronase catalysed peptide synthesis". *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2:319-326.
- Marc Loudon (1988). *Organic Chemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California, USA. pp.:1162-1168.
- Martinek, K., Semenov, A.N., Berezin, I.V. (1981). "Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift". *Biochim. Biophys. Acta* 658:76-89.
- Mitin, Yu.V., Zapevalova, N.P. & Gorbunova, E. Yu. (1984). "Peptide synthesis catalyzed by papain at alkaline pH values". *Int. J. Peptide Protein Res.* 23: 528-534.
- Monter, B., Herzog, B., Stehle, P., Furst, P. (1991) "Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14:183-191.
- Miyazawa, T., Nakajo, S., Nishikawa, M., Hamahara, K., Imagawa, k., Ensatu, E., Yanagihara, R., Yamada, T. (2001a). " α -Chymotrypsin-catalysed peptide síntesis via the kinetically controlled approach using activated esters as acyl donors in organic solvents with low water content: incorporation of non-protein amino acids into peptides". *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 1:82-86.
- Miyazawa, T., Tanaka, K., Ensatu, E., Yanagihara, R., Yamada, T. (2001b). "Broadening of the substrate tolerance of α -chymotrypsin by using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor kinetically controlled peptide síntesis". *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 1:87-94.
- Morcelle del Valle, S. R. (2004). "Proteasas del látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter (*Asclepiadaceae*): Caracterización, purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Bs. As. Argentina.
- Morihara, K. (1987) "Using protease in peptide synthesis". *Trends. Biotechnol.* 5:164-170.
- Mozhaev, V.V., Khmel'nitsky, Y.L., Sergeeva, M.V., Belova, A.B., Klyachko, N.L., Levashov, A.V. (1989). "Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. Alpha-chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents". *Eur. J. Biochem.* 184:597-602.
- Murakami, Y. & Hirata, A. (1997). "New method for analysis of enzymatic reactions: thermolysin-catalyzed synthesis of aspartame precursor". *J. Ferment. Bioeng.* 83:38-42.
- Murakami, Y.; Yoshida, T.; Hayashi, S.; Hirata, A. (2000). "Continuous enzymatic production of peptide precursor in aqueous/organic biphasic medium". *Biotech. Bioeng.* 69:57-65.
- Navigatore Fonzo, L., Quiroga, E., Barberis, S. (2000). "Catálisis enzimática en fase no acuosa. Parte II. Aplicaciones y potencial de esta tecnología". *ALDEQ.* 13: 14-18.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition; Worth: New York. 198 páginas.
- Nilsson, B. L., Soellner, M.B., Raines, R.T. (2005). "Chemical synthesis of proteins". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34: 91-118.
- Noritomi, H. & Kise, H. (1987). "Peptide synthesis by α -chymotrypsin immobilized with PVA in ethanol". *Biotechnol. Lett* 9:383-386.
- Okahata, Y. & Mori, T. (1997). "Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media". *Trends. Biotechnol.* 15: 50-54.
- Okazaki, S., Kamiya, X., Goto, M. (1997). "Application of novel preparation method for surfactant-protease complexes catalytically active in organic media". *Biotechnol. Prog.* 13:551-556.
- Partridge, J., Dennison, P.R., Moore, B.D., Halling, P.J. (1998). "Activity and mobility of subtilisin in low water organic media: hydration is more important than solvent dielectric". *Biochim. Biophys. Acta.* 1386: 79-89.

- Partridge, J., Moore, B.D., Halling, P.J. (1999). "α-chymotrypsin stability in aqueous-acetonitrile mixtures: is the native enzyme thermodynamically or kinetically stable under low water conditions?". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. **6**:11-20.
- Plass, Monika. (2000). "The influence of conformational and associative effects on the QSPR descriptors of oligopeptide derivatives".
<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/habil-online/00/01H002/habil.pdf>
- Prestrelski, S., Arakawa, T., Carpenter, J.F. (1993). "Separation of freezing and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy". *Arch. Biochem. Biophys.* **303**:465-473.
- Quiroga, E. (2005). "Aplicación de fitoproteasas a la síntesis enzimática de péptidos de interés para la industria química y de los alimentos". Tesis Doctoral. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Argentina.
- Reichardt, C. (1994). "Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators". *Chem. Rev.* **94**:2319-2358.
- Rich, J.O. & Dordick, J.S. (1997). "Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates". *J. Am. Chem. Soc.* **119**:3245-3252.
- Rodger, P.B., Durrant, I., Beynon, R.J. (1987). "Effect of water-miscible organic solvents on activity and thermoestability of thermolysin". En *Biocatalysis in Organic Media* (C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly, eds.), Elsevier Science Publishing Company, Inc. New York. pp.:405-409.
- Russell, A.J. & Klibanov, A.M. (1988). "Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents". *J. Biol. Chem.* **263**:11624-11626.
- Sarmiento, A.C., Silvestre, L.; Barros, M; Pires, E. (1998). "Cardosins A and B, two new enzymes available for peptide synthesis". *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*. **5**:327-330.
- Schellenberger, V., Jakubke, H.D., Zapevalova, N.P., Mitin, Y.V. (1991). "Protease catalysed peptide synthesis using inverse substrates: the influence of reaction conditions on the trypsin acyl transfer efficiency". *Biotechnol. Bioeng.* **38**:104-108.
- Schneider, L. V. (1991). "A three-dimensional solubility parameter approach to nonaqueous enzymology". *Biotechnol. Bioeng.* **37**:627-638.
- Sergeeva, M.T., Paradkar, V. M., Dordick, J.S. (1997). "Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents". *Enzyme Microb. Technol.* **20**:623-628.
- Shah, J.H., Swartz, G.M., Papathanassiou, A.E., Treston, A.M., Fogler, W.E., Madsen, J.W., Green, S.J. (1999). "Synthesis and enantiomeric separation of 2-phthalimidino-glutaric acid analogues: potent inhibitors of tumor metastasis". *J. Med. Chem.* **42**:3014-3017.
- Stanley, R. M. (2001). "Preparative biotransformations". *J.Chem.Soc., Perkin Trans 1*.p.: 611.
- Stewart, J.M. (1997). "Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis". *Methods Enzymol.* **289**:29-44.
- Trusek-Holownia, A. (2003). "Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin". *J. Biotechnol.* **102**:153-163.
- Tsuzuki, H., Oka, T. & Morihara, K. (1980). "Coupling between Cbz-Arg-OH and Leu-X catalyzed by trypsin and papain". *J. Biochem.* **88**:669-675.
- Van Unen, D.-J., Engbersen, F.J., Reinhoudt, D.N. (2001). "Studies on the mechanism of crown-ether-induced activation of enzymes in non-aqueous media". *Biotechnol. Bioeng.* **75**:154-158.
- Wang, Y.F., Yakovlevsky, K, Margolin, A.L. (1996). "An efficient synthesis of chiral amino acid and peptide alkylamides via CLEC-subtilisin catalyzed coupling and in situ resolution". *Tetrahedron Lett.* **37**:5317-5320.
- Wang, Y.F., Yakovlevsky, K, Zhang, B., Margolin, A.L. (1997). "Cross-linked crystals of subtilisin: versatile catalyst for organic synthesis". *J. Org. Chem.* **62**:3488-3495.
- Weetall, H.H. (1985). "Enzymatic gallic acid esterification". *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 124-127.

- Wellings, D.A. & Atherton, E. (1997). "Standard Fmoc protocols". *Methods Enzymol.* **289**: 44-67.
- Wescott, C.R., Klivanov, A.M. (1994). "The solvent dependence of enzyme specificity". *Biochim. Biophys. Acta* **1206**: 1-9.
- Wong, C.H., Matos, J.R., West, J.B., Barbas, C.F. (1988). "Practical enzymatic approaches to unusual peptides". *J. Ind. Microbiol.* **29**(3):171-177.
- Xing, G.-W., Li, X.-W., Tian, G.-L & Ye, Y.-H. (2000). "Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrixes". *Tetrahedron.* **56**:3517-3522.
- Zacks, A. & Klivanov, A.M. (1984). "Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C". *Science.* **224**:1249-1251.
- Zacks, A., Klivanov, A.M. (1985). "Enzyme-catalyzed processes in organic solvents". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:3192-3196.
- Zacks, A. & Klivanov, A.M. (1986). "Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. Water is reversed". *J. Am. Chem. Soc.* **108**:2767-2768.
- Zaks, A. & Klivanov, A.M. (1988a). "Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents". *J. Biol. Chem.* **263**:3194.
- Zaks, A. & Klivanov, A.M. (1988b). "The effect of water on enzyme action in organic media". *J. Biol. Chem.* **263**: 8017-8021.
- Zaks, A. & Russell, A.J. (1988). "Enzymes in organic solvents: properties and applications". *J. Biotechnol.* **8**:259-270.
- Zhang, X.-Z., Wang, X., Chen, S., Fu, X., Wu, X. & Li, C. (1996). "Protease-catalyzed small peptide synthesis in organic media". *Enzyme Microb. Technol.* **19**: 538-544.



1. Introducción

1.1. Conceptos de Clasificación y Sistemática

Las leyes de la Biología están escritas en el lenguaje de la diversidad. Cuanto más profundamente se estudie la diversidad biológica, tanto más rápidamente se descubrirán los principios unificadores de la Biología y las leyes que rigen este singular universo de organismos.

Ante la diversidad que lo rodea, el hombre recurre a la clasificación para evitar la confusión. Es por ello que, instintivamente o conscientemente clasifica su medio circundante.

La clasificación es el agrupamiento de objetos en clases sobre la base de atributos que poseen en común y/o en sus relaciones.

El origen de la ciencia de la clasificación se remonta hasta los antiguos griegos. Sin embargo, es el hombre primitivo el que comienza con el proceso de clasificar, reconocer similitudes y en función de éstas, agrupa a los organismos. Linneo (1707-1798) clasificó a los seres vivos según sus semejanzas morfológicas estableciendo el actual sistema nomenclatural. No obstante, los grupos que creó no fueron hechos de cualquier modo. De acuerdo con las creencias de la época el mundo había sido creado, tal como lo conocemos hoy, por una entidad Divina Superior. Por este motivo, Linneo buscaba describir el orden natural que encierra toda la naturaleza y que es el orden establecido en la ley divina. Después de la publicación del *Origen de las Especies* por Darwin en 1859, se adquirió conciencia de la mutabilidad de las especies y de que la relación que hay entre unas y otras obedece a criterios de semejanza evolutiva entre ellas, además de la nueva concepción relativa de que las especies se originan unas de otras. Es por ello, que, desde el hombre primitivo hasta la actualidad se ha desarrollado y desarrolla el fenómeno del *Proceso Clasificadorio*.

Paralelamente a lo anterior, ha tenido un destacable rol la "Sistemática Biológica", disciplina cuyo origen se remonta a más de dos milenios de antigüedad, pero que en los últimos años ha experimentado numerosos cambios, reorganizaciones y avances notables. Esto se debió a la

realización de una reevaluación crítica de las bases filogenéticas de la sistemática, a la tendencia de los sistemáticos a abandonar el “descriptivismo radical” que dominó durante milenios en la disciplina, a la utilización de técnicas moleculares precisas y al aporte de la informática que utiliza computadoras con gran capacidad de memoria.

Entonces, la **Sistemática** es la ciencia de la diversidad, es decir, la organización del conjunto total del conocimiento sobre los organismos. Incluye la información filogenética, taxonómica, ecológica, biogeográfica, paleobiogeográfica y paleontológica. Es una disciplina de síntesis, de abstracción de conceptos, de enunciado de teorías explicativas de los fenómenos observados.

Desde el punto de vista científico, el objetivo primordial de la clasificación biológica es ampliar el conocimiento acerca de los organismos y comprender más profundamente sus propiedades, semejanzas, diferencias e interrelaciones, es decir, es una ciencia teórica, con una gran dosis de descripción, pero no una ciencia puramente descriptiva. En otras palabras, la clasificación biológica es el conocimiento, no de un organismo en particular, sino de las leyes generales que los rigen y de las relaciones causales existentes entre ellos.

La Biología como ciencia está compuesta de numerosas ramas como la Biología Comparada, que incluye a la Sistemática, la Biogeografía, la Paleontología y la Embriología; la Genética, la Ecología, la Fisiología y la Evolución, entre otras. La Biología Comparada estudia la diversidad de especies y taxones superiores -géneros, familias, etc., analizando la distribución de sus atributos con el objeto de captar los patrones bióticos, es decir el aparente orden de la vida. En cambio las otras ramas mencionadas estudian los procesos y mecanismos que generan la diversidad biológica. La biología comparada creció a través de la acumulación de datos sobre la diversidad de los atributos de los organismos. Como resultado de esos estudios se describieron y se dio nombre a más de un millón y medio de especies. Sin embargo, la mera acumulación de datos sobre el mundo en que vivimos, por mejor ordenados que ellos estén, no

es suficiente para comprender ese mundo. La teoría de la evolución, formulada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace a mediados del siglo XIX, nos permite interpretar los datos acumulados por la biología comparada. El estudio de la diversidad de la vida, ahora mirado a través de la lente de la teoría de la evolución, equivale al estudio de la historia de la vida. Por lo tanto, el análisis de la forma (similitudes y diferencias en los atributos de los organismos) ya no puede ser separado de la consideración del tiempo y del espacio.

