



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

PROTEÍNAS DE AMARANTO : ASPECTOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS
CON LA MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA.



Tesis Doctoral -Paula Aphalo
2006.

El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) bajo la dirección de la **Dra. María Cristina Añón** y la codirección de la **Dra. Nora Martínez**.

*Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarte un día sin saber qué hacer,
tener miedo a tus recuerdos.
Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo,
no convertir en realidad tus sueños.*

*Queda prohibido no demostrar tu amor,
hacer que alguien pague tus dudas y tu mal humor.
Queda prohibido dejar a tus amigos,
no intentar comprender lo que vivieron juntos,
llamarles sólo cuando los necesitas.*

*Queda prohibido no ser tú ante la gente,
fingir ante las personas que no te importan,
hacerte el gracioso con tal que te recuerden,
olvidar a toda la gente que te quiere.*

*Queda prohibido no hacer las cosas por ti mismo,
no creer en Dios y hacer tu destino,
tener miedo a la vida y a sus compromisos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.*

*Queda prohibido echar a alguien de menos
sin alegrarte, olvidar sus ojos, su risa,
todo porque sus caminos han dejado de abrazarse,
olvidar su pasado y pagarlo con su presente.*

*Queda prohibido no intentar comprender a las personas,
pensar que sus vidas valen más que la tuya,
no saber que cada uno tiene su camino y su dicha.*

*Queda prohibido no crear tu historia,
dejar de dar gracias a Dios por tu vida,
no tener un momento para la gente que te necesita,
comprender que lo que la vida te da, también te lo quita.*

*Queda prohibido no buscar tu felicidad,
no vivir tu vida con actitud positiva,
no pensar que podemos ser mejores,
no sentir que sin ti el mundo no sería igual.*

*Poema de Pablo Neruda
"Queda prohibido"*

AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta ardua etapa de escritura y elaboración de todo el trabajo realizado, se hace imprescindible agradecer a quienes han permitido su finalización.

A las directoras de este trabajo, Dra. María Cristina Añón y la Dra. Nora Martínez quienes a lo largo de estos años, han sido una parte muy importante en mi formación profesional y personal; por sus opiniones y sus consejos.

A la Agencia de Promoción Científica y Técnica (ANPCy T), a la Fundación Antorchas y a la Universidad Nacional de La Plata, entidades que mediante el otorgamiento de becas han apoyado financieramente este trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata, por haberme abierto sus puertas dándome la posibilidad de realizar mis estudios de postgrado.

A mis padres, Lucía y Francisco quienes mediante su esfuerzo e ímpetu me han impulsado a concretar muchos desafíos y anhelos.

A mis hermanos Mariano y Federico; y a mis familiares por su cariño más allá de las distancias.

A Mariano y Alejandra, por contar con su apoyo, sostén y afecto ante cualquier necesidad.

A mis sobrinos, Agustina y Facundo por su infinita paciencia y su cariño desinteresado.

A mis compañeros del Laboratorio de Proteínas, Ariana, Aldo, Alejandrita, Bruno, Fabricio, Jorge, Francisco, Gabriela, Gabriela A., Pablo, Adriana M., Adriana S., Silvana, Sara, Cecilia, Renata, Cachito, Isabel, Flavio, María, Cristina, Pato y Lili; por hacer mucho más agradable el ámbito del trabajo en el laboratorio, por todos los momentos compartidos.

A Lili, Alejandrita, Sara, Silvana, Lorenza; Adriana, Pinti, Isa y Paula, por su amistad y su cariño permanente.

A Alejandrita, Agustín, Lili, Lorenza, Santiago; Manuel, Analía; Anita, Pablo; Isa, Alejandro, Ariel, Paula y Ale por todos los buenos momentos compartidos y por todos los que vendrán.

Al Dr. Alberto Fossati, Dr. Martín Rumbo y al Dr. Fernando Chirido por el asesoramiento en los estudios inmunoquímicos.

Al grupo de Extensión de la Facultad de Ciencias Exactas, por su generosidad para que pudiera concretar la escritura de este trabajo.

A la gente de la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

A Gabriela, Alejandrita, Sara y Adriana M. por su ayuda en la impresión de este trabajo.

A los "chicos del Anexo" Alejandro, Alberto, Darío, Sebastián, Sandro y Leo por su buena onda y el permanente suministro de mates, música y cualquier elemento comestible tan indispensables durante la última etapa de escritura de este trabajo.

A todos mis compañeros del CIDCA, mis más sinceros agradecimientos.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del amaranto. Breve reseña teórica	1
Características y utilización de esta planta	2
Las semillas de amaranto	3
CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA	5
SUPERFAMILIA DE GLOBULINAS DE RESERVA	6
<i>Generalidades</i>	6
<i>Globulinas (11S): características estructurales</i>	6
<i>Vicilinas (7S): características estructurales</i>	8
SUPERFAMILIA DE LAS PROLAMINAS DE RESERVA	8
PROTEÍNAS DE RESERVA 2S: CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	10
FAMILIA DE PROTEÍNAS NO DE RESERVA	11
PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO	12
GENERALIDADES	12
Albúminas	13
Globulinas	14
Globulina tipo 7S	14
Globulina tipo 11S	15
Globulina-P (Gp)	17
Glutelinas	19
Prolaminas	20
LEGUMINOSAS	20
SÍNTESIS, TRANSPORTE Y ENSAMBLADO DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA	21
CEREALES	22
SÍNTESIS Y TRANSPORTE DE PROLAMINAS EN TRIGO	22
CLASIFICACIÓN DE VACUOLAS	24
CUERPOS PROTEICOS EN DIFERENTES ESPECIES	26
CUERPOS PROTEICOS EN CEREALES	26
CUERPOS PROTEICOS DE MAÍZ Y ARROZ	26
CUERPOS PROTEICOS EN PSEUDOCEREALES	27
<i>Cuerpos proteicos de Amaranto, Quínoa y Trigo sarraceno. Características estructurales</i>	27

GERMINACIÓN	28
ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA GERMINACIÓN.	28
REGULACIÓN HORMONAL Y GENÉTICA	29
CAMBIOS MORFOLÓGICOS QUE SE PRODUCEN EN LAS VACUOLAS DE RESERVA DURANTE LA GERMINACIÓN.	30
MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA.	31
FAMILIA DE PROTEASAS INTERVINIENTES DURANTE LA MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DURANTE LA GERMINACIÓN Y LA POST-GERMINACIÓN.	33
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
SEMILLAS Y HARINA	36
PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS A DIFERENTES ESTADIOS DE IMBIBICIÓN	36
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A DIFERENTES ESTADIOS DE IMBIBICIÓN	37
- Fracción albúminas	37
- Fracción globulinas	38
- Fracción globulina-P	38
- Fracción glutelinas	38
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HARINA DESGRASADA	38
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.	39
-Lowry	39
TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS REALIZADOS SOBRE LA GLOBULINA-P	39
OBTENCIÓN DE CUERPOS PROTEICOS	40
EXTRACCIÓN DE FRACCIONES DE RESERVA A PARTIR DE CUERPOS PROTEICOS	40
ELECTROFORESIS	41
<i>Reactivos generales</i>	41
<i>Preparación de muestras</i>	41
<i>Desarrollo</i>	41
SDS-PAGE	42
SDS-PAGE +2ME	42
PAGE-nativo	42
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES (PAGE NATIVO/ SDS-PAGE)	42
Coloración	42
ZIMOGRAMAS	43

<i>Preparación de muestras</i>	43
<i>Desarrollo</i>	43
<i>Preparación de geles</i>	43
<i>Revelado y tinción de los geles</i>	44
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	45
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR A PRESIONES MODERADAS	45
<i>Preparación de muestras</i>	45
<i>Desarrollo</i>	46
<i>Calibración</i>	46
CROMATOGRAFÍA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EN MEDIO LÍQUIDO (FPLC)	46
<i>Desarrollo</i>	47
<i>Calibración</i>	47
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	48
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO	48
<i>Preparación de muestras</i>	48
<i>Desarrollo</i>	48
ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS	48
PRODUCCIÓN DE SUERO ANTI- GLOBULINA-P DE AMARANTO	48
ENSAYO DE INMUNOREACTIVIDAD POR ELISA	49
<i>Sensibilización de las microplacas</i>	49
<i>Desarrollo</i>	49
ELISA DE COMPETICIÓN	50
<i>Sensibilización de las microplacas</i>	50
<i>Desarrollo</i>	50
ANÁLISIS DE REACTIVIDAD POR WESTERNBLOT	51
Electrotransferencia	51
Revelado con cloronaftol	51
Revelado por quimioluminiscencia	52
MICROSCOPIAS	53
MICROSCOPIA ÓPTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO	53
MICROSCOPIA ÓPTICA DE PREPARACIONES DE CUERPOS PROTEICOS	53
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE SEMILLAS	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS Y PROGRAMAS UTILIZADOS	54