La Sistemática provee clasificaciones que resumen el conocimiento existente sobre los atributos de los organismos. Los otros campos de la biología comparada y, en muchos casos, de la biología general, deben contar con estos conocimientos, ya que ellos permiten interpretar críticamente tanto procesos evolutivos, por ejemplo el surgimiento de una nueva especie, como fenómenos de adaptación.

1.2. Definición de algunos términos importantes

Para comprender mejor esta temática es necesario definir los siguientes términos:

- ✓ *Caracteres plesiomórficos*: son aquellos caracteres primitivos que poseía el ancestro común de un grupo de organismos que se está comparando.
- ✓ *Caracteres apomórficos*: son los caracteres derivados o evolucionados con respecto al ancestro común.
- ✓ *Sinapomorfía*: corresponde a los caracteres apomórficos que comparte un grupo de organismos.
- ✓ *Grupo monofilético*: es aquel que comprende a un grupo ancestral y a todos sus descendientes (figura 1 a).
- ✓ *Grupo parafilético*: es aquel que comprende un grupo ancestral pero no a todos sus descendientes (figura 1 b).
- ✓ *Grupo polifilético*: es aquel que comprende a grupos que están integrados por los descendientes de diferentes líneas ancestrales (figura 1 c).

Así, un organismo que pertenece a un grupo monofilético representa un mosaico de características ancestrales o plesiomórficas heredadas con poco o nada de cambio de algún antepasado alejado y de características derivadas o apomórficas que reflejan un cambio evolutivo más reciente. Por lo tanto se considera que, todos los organismos que comparten una característica apomórfica descendieron de un solo antepasado común. Entonces este carácter derivado se refiere a una sinapomorfía.

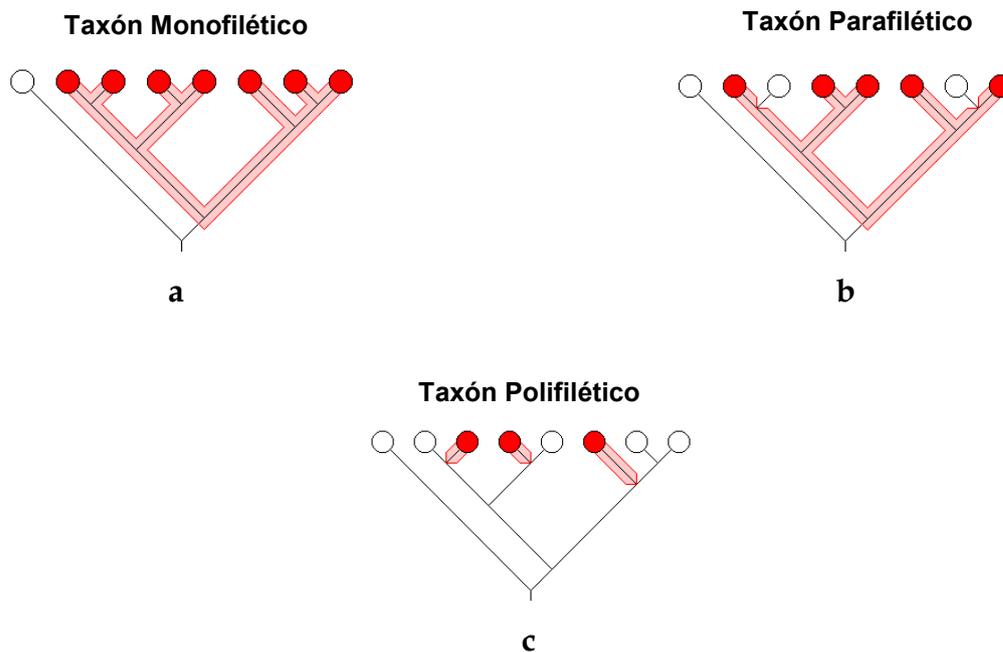


Figura 1: Esquemas que representan los conceptos de taxón: **a.** Monofilético. **b.** Parafilético. **c.** Polifilético.

- ✓ *Caracteres homólogos:* se refieren a las estructuras de los organismos que parecen semejantes por haber surgido a partir de un ancestro común. Estos caracteres ocupan las mismas posiciones topográficas dentro de los organismos comparados.
- ✓ *Caracteres análogos:* son aquellos que no comparten un antecesor común, pero se han adquirido por distintos mecanismos de adaptación cumpliendo las mismas funciones.

1.3. Doctrinas de la Clasificación Biológica

Los fundamentos de la clasificación biológica son objeto de una de las más intensas controversias en la biología ya que hay varias corrientes de pensamiento acerca de los fundamentos teóricos a aplicar en dicha clasificación (Heywood & McNeill, 1964; Mayr, 1965, 1974, 1981; Rollins, 1965; Colless, 1967; Gilmartin, 1967; Williams, 1967; Johnson, 1968; Michener, 1970, Hull, 1970; Ruse, 1973; Schlee, 1975; Sokal, 1975; Duncan & Baum, 1981). Según Hull (1970) se puede considerar que existen cuatro doctrinas sobre la clasificación.

1.3.1. Esencialismo

Esta escuela se basa en la lógica Aristotélica y responde a los puntos de vista de Platón y muchos de sus seguidores. La línea de pensamiento de esta doctrina es seguida por unos (Thompson, 1952, 1962; Borgmeir, 1957; Blackwelder & Boyden, 1952) y descalificada por otros (Popper, 1950; Simpson, 1961; Hull, 1965, Mayr, 1969).

Sus principios fundamentales son:

- ✓Las esencias (“verdadera naturaleza o forma”) de los organismos existen y pueden ser descubiertas y discriminadas con la ayuda de la intuición intelectual.
- ✓La tarea de la clasificación biológica es descubrir y discriminar las esencias. Una vez descrita con palabras a esta descripción se la llama “definición”.
- ✓Los seres vivos reflejan una serie básica de tipos y formas inmutables.
- ✓Todos los organismos miembros de un mismo agrupamiento clasificatorio (taxón) reflejan la misma naturaleza esencial y corresponden al mismo tipo básico.
- ✓La variación dentro de un taxón es desechable a los fines clasificatorios, por ser el producto de una desviación de los arquetipos básicos.

Por lo tanto, el fundamento de esta escuela es que la clasificación no se construye sino que se descubre.

1.3.2. Evolucionismo

Los seguidores de esta corriente consideran que la clasificación no necesariamente debe expresar la filogenia, sino que debe ser consecuente con ella (Simpson, 1961; Mayr, 1969; Bock, 1973).

Los criterios en los que se basa son:

- ✓Filogenia
- ✓Cantidad de modificaciones evolutivas desde el antecesor común con el fin de determinar el grado de diversificación y el tamaño de la discontinuidad entre los posibles grupos a formar. Es decir, contempla además del monofiletismo, el grado en que se han alejado los organismos (similitud o parecido) en el transcurso del tiempo, para establecer los posibles grupos a formar.
- ✓Homogeneidad interna en cada grupo formado.
- ✓Asociación del taxón con un determinado hábitat.

1.3.3. Feneticismo

Esta doctrina se fundamenta en el empirismo (escuela epistemológica) cuyo fundador fue John Locke (1632-1704) quien sostiene que el conocimiento sólo deriva de la experiencia sensible. Es decir, que esta corriente del pensamiento se opone a la tesis del racionalismo, según la cual *la razón* es la verdadera fuente del conocimiento. En otras palabras para el empirismo cualquiera sea el origen de una hipótesis científica la experiencia debe ser comprobarla.

Sus principios son:

- ✓Las clasificaciones deben efectuarse con un gran número de caracteres, que deben ser tomados de todas las partes del cuerpo de los organismos y de todo su ciclo vital.

- ✓La similitud total o global entre dos entidades es la suma de la similitud en cada uno de los caracteres utilizados en la clasificación.
- ✓La clasificación es una ciencia empírica, en la cual la experiencia sensible desempeña el papel preponderante y, por lo tanto, está libre de inferencias genealógicas.
- ✓Las clasificaciones deben basarse exclusivamente en la *similitud fenética*, entendiéndose por “fenético” cualquier tipo de carácter utilizado en la clasificación, incluyendo los morfológicos, fisiológicos, ecológicos, etológicos, moleculares, bioquímicos, anatómicos, citológicos, entre otros.

Esta escuela considera que es imposible construir clasificaciones que expresen la filogenia o sean consecuentes con ella, por desconocimiento de detalles suficientes acerca de la historia evolutiva de la mayoría de los organismos. Sin embargo, el feneticismo no cuestiona la Teoría de la Evolución ni la existencia de una genealogía de los organismos, simplemente excluye del proceso clasificatorio la información filogenética. Además considera válido el estudio de la filogenia una vez efectuada la clasificación del grupo.

De este modo, la escuela feneticista se basa en la similitud global de los organismos utilizando los caracteres plesiomórficos y apomórficos, mientras que las homologías y analogías no son consideradas.

El “operacionismo” es la posición que han tomado algunos autores (Sokal & Camin, 1965) debido a la importancia que el feneticismo le da al enfoque empírico de la clasificación biológica. En el mismo, un concepto es sólo válido si pueden describirse las operaciones que conducen a establecerlo. El enfoque operativo de la clasificación biológica exige que cualquier hipótesis clasificatoria sea comprobada por la observación, la experimentación y la medición y que se establezcan criterios para definir categorías taxonómicas y operaciones clasificatorias. Es decir, tiende a evitar las especulaciones sin base y los conceptos ambiguos. Para reconocer jerarquías en una clasificación biológica

es necesario identificar características de los organismos, las cuales constituyen los “caracteres” de los organismos. Así, la distribución de caracteres entre un grupo seleccionado de organismos tiene significado, pero una sola característica de un organismo específico carece de éste, excepto cuando lo separamos de otro organismo. De este modo, los caracteres compartidos entre organismos son importantes en clasificarlos como perteneciendo al grupo de organismos relacionados. Así, existen los “caracteres generales” o “caracteres primitivos” que corresponden a caracteres de grupos más grandes que sean específicos a grupos pequeños dentro del grupo más grande; y los “caracteres específicos” o “caracteres derivados” se reservan para un grupo más pequeño dentro de un grupo más grande.

Las investigaciones sobre determinación de diferentes taxones han seguido, principalmente, las escuelas evolucionista, fenética y cladista. Es importante distinguir los términos “determinación” de “clasificación”. La *determinación* se refiere a la ubicación de un taxón no identificado en la clase o grupo al que corresponde conforme a una *clasificación* construida previamente.

1.3.4. Cladismo

Esta teoría se basa en el árbol genealógico y sus ramificaciones para la construcción de la clasificación. De aquí su nombre ya que el término “cladismo” proviene del vocablo griego “Klados” que significa “rama”. Busca reconstruir la genealogía de los organismos y elaborar clasificaciones que los reflejen. Es decir que las clasificaciones deben expresar las relaciones filogenéticas, teniendo en cuenta las ramificaciones del árbol genealógico que es necesario reconstruir previamente a la clasificación (Hennig, 1968; Brundin, 1968; Schlee, 1969; Janvier *et al.*, 1980; Wiley, 1981).

Sus fundamentos son:

- ✓ Cada grupo o taxón a formar debe ser monofilético, es decir, que todos sus miembros comparten entre sí un antecesor más reciente que con cualquier otro miembro de algún otro grupo de igual rango.

- ✓Se eligen caracteres en los cuales pueda determinarse el estado primitivo (estado presente en el más reciente antecesor común del grupo).
- ✓Se establece la secuencia de ramificaciones del árbol genealógico y la posición relativa en el tiempo de esas ramificaciones.
- ✓Los grupos formados se basan en la posesión de estados evolucionados en común, el monofiletismo y la cercanía temporal a un antecesor común.

El científico alemán Hennig formalizó este método para averiguar la jerarquía de los seres vivos y sugirió que para tres taxones cualesquiera (organismos, especies, géneros, familias, órdenes, etc) si dos de ellos, están más estrechamente emparentados entre sí, es porque comparten un ancestro común más reciente que en relación a un tercero.

Entonces la cladística parte de tres postulados básicos:

- 1) El orden que reina en la jerarquía natural puede descubrirse y representarse de manera eficaz mediante diagramas con ramificaciones divergentes.
- 2) El orden se manifiesta en la distribución de los caracteres compartidos por los organismos. Las relaciones filogenéticas se establecen evaluando la distribución de caracteres entre los organismos, para lo que se aplica la propiedad de la *homología* para seleccionar el diagrama ramificado que mejor se ajuste a los caracteres entre todas las soluciones posibles. Es propio aclarar que la homología es el concepto central de la cladística.
- 3) El *principio de la parsimonia*, el cual establece que ante dos hipótesis evolutivas es más probable de ser cierta aquella que implique menos cambios evolutivos, ya que la naturaleza tiende siempre a la simplicidad. Se ha discutido que la parsimonia que existe en la naturaleza no es completamente equivalente con la parsimonia aplicada por el cladismo.