CAPÍTULO 1

<i>Ubicación y relación estructural entre las proteínas de amaranto</i>	55
ESTUDIOS INMUNOQUÍMICOS DE PROTEÍNAS DE AMARANTO	55
Homología con proteínas de reserva	56
Grado de homología con proteína de reserva de otras especies	56
Ensayos de hidrólisis enzimática de la globulina-p	63
Caracterización estructural de la fracción albúminas	65
ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA PRESENTES EN LOS CUERPOS PROTEICOS	75
UBICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS EN LA CÉLULA VEGETAL	75

CAPÍTULO 2

<i>Movilización de las proteínas durante la germinación</i>	88
ETAPAS DE LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE AMARANTO	88
CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS	90
<i>Fracciones proteicas</i>	90
PROTEÍNAS INTERNAS Y EXTERNAS A LOS CUERPOS PROTEICOS	105
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS INVOLUCRADAS EN LA MOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN	109
CONCLUSIONES GENERALES	118
PERSPECTIVAS FUTURAS	120
BIBLIOGRAFÍA	121

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DEL GRANO DE AMARANTO. BREVE RESEÑA HISTÓRICA.

El amaranto se cultiva en América desde hace más de 10 mil años. El primer pueblo en utilizarlo habría sido el maya, quien lo llamaba huatli o kiwicha, para luego difundirse entre otros pueblos como los aztecas y los incas. Se estima que cuando los españoles llegaron a América, los aztecas producían 20 mil toneladas anuales de este grano. Los granos y las hojas de amaranto eran consumidos como alimento, mientras que la harina era utilizada para la fabricación de estatuillas de deidades llamadas tzoalli. Los indígenas utilizaban las mismas para comulgar en ceremonias religiosas, razón por la cual, con la llegada de los europeos a América, el consumo de amaranto fue prohibido. A partir de entonces se inició un intenso intercambio de cultivos en los que algunos cobraron mayor importancia y otros desaparecieron. La sustitución de los cultivos nativos por los del Viejo Mundo redujo drásticamente la producción de amaranto. Solo algunos agricultores continuaron cultivándolo en pequeña escala para consumo propio, por lo que se mantuvo a lo largo de los siglos hasta la actualidad, gracias al arraigo de las tradiciones en los pueblos nativos.

Actualmente, la forma más común de consumir el amaranto en México es el popular dulce "alegría" cuya preparación, curiosamente, deriva del antiguo tzoalli con la diferencia de que en lugar de harina de amaranto se utilizan las semillas reventadas como rosetas de maíz.

CARACTERÍSTICAS Y UTILIZACIÓN DEL AMARANTO.

El amaranto es una planta de crecimiento rápido, con hojas anchas, tallos y flores moradas, rojas o doradas. En griego su nombre significa "inmortal, que no se marchita" debido a que, a diferencia de otros cereales, cuando se cosechan sus semillas la planta no muere. La semilla de amaranto es muy pequeña entre 1 y 2 mm de diámetro, de forma lenticular y se encuentra en inflorescencias. Sus granos son levemente mayores a las semillas de amapola y aparecen en grandes racimos y de colores variados entre crema y negro.

Existen unas 80 especies diferentes de amaranto, pero sólo tres de ellas son cultivadas: *A. hypochondriacus*, originario de México, *A. cruentus*, oriundo de Guatemala y el sureste de México y *A. caudatus*, procedente de América del Sur.

Todas las especies pueden destinarse a usos múltiples, algunas son consideradas graníferas, hortícolas, tintóreas, medicinales, ornamentales y otras, malezas, como el *Amarantus*

quietensis o “yuyo colorado”, el que constituye una plaga muy común en la región pampeana de nuestro país.

Las plantas que se consumen por su grano así como las utilizadas como ornamento o colorante, son especies de mayor porte, con grandes inflorescencias y abundante producción de semillas. Las que son utilizadas para el consumo de sus hojas (*A. tricolor* L., *A. viridis* L., *A. bitum*, L.) presentan características similares a la espinaca y su follaje es particularmente rico en carotenoides, proteínas, hierro y calcio además de poseer cantidades importantes de vitamina C (Prakash y col., 1995). Las plantas que son consideradas malezas son de menor tamaño, con flores y frutos más pequeños y de color oscuro.

Taxonómicamente, el amaranto pertenece a la división Angiospermae, familia Centrospermae, clase Dicotyledonae, género *Amaranthus*. Es una planta del tipo C₄, presenta alta capacidad de biosíntesis y baja velocidad de fotorespiración causas de su rápido crecimiento y alto rendimiento (Kigel, 1994). Es muy resistente a plagas y prospera en condiciones agroecológicas muy adversas tales como sequía, altas y bajas temperaturas y suelos salinos (Bressani, 1994; Saunders y Becker, 1984).

Como consecuencia de su gran plasticidad distintos tipos de amarantos pudieron adaptarse a diferentes localidades, por lo que generalmente se hace mención a razas y no a variedades. Las razas más importantes son las: Africana, Nepal, Picos, Sudamericana, Edulis, y las razas mexicanas: Mexicana, Guatemalteca, Azteca, Mercado y Mixteca.

En las últimas décadas el cultivo de amaranto se ha difundido de manera exponencial en varios países, particularmente en los del Lejano Oriente debido a las características propias de este cultivo (Joshi y col., 2002). A diferencia de este hecho, en nuestro país el cultivo de amaranto se da en pequeña escala, con un área potencial de cultivo que comprendería a las provincias de Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, el este de La Pampa y el oeste de Buenos Aires. En la actualidad la Estación Experimental Agropecuaria Anguil de INTA, La Pampa, es uno de los centros donde se cultiva amaranto con la finalidad de realizar una siembra extensiva. Los integrantes de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil se encargan además de la publicación de un boletín denominado “Amarantos”, tarea que fuera impulsada por Prof. Guillermo Covas, responsable de la inclusión de este cultivo en el Código Alimentario Argentino. ([www.inta.gov.ar/anguil/ins/historia/guillermo covas](http://www.inta.gov.ar/anguil/ins/historia/guillermo_covas))

LAS SEMILLAS DE AMARANTO.

El amaranto es considerado como un pseudocereal, debido a que presenta características similares a la de los cereales verdaderos (gran producción de semillas por espiga). Al igual que éstos, contiene cantidades importantes de almidón, con la diferencia que este componente se encuentra almacenado en el perisperma.

La semilla de amaranto al igual que la de quinoa, presenta un embrión tipo campilótropo, es decir que se dispone de forma periférica a la sustancia de reserva o perisperma tal como se pone de manifiesto en la **Figura 1**.

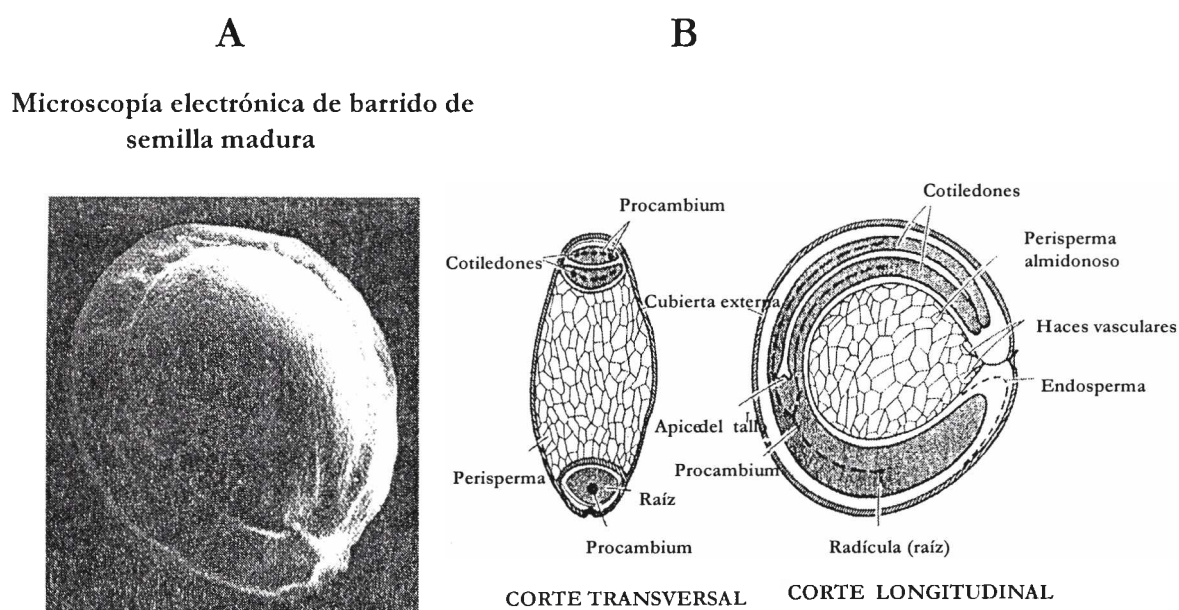


Figura 1 A: Microscopía electrónica de barrido de una semilla de amaranto sin germinar. **B:** Corte longitudinal y transversal de la semilla de Amaranto.