La parsimonia utilizada por esta corriente metodológica consiste básicamente en buscar los árboles evolutivos más cortos posibles.

1.4. ¿Qué es la Taxonomía?

La *taxonomía* es el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas. Es una ciencia que trata de explicar *cómo se clasifica* y *cómo se determina*. Los motivos de estudio de la clasificación son los objetos y organismos a clasificar (Crisci & López Armengol, 1983). Es una ciencia que establece todos los tipos de relaciones entre los seres vivos y utiliza estas relaciones como una base para los sistemas de clasificación. Así, se forman agrupamientos de individuos o taxones (taxa en plural) La taxonomía vegetal actualmente se encuentra en su apogeo debido a las investigaciones orientadas a los estudios de parte vegetativa, florística, filogenética y fitogeográfica.

En otras palabras, la taxonomía ha sido definida como una forma de organizar la información biológica utilizando diferentes métodos como el feneticismo, el cladismo, la taxonomía evolutiva, criterios de tipo ecológico, paleontológico, etc. Es una disciplina eminentemente empírica y descriptiva, acumula fenómenos, hechos, objetos, y a partir de dicha acumulación genera las primeras hipótesis explicativas. Actualmente, la taxonomía tiene un trasfondo evolutivo. Hay que recordar que cualquier grupo ha sufrido numerosas revisiones y reclasificaciones hasta adquirir cierto consenso, lo que da a la taxonomía tradicional una gran autoridad en cuanto a sus resultados.

Las *relaciones taxonómicas* son las diferentes formas de asociación que se dan entre los seres vivos. Este concepto ha sido objeto de diferentes interpretaciones a lo largo de la historia de la clasificación biológica, esta diversidad ha creado confusión. Por ello definiremos a continuación las posibles relaciones entre dos organismos o entre dos taxones:

- ✓ *Relaciones fenéticas o de similitud*: se basan en el parecido entre los organismos (o entre las propiedades observables en ellos) pero sin considerar el proceso genealógico por el cual aparecieron esas propiedades. Estas propiedades se expresan como proporción de las similitudes y diferencias existentes entre los organismos (Sneath, 1978).
- ✓ *Relaciones de parentesco, genealógicas o filogenéticas*: indican el grado por el cual dos o más organismos están relacionados a un antecesor común. Estas relaciones se expresan fundamentalmente por el grado de cercanía relativa con el antecesor común y el grado de cambio evolutivo que ha ocurrido desde el mismo.
- ✓ *Relaciones cronísticas o temporales*: indican el grado de cercanía en el tiempo de dos o más organismos.
- ✓ *Relaciones espaciales o geográficas*: denotan el grado de situación espacial relativa entre dos o más organismos.

De acuerdo a la teoría de clasificación que el investigador adopte será importante el tipo de relaciones taxonómicas que tendrá en cuenta. Es decir, para un cladista o un evolucionista las relaciones de parentesco son las importantes; para un feneticista lo son las relaciones fenéticas. A partir de esto surge la inquietud de preguntarse si las relaciones fenéticas son congruentes con las de parentesco. La respuesta puede ser afirmativa o negativa según cada taxón, debido a que la fenética puede expresar las relaciones de parentesco o, por el contrario, puede darse el caso que como consecuencia de fenómenos evolutivos (paralelismo, convergencia) el parentesco y la fenética expresen diferente información. Esta posibilidad de incongruencia entre fenética y filogenética lleva a concluir que, si bien es posible que las relaciones fenéticas sean equivalentes a las relaciones genealógicas, esto dista mucho de ser una verdad absoluta. Por lo tanto, las relaciones taxonómicas son consideradas en un enfoque estrictamente feneticista como relaciones de similitud o parecido fenético.

Se ha criticado que la taxonomía deba tener necesariamente relación con la filogenia, pero en realidad la clasificación se ha de realizar sobre alguna base sólida, sea del tipo que sea. Esta relación ha sido la de los parentescos de tipo evolutivo que llevan a parentescos de tipo morfológico. Es un criterio al que se puede llamar natural, ya que se puede observar directamente en la naturaleza. El problema, en el fondo, es determinar hasta qué punto la taxonomía debe ser compatible con la filogenia pues no necesariamente ha de ser un compendio exhaustivo de esta última.

Por lo tanto, una buena clasificación es aquella que permite desarrollar un árbol evolutivo a partir de los grupos creados, aunque el árbol no sea exhaustivo. La taxonomía no tiene en cuenta aspectos evolutivos en su elaboración del trabajo diario. No obstante, la taxonomía tradicional de la escuela Evolucionista, basada casi exclusivamente en caracteres morfológicos, ha establecido una clasificación que en la actualidad se muestra como bastante cercana a la realidad. Esto es debido a que las semejanzas morfológicas obedecen a criterios de relaciones filogenéticas: cuanto más cercanas sean dos especies, evolutivamente hablando, más parecidas serán en su morfología. Es por ello que, cuando un taxónomo trabaja, aún no siendo consciente de ello, está realizando comparaciones de tipo filogenético aunque sea a un nivel básico. Por ello las clasificaciones son teorías acerca de la base del orden natural, y no tediosos catálogos compilados con el único fin de evitar el caos.

Resumiendo todo lo anteriormente citado, en la *escuela evolucionista*, la clasificación se realiza sobre la base de semejanzas morfológicas, presentando un marcado razonamiento inductivo. Del mismo modo, el fundamento teórico del *Feneticismo* o *Sistemática Numérica* es semejante al anterior, pero se diferencia en que para realizar sus clasificaciones, esta escuela se tecnifica ya que incorpora los caracteres en bases electrónicas que permiten trabajar con una mayor cantidad de datos. Al igual que el pensamiento evolucionista, la escuela feneticista utiliza el razonamiento inductivo. En contraposición, el *Cladismo* o *Sistemática Filogenética*, para realizar sus clasificaciones se basa en el método hipotético-deductivo, es decir, ante una generalización o hipótesis general se

buscan hechos puntuales que permiten refutarla. En esta escuela la clasificación se debe realizar bajo la base de relaciones de parentesco.

1.5. Posición Taxonómica de la Familia *Asclepiadaceae*

En los últimos años los investigadores de diferentes disciplinas se encuentran abocados a intentar llegar a un acuerdo definitivo en relación a la ubicación taxonómica de la Familia *Asclepiadaceae*.

Tradicionalmente la posición de esta familia es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Gentianales*

Familia: *Asclepiadaceae*

El orden Gentianales posee, además de la ya mencionada familia *Asclepiadaceae*, cuatro familias más: *Loganiaceae*, *Gentianaceae*, *Saccifoliaceae* y *Apocynaceae*. La controversia se plantea en considerar a la Familia *Asclepiadaceae*, como una subfamilia de la Familia *Apocynaceae* o mantenerla como tal.

Antiguamente la mayoría de las plantas productoras de látex se agrupaban bajo el nombre de *Apocynun*, incluyéndose dentro de este heterogéneo grupo a muchas *Asclepiadáceas*, *Euforbiáceas* y *Apocináceas*.

En 1789 Jussieu hace un primer aporte para aclarar dicha situación y asigna el nombre de *Apocynaceae* a las actuales *Asclepiadáceas* y *Apocináceas*, quedando así la mayoría de los demás integrantes relegadas a otras familias (Jussieu,1789).

En 1811 fue R. Brown quien diferenció las Asclepiadáceas bajo el nombre de *Asclepiadaceae* y mantuvo el propuesto previamente por Jussieu para las *Apocynaceae* (Brown, 1811).

Sin embargo en la actualidad aún no está clara la delimitación entre las dos familias ya que los representantes de cada una de ellas son similares y presentan algunos caracteres que poseen una gradación desde las Apocináceas a las Asclepiadáceas.

La Tabla 1 muestra una comparación de diferentes clasificaciones propuestas por distintos autores de la Familia *Asclepiadaceae* R. Br., en la cual incluyen al taxón *Periplocaceae* como una subfamilia (Swarupanandan *et al.*, 1996).

<i>Decaisne</i> (1844)	<i>Bentham</i> (1876)	<i>Hooker</i> (1883)	<i>Schumann</i> (1895)	<i>Bruyns & Forster</i> (1991)
	Suborden	Suborden	Subfamilia	Subfamilia
	Periploceae	Periploceae	Periplocoideae	Periplocoideae
Periploceae	Periploceae	Periploceae	Periploceae	Periploceae
				Subfamilia
				Seccamonoideae
				Secamoneae
	Suborden	Suborden	Subfamilia	Subfamilia
	Euasclepiadeae ¹	Euasclepiadeae	Asclepiadoideae	Asclepiadoideae
Secamoneae	Secamoneae	Secamoneae	Secamoneae	
Cynancheae ²	Cynancheae ²	Cynancheae ²	Asclepiadeae	Asclepiadeae
Gonolobeae	Gonolobeae ³	Gonolobeae	Gonolobeae
	Marsdenieae	Marsdenieae		Marsdenieae
			Tylophoreae	
Stapeliaceae ⁴	Ceropegieae			
		Ceropegieae ⁵		
	Stapeliaceae			Stapeliaceae ⁶

Tabla 1. Clasificaciones de la Familia *Asclepiadaceae* según distintos autores.

¹Esta subfamilia incluye al género *Asclepias*, el género tipo de la Familia *Asclepiadaceae*.

² El nombre correcto es Asclepiadeae debido a que incluye al género tipo *Asclepias*.

³ Hooker estudió los organismos de la India, por ello la ausencia de Gonolobeae en su clasificación.

⁴ Stapeliaceae Decaisne (1844) abarca los taxa de las tribus Marsdenieae, Ceropegieae y Stapeliaceae de Bentham (1876).

⁵La circunscripción de Ceropegieae de Hooker (1883) es diferente de la de Decaisne (1844) y Bentham (1876).

⁶ Stapeliaceae sensu Bruyns & Forster (1991) es equivalente a Ceropegieae de Hooker (1883).

Autores como Safwat, 1962; Stevens, 1983; Fishbein, 2001, Liede & Tauber, 2002 y Endress & Bruyns, 2000, entre otros, siguen la línea de pensamiento cladista en lo que se refiere a la ubicación de la Familia *Asclepiadaceae*. Endress y sus colaboradores consideran que los integrantes de la Familia *Asclepiadaceae* son derivados apomórficos de los miembros de la Familia *Apocynaceae*. De esta manera se forma un grupo *monofilético*. Además, consideran que esta familia contiene 424 géneros distribuidos en cinco familias como se muestra en la Tabla 2. La diferenciación en subfamilias la basaron en características morfológicas de los órganos reproductores femeninos y masculinos y para distinguir a las tribus, además de emplear las mismas características para las subfamilias, lo hicieron tomando en cuenta características morfológicas de los frutos y, en algunos casos, de estructuras que participan en la polinización llamadas traslatores.

Familia	Subfamilia	Tribus	Géneros
APOCYNACEAE	Rauvolfioideae	Tabernaemontaneae	Ambelania, Stenolosen, Tabernaemontana, etc.
		Hunteriae	Hunteria, Picralima y Pleiocarpa
		Carisseae	Acokanthera y Carissa
		Melodinae	Melodinus, Dyera, Gonioma, etc.
		Willughbeeae	Willughbeia, Hancornia, Saba, etc.
		Plumerieae	Plumeria, Cerbera, Thevetia, etc.
		Alyxieae	Alyxia, Lepinia, Lepiniopsis, etc.
		Vinceae	Vinca, Petchia, Kopsia, etc
		Alstonieae	Alstonia, Vallesia, Tonduzia, etc.
		Wrightieae	Wrightia, Nerium, Adenium, etc.
	Malouetieae	Malouetia, Kibatalia, Alafia, etc.	
	Apocynoideae	Apocyneae	Apocynum, Baissea, Urceola, etc
		Mesechiteae	Mesechites, Secondatia, Mandevilla, etc.
		Echiteae	Echites, Pottsia, Hylaea, etc.
		Periplocoideae	Periploca, Decalepis,, Pentopetia, etc.
	Secamonoideae		Secamone, Toxocarpus, Pervillea, etc.
	Asclepiadoideae	Asclepiadeae	Asclepias, Araujia, Funastrum, Morena, Philibertia, etc.
		Marsdenieae	Marsdenia, Fockea, Hoya, etc.
		Ceropegieae	Ceropegia, Huernia, Hoodia, etc.

Tabla 2. Clasificación de la familia *Apocynaceae* según Endress & Bruyns (2000).

Estos mismos autores consideran que algunos caracteres como por ejemplo la forma de liberación del polen, tipo de fruto, complejidad de los

traslatores, ubicación de los nectarios, entre otras características morfológicas, exhiben una continuidad desde una familia a otra, desestimando la división tradicional de estas familias que se las separaba por la presencia de traslatores complejos en la Familia *Asclepiadaceae* y su ausencia en la Familia *Apocynaceae* (Rosatti, 1989). Por ello, suponen que el límite entre estas dos familias es artificial, aunque reconocen el esfuerzo realizado por Sennblad (1997) quien trabajó sobre aspectos moleculares del grupo. Sin embargo, le critican que sus resultados no reflejan una separación efectiva entre ambas familias debido a que fueron muestrados pocos taxa y algunos de ellos eran plantas estériles. Otros autores, como Potgieter & Albert (1998) y Potgieter (1999), han profundizado los estudios moleculares, pero aún la resolución de la interfase es insatisfactoria.

Las diferencias indicadas precedentemente reflejan la ausencia de claridad de la existencia de apomorfismos y sinapomorfismos dentro de las clasificaciones propuestas.

La escuela evolucionista o tradicional considera que tanto la familia *Asclepiadaceae* como la familia *Apocynaceae*, tienen características propias y por ello mantienen la identidad de cada una de ellas. Con relación a esta temática han trabajado Cronquist, (1981), Swarupanandan *et al.*, (1996), entre otros. El primero de los autores nombrados mantiene a las dos familias independientes por la presencia de traslatores en *Asclepiadaceae* y su ausencia en *Apocynaceae*, Swarupanandan hace una propuesta de clasificación de la Familia *Asclepiadaceae* R. Br. presentada en la Tabla 3 basada, al igual que Endress & Bruyns, (2000), en características morfológicas de los órganos reproductores y tipos de frutos, y agregan características de los apéndices florales accesorios (principalmente para diferenciar el taxón *Periplocaceae* del taxón *Asclepiadaceae*) y estructuras vegetativas como el tallo, la raíz y el pecíolo.

Familia <i>Periplocaceae</i>	Familia <i>Asclepiadaceae</i>
	Tribu <i>Secamoneae</i>
	Tribu <i>Stapelieae</i>¹
	Tribu <i>Asclepiadeae</i>²

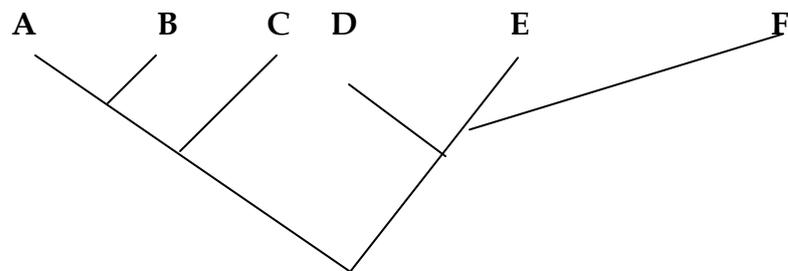
Tabla 3. Clasificación de la Familia *Asclepiadaceae* según Swarupanandan *et al.*, 1996

¹Incluye a la tribu *Ceropegieae* (Decne. ex Benth., 1868), a la tribu *Marsdenieae* Benth. (1876) y excluye a *Tylophora* R. Br.

²Incluye a la tribu *Gonolobeae* Don (1838) e incluyen *Tylophora* R. Br.

Como ya ha sido nombrado en párrafos anteriores la meta de los biólogos es reflejar la filogenia en los sistemas de clasificación de los seres vivos y a partir de aquí en los últimos años la discusión se plantea entre las escuelas Evolucionista y Cladista.

Para tratar de clarificar esta discusión se presenta el siguiente árbol evolutivo donde la distancia horizontal entre los taxones indicados se debe a las diferencias fenéticas entre ellos.



En este árbol se observa que los taxones **A**, **B**, **C**, **D** y **E** son similares morfológicamente. En cambio, el taxón **F**, debido posiblemente a una adaptación a un cierto ambiente extremo (ejemplo: desierto) llega a ser muy diferente morfológicamente del resto. Esta diferencia fenética se refleja por su distancia del taxón **E**.

Si estos taxones tuviesen el rango de “especie”, los taxónomos evolucionistas considerarían que las especies **A**, **B**, **C**, **D** y **E** pertenecen al

mismo género y la especie **F** a otro. Por el contrario, para los cladistas, sería inaceptable tal posición. Estos últimos fundamentan su postura en que las especies **E** y **F** se relacionan más de cerca que cualquiera de las otras especies debido a que comparten un antecesor común más reciente. Mientras que, el grupo formado por las especies **A**, **B**, **C**, **D** y **E** conformarían un grupo parafilético, situación no contemplada por esta línea de pensamiento.

Sin embargo, la escuela cladista propone dos alternativas posibles para resolver esta cuestión:

- ✓que las especies **A**, **B** y **C** pertenezcan al mismo género y las especies **D**, **E** y **F** a otro género.
- ✓que las especies **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F** pertenezcan todas al mismo género.

Los evolucionistas pudieron contradecir estas posturas, fundamentando que las alternativas propuestas por los cladistas no reflejan la enorme cantidad de cambio evolutivo experimentado por la especie **F** proponiendo así, que debido a su diferencia fenética con las otras especies, debería ser reconocida como un grupo separado del resto.

Un ejemplo concreto de esta situación en la naturaleza se observa en la posición taxonómica de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*.

2. Objetivos

En relación al “debate taxonómico” sobre la ubicación de las Familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*, no se ha encontrado bibliografía acerca de la posición que toma la Escuela Feneticista al respecto. Es por ello que se planteó el siguiente objetivo como un aporte a la ubicación taxonómica de ambas familias:

- √ Aplicar la metodología de la Escuela Feneticista para construir fenogramas basados en relaciones fenéticas de las fitoproteasas de la familia *Asclepiadaceae* estudiadas y compararlas con las fitoproteasas de la Familia *Apocynaceae* conocidas, con el objeto de observar si ambas familias mantienen su individualidad conforme a la clasificación taxonómica tradicional

Debido a que todas las fitoproteasas analizadas son cisteínicas, utilizando la metodología de la Escuela Feneticista se planteó además el siguiente objetivo

- √ Establecer cuál/les de las fitoproteasas estudiadas se asemeja/n más a papaína (Familia *Caricaceae*) que es la proteasa cisteínica prototipo de la familia C 1, según el sistema de clasificación Merops de Peptidasas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Presentación de las Técnicas Numéricas empleadas

Para realizar el análisis de las relaciones fenéticas entre las fitoproteasas seleccionadas para este trabajo, se utilizaron las técnicas numéricas que consisten en aplicar operaciones matemáticas para calcular la afinidad entre unidades taxonómicas en base al estado de sus caracteres. Es decir, dichas técnicas se basan en análisis multivariados.

El siguiente diagrama de Flujo representa los pasos elementales de las técnicas numéricas que condujeron a la construcción de los Fenogramas que se presentan en este trabajo.



En este diagrama los pasos ④, ⑤ y ⑥ se realizan utilizando programas adecuados de computación.

3.2. Pasos elementales de las Técnicas Numéricas

A continuación se detallan los pasos realizados en este estudio:

3.2.1. Elección de las OTU

Primeramente se eligieron las unidades a clasificar, llamadas OTU (“Operational Taxonomic Unit”), Sneath & Sokal, 1973. Para la elección de las OTU se siguió la clasificación taxonómica tradicional, la cual considera a las Familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* como familias independientes. En este caso las OTU corresponden a las fitoproteasas y las que fueron seleccionadas se presentan en las siguientes tablas.

OTU	Familia <i>Asclepiadaceae</i>	Referencias
Araujiaína a I (Arau a I) Araujiaína a II (Arau a II) Araujiaína a III (Arau a III)	<i>Araujia angustifolia</i> (Hook et Arn.) Descaine	Comunicación Personal
Araujiaína h I (Arau h I) Araujiaína h II (Arau h III) Araujiaína h III (Arau h III)	<i>Araujia hortorum</i> Fourn.	Obregón et al., 2001
Asclepaína c I (Ascle c I) Asclepaína c II (Ascle c II)	<i>Asclepias curassavica</i> L.	Liggieri et al., 2004
Asclepaína f (Ascle f)	<i>Asclepias fruticosa</i> L.	Trejo et al., 2001
Funastraína c II (Funa c II)	<i>Funastrum claussum</i> (Jacq.) Schlechter	Morcelle de Valle et al., 2004
Morrenaína b I (Morre b I) Morrenaína b II (Morre b II)	<i>Morrenia brachystephana</i> Griseb.	Vairo Cavalli et al., 2003 Cortadi, 2001
Morrenaína o I (Morre o I) Morrenaína o II (Morre o II)	<i>Morrenia odorata</i> (Hook et Arn.) Lindley	Vairo Cavalli et al., 2001 Cortadi, 2001
Philebertaína g I (Phili g I)	<i>Philibertia gilliesii</i> Hook. et Arn.	Sequeiros et al., 2005

Tabla 4. OTU seleccionadas de la familia *Asclepiadaceae*.

<i>OTU</i>	<i>Familia Apocynaceae</i>	<i>Referencias</i>
Ervatamina A (Ervata A)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Sreedevi <i>et al.</i> , 2003
Ervatamina B (Ervata B)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu <i>et al.</i> , 2000
Ervatamina C (Ervata C)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu <i>et al.</i> , 1999
Heynaína (Heyna)	<i>Ervatamia heyneana</i> (Wall.) Cooke	Patel <i>et al.</i> , 2003

Tabla 5. OTU seleccionadas de la familia *Apocynaceae*.

<i>OTU</i>	<i>Familia Caricaceae</i>	<i>Referencia</i>
Papaína (Papa)	<i>Carica papaya</i> L	http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html

Tabla 6. OTU seleccionada de la familia *Caricaceae*.

3.2.2. Elección de los *Caracteres*

Como en cualquier proceso clasificatorio, basado en las diferencias existentes entre los objetos a clasificar, se eligieron los *caracteres*. Estos representan cualquier propiedad en las OTU en estudio. Los *estados* son los posibles valores que estos caracteres puedan exhibir.

La escuela feneticista se basa en la homología operatoria la cual establece que dos estados son homólogos cuando se corresponden en su composición y estructura, es decir, cuando presentan similitud cualitativa en cuanto a las características químicas y a los procesos bioquímicos, respectivamente (Crisci & López Armengol, 1983).

De este modo se seleccionaron caracteres bioquímicos de las fitoprotetas, los cuales poseen el mismo peso o importancia según lo establece la escuela fenética. Los datos más objetivos y precisos son los expresados en forma cuantitativa con el fin de que con ellos se puedan realizar operaciones de cálculos mediante números. Algunos de ellos deben ser sometidos a una actividad lógica, *la codificación*, para ser transformados en cuantitativos.

En el presente estudio se trabajó con Datos Multiestado Cuantitativos Continuos. Estos datos representan dimensiones continuas, es decir, cualidades cuya variabilidad se distribuye en una escala continua. La expresión de estos datos puede ser un número entero o fraccionario. Dentro de este grupo se utilizaron los siguientes caracteres de las fitoproteasas analizadas:

- Carácter I: Actividad Específica (Ucas/mgr de proteínas)
- Carácter II: Peso Molecular (Daltons)
- Carácter III: Punto Isoeléctrico
- Carácter IV: pH óptimo
- Carácter V: Parámetro Cinético Km utilizando como sustrato sintético *p*FLNA
- Carácter VI: Parámetro Cinético Km utilizando como sustrato sintético NCBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos
- Carácter VII: Porcentaje de identidad con papaína (Papaya Proteinasa I)

3.2.3. Construcción de la *Matriz Básica de Datos (MBD)*

Con estos datos se procedió a construir la Matriz Básica de Datos (MBD), la cual presenta los datos en forma de cuadro o tabla. Es una matriz $n \times t$, donde las n columnas representan los caracteres y las t filas las OTU. El símbolo *NC* (no comparable) simboliza datos no obtenibles y son descartados durante el procesamiento de datos. Para analizar esta matriz se utilizó la *Técnica Q* en la cual se estudia la asociación entre las OTU.

3.2.4. Obtención de un *Coficiente de Similitud*

Debido al tipo de datos de la matriz básica (datos multiestado), se eligió el coeficiente de distancia Manhattan Distance, cuya fórmula es la que sigue:

$$\sum_{i=1}^n |X_{ij} - X_{ik}|$$

donde: X_{ij} = valor del carácter i en la OTU j
 X_{ik} = valor del carácter i en la OTU k
 n = número de caracteres

Si se consideran cuatro OTU y tres caracteres, los mismos pueden ubicarse en una representación geométrica de coeficientes de distancia en donde existe un “espacio fenético” de tres dimensiones; una para cada carácter. Cada OTU puede disponerse en el espacio formado por esas tres dimensiones, de acuerdo con el valor que tenga en cada uno de los caracteres. La distancia entre las OTU es una posible cuantificación de las diferencias. Es decir, *a mayor distancia, menor similitud*. Como generalmente se utilizan más de tres caracteres, el espacio ya no sería tridimensional sino que correspondería a un espacio multidimensional. Debido a la imposibilidad de representar gráficamente más de tres ejes, está demostrado algebraicamente que la geometría del espacio tridimensional es aplicable a espacios euclidianos (espacios de dimensiones precisas) de más de tres dimensiones y, es por esto, que se aplican programas de computación para analizarlos.

3.2.5. Construcción de una *Matriz de Similitud*

Los resultados obtenidos de la aplicación del coeficiente de distancia para los pares posibles de OTU ordenados en forma tabular constituyen la *matriz de similitud*.