El embrión se encuentra conformado por la radícula y los cotiledones ocupando el 30% del grano, es en este órgano donde reserva una importante proporción de proteínas y lípidos.

En las semillas maduras, el endosperma consiste en un par de capas de células que se encuentran remitidas a la región de la radícula. Al igual que en el caso de la quinoa, el amaranto presenta una marcada compartimentación de sus sustancias de reserva. Los carbohidratos se alojan fundamentalmente en el perisperma, mientras que las proteínas, los minerales y los lípidos de reserva se encuentran localizados fundamentalmente en el endosperma y en el embrión (Prego y col., 1998).

Dada su relevancia en la dieta del hombre las proteínas constituyen uno de los nutrientes más importantes de las semillas. En el amaranto el contenido de proteínas ronda el 15-17% del peso del grano, sin embargo, su importancia no radica sólo en la cantidad sino también en su calidad. Como consecuencia del tamaño reducido de esta semilla, la molienda es difícil y la harina que se obtiene es integral. Tanto el mayor contenido proteico como la mejor calidad de las proteínas de amaranto respecto a las de los cereales se han relacionado con la diferente distribución de las proteínas de reserva dentro de la semilla, ya que en el amaranto el 65% de las proteínas se encuentra en el embrión mientras que en los cereales el 82% está presente en el endosperma (Betschart y col., 1981).

La composición porcentual de las semillas de amaranto, para varias especies, se puede observar en la **Tabla 1** extraída de Bressani (1994), y coincide con determinaciones de otros autores (Singhal y Kulkarni, 1988; Bertoni y col., 1984)

Tabla 1: Composición química de las semillas de diferentes especies de amaranto (g/100 g)

NUTRIENTE	<i>A. crispus</i>	<i>A. Hypochondriacus.</i>	<i>A. caudatus</i>
HUMEDAD	9,7	10,4	10,7
PROTEÍNA ^a	17,0	15,6	14,9
LÍPIDOS ^a	8,1	7,8	9,1
CENIZAS ^a	3,5	3,5	2,9
FIBRA CRUDA ^a	3,4	3,1	2,8
CARBOHIDRATOS ^a	67,9	70,0	70,3

^a porcentaje en base seca.

Según la Organización Mundial de la Salud, el grano de amaranto presenta un buen balance de aminoácidos, con un contenido importante de lisina, triptofano y de aminoácidos azufrados (principalmente metionina), esenciales en la alimentación humana y que comúnmente son limitantes en otros cereales (Gorinstein y col., 2001).

La composición aminoacídica de las proteínas presentes en las semillas de diversas especies de amaranto ha sido ampliamente estudiada. Los resultados obtenidos mostraron que la leucina es el primer aminoácido limitante, mientras que valina, isoleucina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO/WHO, 1973).

Gorinstein y col. (2001) han realizado una comparación entre la composición aminoacídica de las proteínas de amaranto con las de soja concluyendo que el amaranto contiene un 38% de aminoácidos esenciales y la soja un 17%.

El componente principal en la semilla del amaranto es el almidón, representa entre 50 y 60% de su peso seco. Las reducidas dimensiones del gránulo de almidón aumentan el grado de digestibilidad, la cual es 2,4 a 5 veces más rápida que la del almidón de maíz. A su vez, este tamaño le confiere propiedades aglutinantes y espesantes inusuales, pudiéndose utilizar en alimentos variados, como sustituto de las grasas y también en la industria cosmética.

Con respecto al contenido de cenizas, los principales minerales que las componen son fósforo, potasio, calcio y magnesio. El contenido de carbohidratos (almidón) está representado, principalmente, por la amilopectina mientras que el contenido en amilosa puede variar entre 4,8 y 7,2% (Saunders y Becker, 1984).