En esta matriz las OTU ocupan tanto las filas como las columnas, siguiendo el mismo orden en ambas. De esta manera, se logra comparar cada OTU consigo misma y con las restantes OTU (figura 2). Así estructurada la matriz, la diagonal principal representa a cada OTU comparada consigo misma y este valor corresponde al de la máxima similitud: 0 para el caso del coeficiente de similitud elegido.

		OTU						
		1	2	3	4	5	t
O T U	1	S ₁₁						
	2	S ₁₂	S ₂₂					
	3	S ₁₃	S ₂₃	S ₃₃				
	4	S ₁₄	S ₂₄	S ₃₄	S ₄₄			
	5	S ₁₅	S ₂₅	S ₃₅	S ₄₅	S ₅₅		
	
	
	
t	S _{1t}	S _{2t}	S _{3t}	S _{4t}	S _{5t}	S _{tt}	

Fig. 2. Matriz de similitud entre OTU, donde S₁₂ corresponde al valor de similitud entre la OTU 1 y la OTU 2.

La similitud entre la OTU 1 y la OTU 2 (S₁₂) es la misma que entre la OTU 2 y la OTU 1 (S₂₁), por ello la parte superior derecha de la matriz es la imagen en espejo de la parte inferior izquierda. Por convención se usa sólo el triángulo inferior izquierdo.

3.2.6. Conformación de Grupos Taxonómicos: "fenogramas"

Como ya se ha mencionado precedentemente, la obtención del coeficiente de similitud, la construcción de la matriz de similitud y la conformación de los grupos taxonómicos, se realiza por medio de programas de computación. Así, los datos se ingresaron en un programa estadístico Systat (Systat, 1997), el cual aplica un Coeficiente de Similitud adecuado a los datos que contiene la MBD. Dicho programa utiliza un coeficiente de Distancia, que es un tipo de coeficiente de similitud, donde la máxima similitud corresponde a un valor=0 y la mínima similitud a un valor= infinito. Estos parámetros se fundamentan en que los estados de los caracteres de las OTU pueden ser utilizados para obtener una disposición de puntos representando a las OTU en

un adecuado espacio euclidiano. Así, con estos resultados el programa realizó un análisis de agrupamiento jerárquico basado en la matriz de distancia euclidiana. Previo a esto, se efectuó una estandarización de los datos, por lo cual estos datos fueron convertidos en Score Z (unidades estándar en valor promedio igual a cero y desvío estándar igual a uno) con el objeto de eliminar las diferencias de escala y de unidades de medida entre las variables (Crisci & López Armengol, 1983).

El análisis de agrupamiento comprende técnicas que forman grupos de OTU que se asocian por su grado de similitud. Los métodos de agrupamiento utilizados fueron (Johnson, 2000):

Método del Ligamiento Promedio: el cual define que la distancia entre agrupamientos es el promedio de todas las desemejanzas entre todas las parejas posibles de puntos tales que, una de cada pareja esté en cada agrupamiento.

Método de la Varianza Mínima de Ward: donde la distancia entre dos agrupamientos se define como el cuadrado de la distancia entre la suma de los recíprocos de la cantidad de puntos que se encuentra dentro de cada uno de éstos.

Finalmente, la estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento se representa mediante un *Fenograma*.

El Fenograma es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTU o grupos de OTU. Los valores de similitud se expresan en una escala que se encuentra en el extremo inferior. Las OTU se colocan en el extremo derecho y dan origen a un eje horizontal. Estos ejes se unen mediante ejes verticales que expresan, en relación con la escala, el valor de similitud entre las OTU o conjuntos de OTU.

Con esta metodología se realizaron seis fenogramas diferentes a saber:

-Fenogramas 1 y 2

Corresponden a la comparación de las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* entre sí. De los métodos de análisis de agrupamiento más utilizados se eligieron dos: para el primero de ellos, se aplicó el Método de la Varianza Mínima de Ward, mientras que para el segundo, el Método del Ligamiento Promedio. Los caracteres comparados fueron los correspondientes a los números **I, II, III, IV, V, VI y VII**.

-Fenogramas 3 y 4

En este caso la comparación se hizo entre las OTU de las Familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*. Para el primero de ellos, se aplicó el Método de la Varianza Mínima de Ward, mientras que para el segundo, el Método del Ligamiento Promedio. Los caracteres comparados fueron los correspondientes a los números **I, II, III, IV, y VII**.

-Fenogramas 5 y 6

Aquí se compararon las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* con la única OTU de la Familia *Caricaceae*. Como en los dos casos anteriores, en el primero de ellos se aplicó el Método de la Varianza Mínima de Ward, y en el segundo, el Método del Ligamiento Promedio. Los caracteres comparados fueron los correspondientes a los números **I, II, III, IV, V, y VII**.

4. Resultados y Discusión

4.1. Construcción de la *Matriz Básica de Datos (MBD)*

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

Fitoproteasas	Caracteres						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Araujiaína a I (Arau a I)	4,88	23,464	9,3	8,00	NC	NC	85
Araujiaína a II (Arau a II)	8,6	23,528	9,3	8,25	0,18	NC	0
Araujiaína a III (Arau a III)	8,66	23,488	9,3	9,25	5,14	NC	80
Araujiaína h I (Arau h I)	18	24,031	9,3	8,75	NC	0,024	0
Araujiaína h II (Arau h II)	3	23,718	8,9	8,5	NC	0,238	85
Araujiaína h III (Arau h III)	12,5	23,446	10,5	8,5	NC	0,099	80
Asclepaína c I, (Ascle3 c I)	10, 877	23,200	9,3	8,5	0,8183	0,0503	80
Asclepaína cII (Ascle c II)	6,58	23,590	9,3	8,5	NC	0,1634	85
Asclepaína f (Ascle f)	7	23,652	9,3	9,5	0,0554	NC	85
Funastraina c II (Funa c II)	7,45	23,636	9,3	9,5	0,1011	0,0203	80
Morrenaína b I (Morre b I)	10,9	23,205	9,3	8,70	NC	0,02	0
Morrenaína b II (Morre b II)	8,8	26,000	9,3	8,25	NC	0,041	0
Morrenaína o I (Morre o I)	15,36	27,000	9,3	8,5	NC	NC	0
Morrenaína o II (Morre o II)	30,1	25,8	9,3	8,5	NC	0,000043	0
Philibertaína g I (Phili g I)	5,28	23,530	9,0	7,5	0,1527	NC	0

NC: dato no comparable

Tabla 7: Fitoproteasas de la Familia *Asclepiadaceae*.

Fitoproteasas	Caracteres				
	I	II	III	IV	VII
Ervatamina A (Ervata A)	26,31	27,600	8,37	8,25	0
Ervatamina B (Ervata B)	7,50	27,039	9,35	6	0
Ervatamina C (Ervata C)	4,5	24,92	9,53	7,75	90
Heynaína (Heyna)	8,2	23,00	10,8	8,25	0

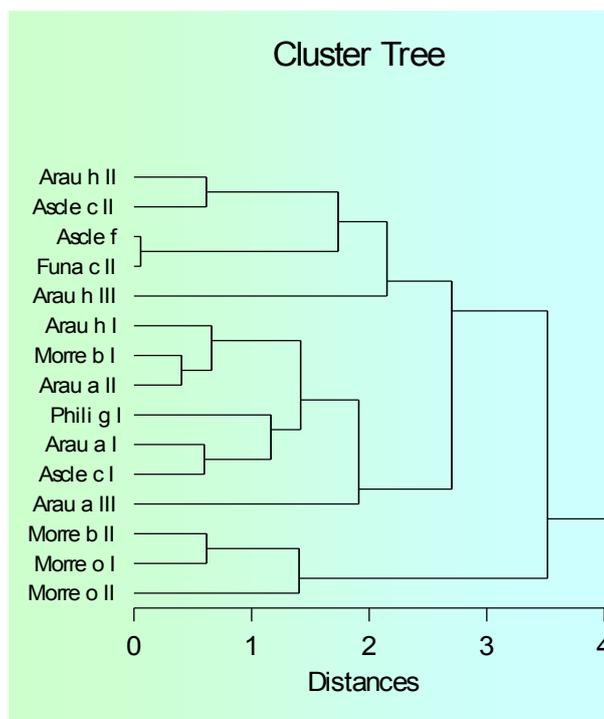
Tabla 8: Fitoproteasas de la Familia *Apocynaceae*.

Fitoproteasa	Caracteres					
	I	II	III	IV	VI	VII
Papaína (Papa)	2,5	23,429	8,75	9,25	0,34	100

Tabla 9: Fitoproteasa de la Familia *Caricaceae*.

4.2. Conformación de Grupos Taxonómicos: "fenogramas"

4.2.1. Fenograma 1 (Técnica Q, Método de la Varianza Mínima de Ward)



En este fenograma se pueden observar dos grandes grupos que se han originado a bajos niveles de similitud (distancia=3,517). Ambos grupos se relacionan por las OTU Morre o I y Arau a III.

-Grupo 1.a.: conformado por Arau h II, Ascle c II, Ascle f, Funa c II, Arau h III, Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Arau a I, Ascle c I y Arau a III. A su vez este grupo se subdivide en:

•**subgrupo 1.a.1.:** Arau h II, Ascle c II, Ascle f, Funa c II y Arau h III.

En este subgrupo se observa que Ascle f y Funa c II están estrechamente asociadas (distancia=0,057) al igual que Arau h III y Ascle c II (distancia=0,616), quedando aislada la OTU Arau h II que se asocia a Ascle c II con un bajo valor de similitud (distancia=2,151) e integra de este modo este subgrupo.

•**subgrupo 1.a.2.:** Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Arau a I, Ascle c I y Arau a III.

Aquí, las OTU más estrechamente relacionadas son por un lado, Arau a II y Morre b I a la que se asocia la OTU Arau h I, y por otro las OTU Arau a I y Ascle c I y a ésta se asocia la OTU Phili g I.

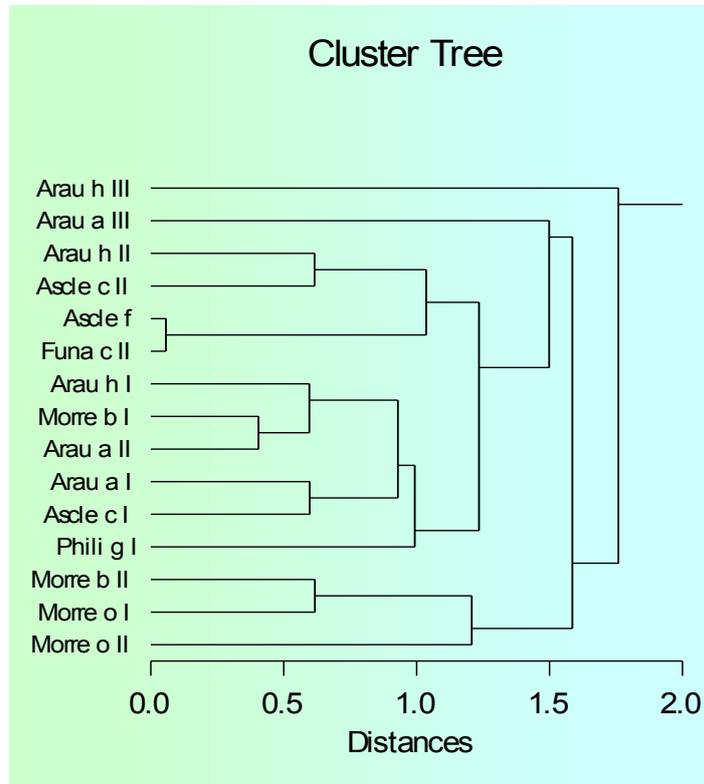
Finalmente la OTU Arau a II que quedó aislada del resto, se asocia a Arau h I conformando así este subgrupo.

Los subgrupos **1.a.1.** y **1.a.2.** se relacionan por medio de las OTU Arau a III y Arau h III (distancia=2,702).

-Grupo 1. b.: integrado por Morre b II, Morre o I y Morre o II.

En este caso es un grupo integrado sólo por tres OTU, de las cuales las más estrechamente relacionadas son la Morre b II y Morre o I a la cual se le asocia la Morre o II con un bajo grado de similitud (distancia=1,405).

4.2.2. Fenograma 2 (Técnica Q, Método del Ligamiento Promedio)



En este fenograma se observa que la OTU Arau h III queda aislada del resto de las OTU comparadas y que su relación se establece con Ascle c II a un bajo valor del grado de similitud (distancia=1,759).

Continuando con el análisis de este fenograma y excluyendo a la OTU Arau h III, se observa dos grandes grupos, grupos **2.a** y **2.b** que se relacionan entre sí por el par de OTU Morre o I-Ascle c II (distancia=1,586).

-Grupo 2.a: integrado por Arau a III, Arau h II, Ascle c II, Ascle f, Funa c II, Arau h I, Morre b I, Arau a II, Arau a I, Ascle c I y Phili g I.

Dentro de este grupo la OTU Arau a III queda aislada del resto pero integra este grupo por su grado de similitud con la OTU Ascle c II (distancia=1,499). Así quedan delimitados dos subgrupos:

♦**subgrupo 2.a.1.:** Arau h II, Ascle c II, Ascle f y funa c II.

Aquí las OTU Arau h II y Ascle c II (distancia=0,616) por un lado, y Ascle f y Funa c II (distancia=0,057), por otro, se encuentran estrechamente relacionadas. Estos dos pares de OTU se asocian entre sí por la similitud entre Funa c II y Ascle c II (distancia=1,036).

♦**subgrupo 2.a.2.:** Arau h I, Morre b I, Arau a II, Arau a I, Ascle c I y Phili g I.

En este subgrupo la OTU Phili g I queda aislada del resto de las OTU comparadas pero integra este subgrupo por su asociación con Arau h I con un valor de distancia de 0,993.

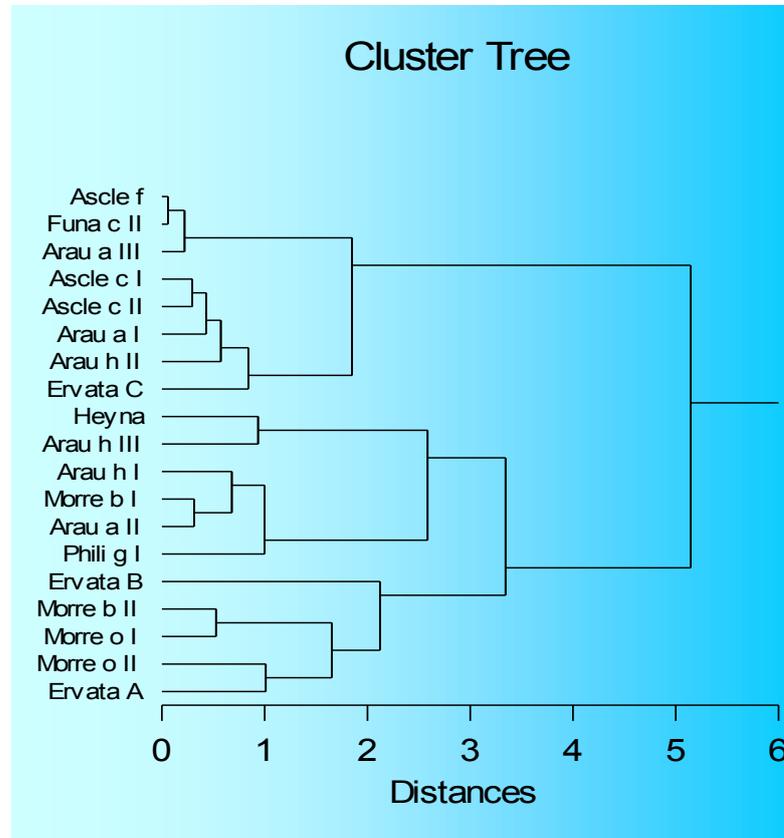
Este subgrupo cuenta con los pares de OTU Arau a I que se relaciona estrechamente con Ascle c I (distancia=0,598) y Morre b I haciendo lo propio con Arau a II (distancia=0,405). Ambos pares se relacionan por la OTU Arau h I que se une a este último par por medio de la OTU Morre b I (distancia=0,596). Este último grupo formado por tres OTU con el primer par de OTU se asocian a través de la similitud entre Ascle c I y Arau h I con un valor de distancia de 0,929.

Los subgrupos **2.a.1.** y **2.a.2.** se asocian entre sí por las OTU Ascle c II y Arau h I con un valor de distancia de 1,235.

-**Grupo 2. b.:** constituido por Morre b II, Morre o I, Morre o II.

Las OTU Morre b II y Morre o I están estrechamente relacionadas entre sí, y a la OTU Morre o II se asocia la OTU Morre o I.

4.2.3. Fenograma 3 (Técnica Q, Método de la Varianza Mínima de Ward)



En este fenograma, visualmente se observan dos grandes grupos que se relacionan entre sí por el par de OTU Arau h II y Ervata B con un valor de distancia de 5,144.

-Grupo 3.a.: conformado por Ascle f, Funa c II, Arau a III, Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II, Ervata C. En éste se aprecian dos subgrupos:

•subgrupo 3.a.1.: constituido por el par de OTU Ascle f y Funa c II estrechamente asociadas (distancia=0,059) al que se les une Arau a III, mediante su relación con Funa c II (distancia=0,221).

•**subgrupo 3.a.2.:** aquí el par conformado por por Ascle c I y Ascle c II (distancia=0,297) está relacionado la OTU Arau a I que se asocia a Ascle c II (distancia=0, 431). A este terceto de OTU se asocia Arau h II por su relación con la Arau a I (distancia=0,574) y finalmente Ervata C se relaciona con este cuarteto de OTU mediante su asociación con Arau h II (distancia=0,841).

Los subgrupos **3.a.1.** y **3.a.2.** se relacionan a través del par de OTU Arau h II y Arau a III (1,849).

-**Grupo 3.b.:** Constituido por Heyna, Arau h III, Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Ervata B, Morre b II, Morre o I, Morre o II, Ervata A.

Este grupo está formado, a su vez, por dos subgrupos:

•**subgrupo 3.b.1.:** integrado por Heyna, Arau h III, Arau h I, Morre b I, Arau a II y Phili g I.

Aquí se observa los pares de OTU Morre b I-Arau a II y Heyna-Arau h III están estrechamente relacionadas con valores de distancia de 0,314 y 0,936, respectivamente. Al primer par se le asocia la OTU Arau h I por su relación con Morre b I (distancia=0,681) y a este nuevo grupo formado se le asocia Phili g I por su relación con Arau h I (distancia=0,998). La OTU Heyna se integra a este subgrupo por su relación con Arau h I (distancia=2,586).

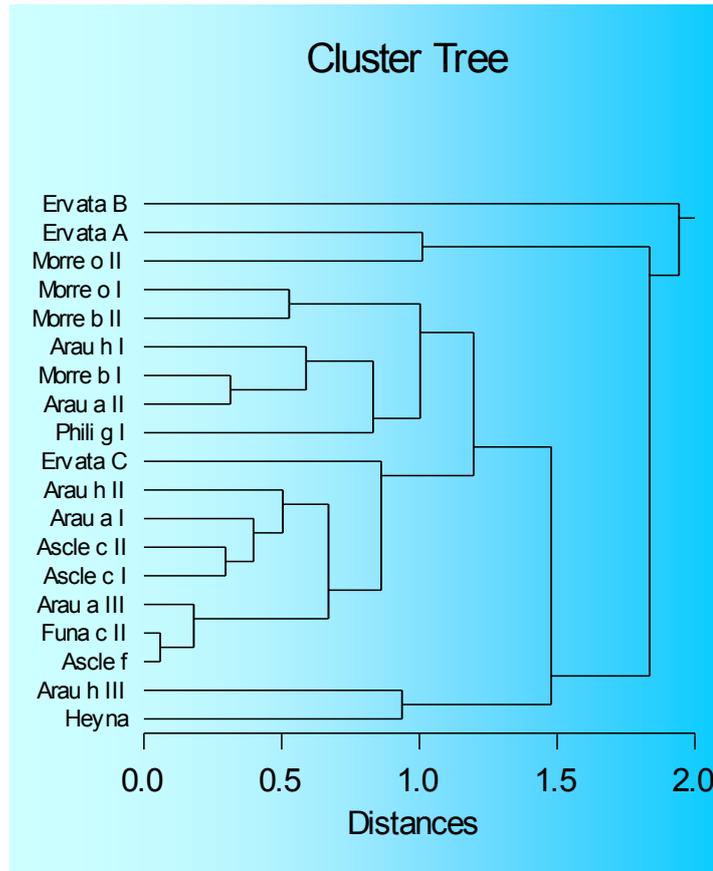
•**subgrupo 3.b.2.:** formado por Ervata B, Morre b II, Morre o I, Morre o II y Ervata A.

En este subgrupo existen dos pares de OTU muy relacionadas entre sí, el par conformado por Morre b II-Morre o I (distancia=0,527) y el par Morre o II-Ervata A (distancia=1,010). Ambos pares se relacionan por las OTU Morre o I y Ervata A (distancia=1,652). La OTU Ervata B queda aislada del resto

de las OTU, pero se integra a este subgrupo mediante su relación con Morre o I (distancia=2,122).

Ambos subgrupos se relacionan por el par de OTU Ervata B y Heyna, (3,343).

4.2.4. Fenograma 4 (Técnica Q, Método del Ligamiento Promedio)



En este fenograma se aprecia que la OTU Ervata B queda aislada del resto, y su relación con las OTU comparadas se da por medio de la OTU Heyna con un valor de distancia de 1,942. Así, exceptuando a Ervata B, las OTU restantes se organizan en dos grupos, enlazándose éstos por medio del par de OTU Heyna-Ervata A (1,835):

-Grupo 4.a.: formado por un único par de OTU que son Ervata A y Morre o II que se asocian con un valor de distancia de 1,010.

•**Grupo 4.b.:** constituido por Morre o I, Morre b II, Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Ervata C, Arau h II, Arau a I, Ascle c II, Ascle c I, Arau a III, Funa c II, Ascle f, Arau h III y Heyna.

A su vez este grupo se subdivide en dos subgrupos:

•**subgrupo 4.b.1.:** integrado por un solo par de OTU Arau h III y Heyna, las cuales se relacionan con un valor de distancia de 0,936.

•**subgrupo 4.b.2.:** constituye un amplio grupo que a su vez se organiza en conjuntos más pequeños.

conjunto 4.b.2.1.: integrado por Morre o I, Morre b II, Arau h I, Morre b I, Arau a II y phili g I.

Aquí se encuentran dos pares de OTU que se asocian entre sí: Morre o I-Morre b II y Morre b I-Arau a II. A este último par se asocia la OTU Arau h I, por su relación con Morre b I (distancia=0,589). A estas tres últimas OTU se le asocia Phili g I por su relación con Arau h I (distancia=0,831). Entonces, queda conformado el grupo por la asociación entre Morre o I y Arau h I (distancia=1,002).

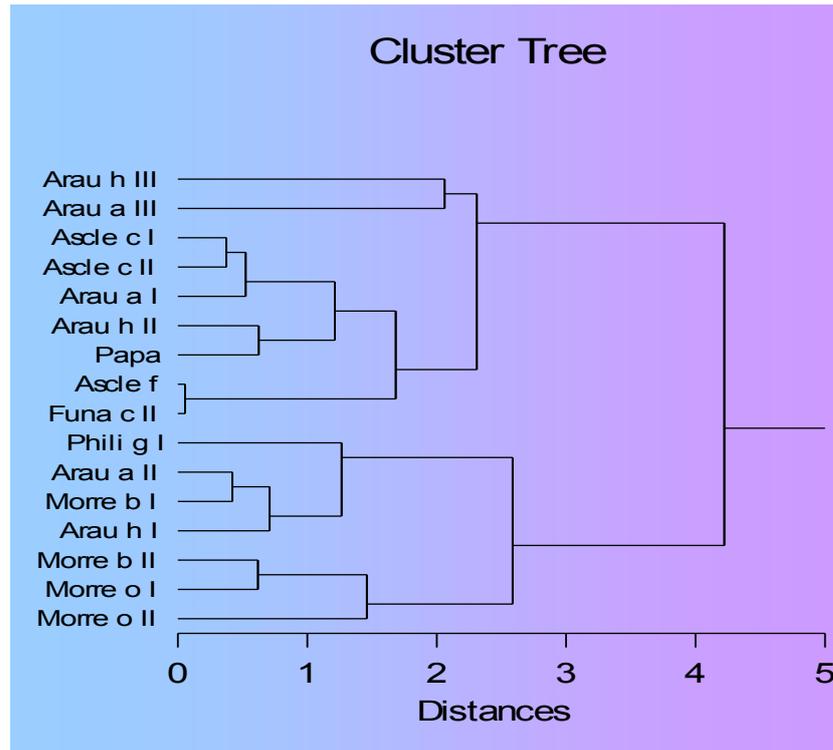
conjunto 4.b.2.2.: formado por Ervata C, Arau h II, Arau a I, Ascle c II, Ascle c I, Arau a III, Funa c II y Ascle f.

En este caso se observa que el par de OTU Ascle c II-Ascle c I se encuentran relacionados con un valor de distancia de 0,297; y, lo correspondiente sucede con el par conformado por Funa c II y Ascle f, con un valor de 0,059 de distancia. Así, a este último par se asocia Arau a III mediante la OTU Funa c II (distancia=0,181). Del mismo modo, al par Ascle c II-Ascle c I se le une Arau a I por su relación con Ascle c II (distancia=0,397). Finalmente la OTU Arau h II se une a estas últimas tres por la OTU Arau a I (distancia=0,504).

Por último Ervata C integra este subgrupo por su relación con la OTU Arau h II (distancia=0,861).

Los conjuntos **4.b.2.1.** y **4.b.2.2.** se relacionan por las OTU Arau h II y Morre o I (distancia=1,196); mientras que los subgrupos 4.b.1. y 4.b.2. lo hacen por las OTU Heyna y Arau h II (distancia=01,479).

4.2.5. Fenograma 5 (Técnica Q, Método de la Varianza Mínima de Ward)



En este fenograma se observan dos grandes grupos, los cuales se asocian por el par de OTU Papa y Morre o I a una distancia de 4,222.

-Grupo 5.a.: integrado por Arau h III, Arau a III, Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II, Papa, Ascle f y Funa c II. Este subgrupo se divide en dos subgrupos:

•**subgrupo 5.a.1.:** constituido sólo por las OTU Arau h III y Arau a III, las cuales se asocian a una distancia de 2,061.

•**subgrupo 5.a.2.:** conformado por tres pares de OTU: Ascle c I-Ascle c II, Arau h II-Papa y Ascle f-Funa c II. La OTU Arau a I se asocia a Ascle c II a una distancia de 0,525.

Ascle c I, Ascle c II y Arau a I por un lado, y, Arau h II y Papa por otro, se relacionan entre sí por la asociación entre Papa y Arau a I a una distancia de 1,213.

Finalmente la relación entre las OTU Papa y Funa c II (distancia=1,683) cierra la constitución de este grupo.

-Grupo 5.b.: formado por Phili g I, Arau a II, Morre b I, Arau h I, Morre b II, Morre o I y Morre o II.

En este grupo se observa dos subgrupos:

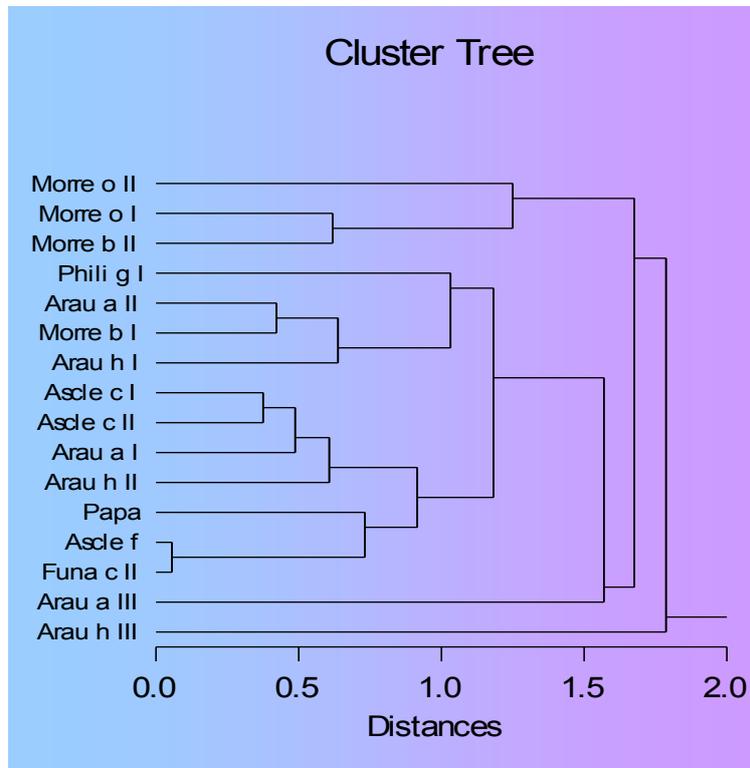
•subgrupo 5.b.1.: formado por Phili g I, Arau a II, Morre b I y Arau h I.

En este subgrupo las OTU Arau a II y Morre b I están asociadas con un valor de distancia de 0,422. A este par se une la OTU Arau h I por su relación con Morre b I (distancia=0,710). Por último la OTU Phili g I se une al conjunto anterior por la relación con Arau h I (distancia=1,265).

•subgrupo 5.b.2.: integrado por Morre b II, Morre o I y Morre o II.

En este subgrupo se aprecia la estrecha relación entre Morre b II y Morre o I, a la cual se le asocia la OTU Morre o II a una distancia de 1,460.

4.2.6. Fenograma 6 (Técnica Q, Método del Ligamiento Promedio)



En este último fenograma se observa un amplio grupo conformado por Morre o II, Morre o I, Morre b II, Phili g I, Arau a II, Morre b I, Arau h I, Ascle c I, Ascle c II, Arau a II, Morre b I, Arau h I, Ascle c I, Ascle C II, Arau h II, Papa, Ascle f , Funa C II y Arau a III; quedando una OTU aislada que es Arau h III, que mediante su relación con Arau a III a una distancia de 1,7187 se une a las restantes OTU que se están comparando.

Dentro del amplio grupo de OTU se diferencian dos grupos:

-Grupo 6.a.: formado por Morre o II, Morre o I y Morre b II.

En este grupo el par conformado por Morre o I y Morre b II se relacionan con un valor de distancia de 0,619 y a este par se integra la OTU Morre o II por su relación con Morre o I a una distancia de 1,250.

-Grupo 6.b.: integrado por Phili g I, Arau a II, Morre b I, Arau h I, Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II, papa, Ascle f, Funa c II y Arau a III.

Aquí se destaca una OTU aislada, Arau a III, que mediante su relación con Arau h II (distancia=1,569) integra este conjunto de OTU.

Continuando con el análisis de este grupo se observa la conformación de dos subgrupos:

•subgrupo 6.b.1.: formado por Phili g I, Arau a II, Morre b I y Arau h I.

En este subgrupo las OTU Arau a II y Morre b I, se asocian estrechamente (distancia=0,422). A su vez, a este par se le une Arau h I por su relación con Morre b I (distancia=0,638).

Este subgrupo se completa con la OTU Phili g I que se relaciona con Arau h I con un valor de distancia de 1,032.

•subgrupo 6.b.2.: integrado por Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II, Papa, Ascle f y Funa c II.

En este subgrupo existen dos pares de OTU: Ascle c I-Ascle c II (distancia= 0,375) y Ascle f-Funa c II (distancia=0,056). A este último par se le asocia Papa por su relación con Funa c II (distancia=0,731). También al par conformado por Ascle c I y Ascle c II se le une la OTU Arau a I por su asociación con Ascle c II (distancia=0,487). Finalmente Arau h II se relaciona con las tres últimas nombradas por su relación con Arau a I (distancia=0,607).

La relación entre el par de OTU Papa-Arau h II (distancia=0,915) relaciona las OTU de este subgrupo.

Ambos subgrupos se relacionan por el par de OTU Arau h II-Arau h I a una distancia de 1,182.

Los grupos **6.a.** y **6.b.** se relacionan por la asociación entre las OTU Arau a III y Morre o I a una distancia de 1,676.

Como ya se ha mencionado en el ítem 3.2.4., los fenogramas se analizaron bajo dos técnicas diferentes de análisis de agrupamiento, cuyos resultados demostraron ser equiparables uno con otro en cada par analizado: los fenogramas 1 y 2 que compara las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* entre sí, los fenogramas 3 y 4 correspondientes a la comparación de las OTU de las Familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* y finalmente la comparación de las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* con la OTU papaína de la Familia *Caricaceae* en los fenogramas 5 y 6.

Del análisis comparado de los resultados de los fenogramas se observan grupos de OTU que se encuentran muy relacionados entre sí manteniéndose como tales en la totalidad de los fenogramas presentados. Dichos grupos son:

- ✓ Ascle f y Funa c II lo que se aprecia en todos los fenogramas.
- ✓ Morre b II, Morre o I y Morre o II en los fenogramas 1, 2, 5 y 6.
- ✓ Ascle c I y Ascle c II en los fenogramas 3, 4, 5 y 6.
- ✓ Arau a I con Ascle c II en los fenogramas 3, 4, 5 y 6, mientras que en los fenogramas 1 y 2 la relación se establece con la OTU Ascle c I. Es necesario aclarar en este punto que a pesar que en dicha relación Arau a I la establece con dos OTU diferentes, Ascle c I y Ascle c II, ambas OTU pertenecen a la misma especie *Asclepias curassavica* L., por lo que se puede inferir su estrecho parentesco con las dos fitoproteasas nombradas.
- ✓ Phili g I y Arau h I están asociadas en todos los fenogramas analizados. Cabe aclarar que la OTU Phili g I en ninguno de los fenogramas mostrados se asocia estrechamente a una única OTU, sino que su relación es con otro par conformando un grupo integrado por tres OTU como en el fenograma 1, un grupo de cuatro OTU en los fenogramas 2, 3, 5 y 6 o un grupo de seis OTU como se aprecia en el fenograma 2.

Es necesario recordar en este momento que los sistemas de clasificación y nomenclatura de la escuela Evolucionista y Cladista, en algunos casos son semejantes, pero como resultado de sus diferentes métodos, finalmente resultan ser distintos. Recordemos que los evolucionistas pretenden que su clasificación refleje las relaciones evolutivas, la cantidad de cambio y tengan un sentido práctico y estable. En cambio para los cladistas la clasificación debe reflejar el patrón de ramificación de la evolución.

Cuando se comparan las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* (Fenogramas 1 y 2) con las correspondientes a la Familia *Apocynaceae* (Fenogramas 3 y 4), se pone de manifiesto que existe mayor similitud entre las *Asclepiadáceas* entre sí (grupos **3.a.** y **4.b.** respectivamente) que entre éstas con las *Apocináceas*. Esto indicaría una separación entre ambas familias por sus características fenéticas.

Esto se evidencia aún más en:

√ el grupo formado por Morre b II, Morre o I y Morre o II donde la similitud se establece entre *Ervata A* con las OTU Morre o II y Morre o I, mientras que *Ervata B* se relaciona con Morre o I. Así, la relación entre ambos subgrupos es por *Ervata B* y *Heyna* lo que confirmaría que este terceto de OTU (Morre b II, Morre o I y Morre o II) se asemeja más a las *Apocináceas* que a las *Asclepiadáceas*. Es por esta razón que siempre en todos los fenogramas se encuentran separadas de las OTU que pertenecen a la Familia *Asclepiadaceae*. Esta separación también se presenta en los fenogramas 1 y 2 en los cuales dicho grupo se encuentra aislado de las otras OTU.

√ el fenograma 3 las relaciones que se dan a bajos niveles de similitud se establecen entre las *Apocináceas* (*Ervata B* y *Heyna* cuya distancia fenética es igual a 3,343) marcando aún más la separación entre ambos grupos de OTU pertenecientes a las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*.

Un cladista estaría en desacuerdo con esta afirmación ya que no consideraría a las relaciones basadas en la similitud global de los caracteres. Esta escuela argumenta que si dos grupos son similares no necesariamente significa que sus relaciones evolutivas sean cercanas. Estas semejanzas pueden ser debidas a la congruencia evolutiva. Es decir, dicha congruencia se refiere al proceso por el cual los caracteres de especies pertenecientes a líneas evolutivas independientes pueden tener semejanzas en respuesta a las adaptaciones que surgen de similares presiones de selección (Queiroz & Gauthieri, 1992; Cantino, 1998).

Los cladogramas de la corriente cladista son diagramas de clasificación jerárquica que reflejan caracteres derivados (sinapomorfías) que relacionan a los organismos. También, los seguidores de esta escuela consideran a estos cladogramas como hipótesis testeables desestimando a los caracteres primitivos ya que éstos no reflejan similitud filogenética. Finalmente, esta corriente tiende a crear un gran número de categorías taxonómicas, una por cada nodo de un cladograma, lo que lleva a un exceso de categorías jerárquicas. De este modo cada cladograma representa una hipótesis evolutiva global lo que la convierte en algo extremadamente cambiante debido a que nuevos estudios pueden llevar a una nueva clasificación taxonómica, con cambios jerárquicos dramáticos. Por lo tanto, las clasificaciones cladistas no son estables como la de los taxónomos evolucionistas, habiendo un continuo cambio de categorías taxonómicas, lo cual estaría agravando aún más la taxonomía de los seres vivos.

Sin embargo, a pesar de la revolución molecular cladista de las décadas de los 80 y 90 que se ha evidenciado por el crecimiento exponencial en el número de árboles filogenéticos publicados en la comunidad científica mundial, en la actualidad una de las mayores críticas que se le hace al cladismo es que se está convirtiendo en un método automático de obtención de resultados por lo que se acerca al feneticismo, evitándose cualquier discusión de tipo evolutivo y dejando todo en manos de la parsimonia.

Para solucionar este problema, en el presente, se está tendiendo a la búsqueda de nuevos caracteres que permitan acceder a nuevas fuentes de

información filogenética. Así, los datos provenientes de estudios de secuenciación de ADN, estudios ontogenéticos basados en un contexto filogenético con el objeto de evitar errores en los conceptos de estructuras homólogas, entre otros, cambiarían la idea que se tiene sobre la evolución puntual de algunos grupos de organismos. Además los análisis morfológicos y moleculares constituyen *las dos caras de una misma moneda* y deben utilizarse de manera complementaria (Fishbein, 2001; Stuessy, 1997).

Wenzel, 1997 entiende que abandonar el sistema de clasificación Lineano (compatible con la corriente evolucionista) para reemplazarlo por otro basado en clados, es imposible debido a que existen pocos cladogramas disponibles que reflejen la clasificación filogenética completa haciéndolo así, no aplicable para reemplazar el sistema de clasificación existente.

Autores como Brummitt, 1997; Sennbland & Bremer, 2002; Hegnauer, 1964, coincidiendo con Wenzel, sugieren que hasta tanto no se clarifique este debate, debe mantenerse la clasificación lineana con los grupos parafiléticos, pero desarrollando paralelamente a ésta, un sistema dicotómico independiente basado en clados con una nomenclatura propia.

Es importante aclarar que existen autores como E. Crisp (www.wvup.edu/ecrisp/biolgeol397speciesandspeciation.htm) que consideran que el método feneticista es objetivo, repetible y en numerosas ocasiones no muestra las mejores relaciones de parentesco en la evolución de los organismos.

Finalmente del análisis de los resultados de los fenogramas 5 y 6 en los cuales se hace una comparación de las OTU de la Familia *Asclepiadaceae* estudiadas con la OTU papaína de la Familia *Caricaceae*, se observa que papaína se asocia íntimamente a Arau h II y a mayor distancia a Funa c II.

5. Conclusiones

De acuerdo a los datos recolectados de las fitoproteasas consideradas en el presente estudio que condujeron a obtener los resultados presentados, se concluye que:

- ✓ De un total de 15 fitoproteasas analizadas de la Familia *Asclepiadaceae*, 12 de ellas se separan notoriamente de aquellas pertenecientes a la Familia *Apocynaceae*. Ellas son: Araujiaína a I, Araujiaína a II, Araujiaína a III, Araujiaína h I, Araujiaína h II, Araujiaína h III, Asclepaína c I, Asclepaína c II, Asclepaína f, Funastraina c II, Morrenaína b I y Philebertaína g I.
- ✓ El grupo formado por las fitoproteasas Morrenaína b II, Morrenaína o I y Morrenaína o II se asemejan más a las fitoproteasas de la Familia *Apocynaceae* que a las de la Familia *Asclepiadaceae*, pero haciendo la salvedad que esta separación surge de los datos que se consideraron en este trabajo.
- ✓ Las fitoproteasas Araujiaína h II y Funastraina c II son las que más parecido tienen a papaína.

Concluyendo, la ubicación que se le da a un determinado taxón o grupos de taxones, va a depender de la escuela que se siga debido a que cada una de ellas tiene una forma diferente de evaluar los distintos tipos de características que utilizan para realizar sus clasificaciones taxonómicas. Entonces, debido a la aplicación de la metodología de la Escuela Feneticista utilizada en el desarrollo de este trabajo, se puede concluir que las Familias *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae* se mantienen como Familias independientes.

6. Bibliografía

- Bentham, G. (1876). "Asclepideae". En: Bentham G, Hooker, JD, *Genera plantarum*. vol 2. London: L. Reeve. 728-785.
- Blackwelder, R. E. y Boyden, R. A. (1952). "The nature of Systematics". *Sys. Zool.* **1**: 26.
- Bock, W.J. (1973). "Philosophical Foundations of Classical Evolutionary Classification". *Sys. Zool.* **22**: 375.
- Borgmeir, T. (1957). "Basic Questions of Systematics". *Sys. Zool.* **6**:53.
- Brown, R. (1811). "On the *Asclepiadeae*, a natural order of plants separated from the *Apocynae* of Jussieu. *Mem. Wernerian Nat. Hist. Soc.* **1**:12-78. Reproducido en 1867 en *Miscellaneous Bot. Works of R. Brown II*: 193-247, en *Darwiniana* **23**(2-4):368.
- Brummitt, R.K. (1997). "Taxonomy versus cladonomy, a fundamental controversy in biological systematics". *Taxon.* **46**:723-734
- Brundin, L. (1968). "Application of Phylogenetic Principles in Systematics and Evolutionary Theory". *Nobel Symp.* **4**: 473.
- Bruyns, P. V. & Forster, P. I. (1991). "Recircumscription of the Stapelieae". *Taxon* **40**:381-391.
- Cantino, P.D. (1998). "Binomials, Hyphenated uninomials and phylogenetic nomenclature". *Taxon* **47**:425-429.
- Colless, D. H. (1967). "The Phylogenetic Fallacy". *Syst. Zool.* **16**:289.
- Cortadi, A.A. (2001). "Estudio ontogenético y estructural de los laticíferos de *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*). Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex". Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Crisci, J. & López Armengol, M. F. (1983). "Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica". Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía Nro. 26.
- Cronquist, A. (1981). "An integrated system of classification of flowering plants". Columbia University Press, New York. Pp.:1262.
- Decaisne, J. (1844). "Asclepiadeae". En: de Candolle AP. *Prodomus systematis naturalis* vol. 8. Paris, 490-665.
- Duncan, T & Baum, B. R. (1981). "Numerical Phenetics: its Uses in Botanical Systematics". *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **12**:387.
- Endress, M.E. & Bruyns, P.V., (2000). "A revised Classification of the *Apocynaceae* s.l". *Bot. Rev.* **66**(1): 1-56.
- Fishbein, M. (2001). "Evolutionary innovation and diversification in the flowers of *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden.* **88**:603-623.
- Gilmartin, A. J. (1967). "Numerical Taxonomy-An Eclectic Viewpoint". *Taxon.* **16**:8.
- Hegnauer, (1964). R. Hegnauer En: *Chematoxonomie der pflanzen* vol III, Birkhäuser Verlag, Basel (1964), pp.: 199-224.
- Hennig, W. (1968). "Elementos de una Sistemática Filogenética". *Eudeba*. Buenos Aires. 353 págs.
- Heywood, V. H. & McNeill, J. (1964). "Phenetic and Phylogenetic Classification". *Sys. Ass. Pub.* **6**:1.
- Hooker, J. D. (1883). "Asclepideae". En Hooker JD. *Flora of British India*, vol. 4. Kent: Reeve.pp.:1-78.
- Hull, D. L. (1965). "The Effect of Essentialism on Taxonomy-Two Thousand Yeas of Stasis". *Brit. J. Phil. Sci.* **15**:314 ; **16**: 1.
- Hull, D. L. (1970). "Contemporary Systematic Philosophies". *Annual Rev. Ecol. Syst.* **1**:19.
- Janvier, P., Tassy, P., Thomas, H. (1980). "Le Cladisme". *La Recherche.* **117**(11): 1396.
- Johnson, D. E. (2000). "Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos". Ed: International Thomson Editores.
- Johnson, L. A. S. (1968). *Rainbow's Ed: The Quest for an Optimal Taxonomy*. Proc. Linn. Soc. New South Wales. **93**:8.
- Jussieu, A.L. (1789). *Gen. Plant.*:143-151. En *Darwiniana* **23**(2-4):368.

- Kundu S, Sundd M, Jagannadham MV. (1999). "Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**(3):635-42.
- Kundu S, Sundd, M, Jagannadham, M.V. (2000). "Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*" *J. Agric. Food. Chem.* **48**(2):171-9.
- Liede, S & Tauber, A. (2002). "Circumscription of genus *Cynanchum* (*Apocynaceae-Asclepiadoidea*)". *Sys. Bot.* **27**: 789-800.
- Liggieri, C; Arribére, M. C.; Trejo, S A.; Canals, F.; Avilés, F.; Priolo, N. (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L". *The Journal Protein*. Ed: Kluwer Academic Publishers. **23**(6):403-411.
- Mayr, E. (1965). "Numerical Phenetics and Taxonomic Theory". *Sys. Zool.* **14**:73.
- Mayr, E. (1969). "Principles of Systematic Zoology", McGraw-Hill, Nueva York, N. Y. 428 págs.
- Mayr, E. (1974). "Cladistic Analysis or Cladistic Classification?". *Z. F. Zool. Syst. u. Evol.* **12**:94.
- Mayr, E. (1981). "Biological Classification: Toward a Synthesis of Opposing Methodologies". *Science* **214**:510.
- Michener, C. D. (1970). "Diverse Approaches to Systematics". *Evolut. Biol.* **4**:1.
- Morcelle del Valle, S. R., Trejo, S. A., Canals, F., Avilés, F. X. Priolo, N. S. (2004). "Funastrin c II, a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*". *Protein J.* **25**:205-215.
- Patel, B.K., Jagannadham, M.V. (2003). "A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food. Chem.* **51**(21):6326-34.
- Obregón, W.D., Arribére, M.C., Morcelle del Valle, S., Liggieri, C., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* **20**:17-25.
- Popper, K. R. (1950). "The open Society and its Enemies", Routledge and Kegan Paul, Ltd., Londres. Vol. 1, 351 págs.
- Potgieter, K. (1999). "Phylogenetic study of *Apocynaceae* Juss. and *Aspidosperma* Mart. & Zucc". Ph.D.diss., University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Potgieter, K. & Albert, V. (1998). "Non-floral morphological correlates of the *Apocynaceae* s.s.-*Periplocaceae-Asclepiadaceae* transition (i.e., dispersal traits) mapped onto a trnL-F derived consensus tree". *Amer. J. Bot.* **85**(6):152.
- Queiroz, K. & Gauthier, J. (1992). "Phylogenetic taxonomy". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**:449-480.
- Rollins, R. C. (1965). "On the bases of Biological Classification". *Taxon.* **14**:1.
- Rosatti, T.J. (1989). "The genera of suborder *Apocynineae* (*Apocynaceae* and *Asclepiadaceae*) in the Southeastern United States". *Journal of the Arnold Arboretum* **70**: 443-514.
- Ruse, M. (1973). "The Philosophy of Biology". Hutchinson University Library, Londres. 231 págs.
- Safwat, F.M. (1962). "The floral morphology of *Secamone* and the evolution of pollinating apparatus in *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden* **49**:45-129.
- Schlee, D. (1969). Hennig's Principle of Phylogenetic Systematics, an "Intuitive" Statistico-Phenetic Taxonomy?. *Syst. Zool.* **18**: 127.
- Schlee, D. (1975). "An Analysis of numerical Phenetics". *Ent. Scand.* **6**:1.
- Schumann, K. (1895). "*Asclepidaceae*". En: Engler A, Prantl K. Die natürlichen pflanzenfamilien. **4** (2):189-306.
- Sennblad, B. (1997). "Phylogeny of the *Apocynaceae* s.l.". (Ph.D. dissertation summary). Acta Universitatis Uppsaliensis. Comprehensive Summaries Uppsala Dissertations, Faculty of Science and Technology 295. 18 pp. Uppsala.
- Sennblad, B., & B. Bremer. (2002). "Classification of *Apocynaceae* s.l. according to a New Approach Combining Linnean and Phylogenetic Taxonomy *Systematic Biology* **51**:1-21.

- Sequeiros, C.; M.J. Torres, S.A. Trejo, C. L. Natalucci, L. M. I. López. (2005). "Philibertain g I the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal* **4**(7). En Prensa.
- Simpson, G.G. (1961). "Principles of Animal Taxonomy". Columbia University Press. Nueva York. 247 págs.
- Sneath, P.H.A. (1978). "Classification of microorganisms". Essays in Microbiology. Norris, J.R. y Richmond, M.A. (eds). Wiley, Nueva York. N.Y. **9**:1.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973). "The principle and practice of numerical classification". In: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.), *Numerical Taxonomy*. Freeman Press, San Francisco.
- Sokal, R.R. (1975). "Numerical Phenetics: A Reply to Dieter Schlee". *Ent. Scand.* **6**:209.
- Sokal, R.R. & Camin, J.H. (1965). "The Two Taxonomies: Areas of Agreement and Conflict". *Syst. Zool.* **14**:176.
- Sreedevi, N., Kundu, S., Medicherla, V., Jagannadham, M.V. (2003). "Purification and Biochemical Characterization of a Highly Active Cysteine Protease Ervatamin A from the Latex of *Ervatamia coronaria*". *Journal of Protein Chemistry*. **22**(1):1-13.
- Stevens, W.D. (1983). "New species and names in *Apocynaceae*, *Asclepiadoideae*". *Phytologia*. **53**(6):401-405.
- Stussey, T.F. (1997). "Classification: more than just branching patterns of evolution". *Alisa* **15**:113-124.
- Swarupanandan, K., Mangaly, J., Sonny, T. K., Kishorekumar, K., Chand Basha, S. (1996). "The Subfamilial and Tribal Classification of the family *Asclepiadaceae*". *Bot. Journal of the Linnean Society*. **120**:327-369.
- SYSTAT. (1997). Systat, version 7.0. SPSS Inc. Chicago, IL, USA.
- Thompson, W. R. (1952). "The Philosophical Foundations of Systematics". *Can. Entomol.* **84**:1.
- Thompson, W. R. (1962). "Evolution and Taxonomy". *Studia Entomol.* **5**:549.
- Trejo, S.A., López, L.M.I, Cimino, C.V., Caffini, N.O., Natalucci, C.L. (2001). "Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)". *J. Protein Chem.* **20**:445-453.
- Vairo Cavalli, S.E., Cortadi, A., Arribére, M.C., Conforti, P., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**:879-883.
- Vairo Cavalli, S., Arribére, M.C., Cortadi, A., Caffini, N.O., Priolo, N.S. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *J. Protein Chem.* **22**:15-22.
- Wenzel, P. C. Van. (1997). "Paraphyletic groups or what should a classification entail". *Taxon*. **47**:413-423.
- Wiley, E.O. (1981). "Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics". Wiley. Nueva York, N.Y. XV, 439 págs.
- Williams, W. T. (1967). "Numbers, Taxonomy and Judgement". *Bot. Rev.* **33**:379.