Si bien la proporción lipídica de los granos no es muy elevada (alrededor de 8 % según la especie) es mayor que la de los cereales (Becker, 1994); en la composición de los mismos predominan los ácidos grasos insaturados, principalmente oleico, entre 20 y 29% dependiendo de la especie, y linoleico, entre 45 y 58% dependiendo de la especie (Prakash y col., 1991, 1995; Ayoride y col., 1989; Bressani y col., 1987). Existen algunas especies, como *A. pumilus*, con niveles relativamente elevados de escualeno (1,32%). Las semillas de dicha especie, servirían como una fuente alternativa para la obtención de este lípido, disminuyendo la dependencia actual con los animales marinos (Marcone, 2000; Han-Ping He y col., 2003).

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA

El primer estudio detallado de las proteínas de reserva fue realizado por Osborne (1924) quien las clasificó en distintos grupos de acuerdo a su solubilidad en diferentes medios a lo largo de una extracción secuencial.

Los grupos proteicos extraídos en cada etapa fueron los siguientes: *albúminas*, solubles en agua; *globulinas*, solubles en soluciones salinas neutras diluidas, *prolaminas*, solubles en alcohol o en mezclas de alcohol-agua y las *glutelinas*, solubles en soluciones alcalinas o ácidas. Esta clasificación primaria, fue sustituida con el paso del tiempo y la adquisición de conocimientos estructurales y genéticos por otras. Una clasificación más actual se fundamenta en la estructura de los genes, la homología de las secuencias de aminoácidos y su mecanismo de acumulación en los cuerpos proteicos (Fukushima, 1991). En base a estos criterios las proteínas

de reserva fueron clasificadas en dos tipos, las *globulinas* y las *prolaminas*. Las globulinas se caracterizan por acumularse en cuerpos proteicos o vacuolas derivadas del aparato de Golgi, con una organización genética, con varios intrones y sin regiones repetitivas en la estructura primaria de la proteína. Las prolaminas, también se depositan en el interior de los cuerpos proteicos, llamativamente sus genes carecen de intrones y presentan secuencias de aminoácidos repetitivas en determinadas zonas de la molécula.

SUPERFAMILIA DE GLOBULINAS DE RESERVA.

Generalidades.

La información recopilada en los últimos años a través de las secuencias aminoacídicas de globulinas, han permitido inferir que estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en Dicotiledóneas, Monocotiledóneas y Gimnospermas. Debido a la homología mostrada en las secuencias se supone que esta familia de genes evolucionó de un ancestro común anterior a la división entre las Angiospermas y Gimnospermas (Nielsen y col., 1997). Este ancestro común, sería una proteína del tipo de las germinas, proteínas involucradas en la deshidratación /rehidratación que se produce en los primeros estadios de la germinación, que presentan grandes similitudes estructurales con las vicilinas y leguminas (Shewry y col., 1999; Shutov, 2003).

En las semillas de Leguminosas las proteínas de almacenamiento se acumulan principalmente en el embrión. Las dos familias de proteínas más comunes en estas Dicotiledóneas están formadas por globulinas oligoméricas, con un coeficiente de sedimentación de 7-8S y 11-12S. Ambas familias presentan diferencias en sus estructuras, que son el resultado del procesamiento post-traduccional de las mismas. Estas proteínas contienen una alta proporción de aminoácidos con residuos que presentan grupos de carga neutra (grupos amida) y una baja proporción de aminoácidos azufrados.

Globulinas (11S): características estructurales.

Las globulinas 11S o leguminas son las proteínas de reserva mayoritarias no sólo de las Leguminosas sino también de algunos cereales como la avena y el arroz. Son proteínas oligoméricas solubles en soluciones salinas (en general de fuerza iónica 0,5) que presentan masas moleculares aparentes entre 300 y 360 kDa (Marcone y col., 1998a).

Cada molécula está constituida por seis subunidades denominadas subunidades intermedias y cada subunidad intermedia por dos polipéptidos unidos por un único puente

disulfuro que se ha conservado a lo largo de la evolución. En las semillas en desarrollo, cada una de las subunidades que conforman la globulina 11S es sintetizada como un precursor o proglobulina. Estos propolipéptidos se ensamblan de a tres en el interior del retículo endoplásmico formando una proproteína trimérica con un coeficiente de sedimentación de 8S. Los trímeros se transportan a través del retículo endoplásmico hasta las vacuolas de reserva, en donde serán procesados enzimáticamente para formar los polipéptidos ácidos y básicos (Müntz, 1996). El polipéptido más grande posee una masa molecular entre 32 y 40 kDa y punto isoeléctrico (pI) ácido, mientras que la masa molecular del más pequeño, oscila entre 20 y 27 kDa y su pI es básico.

En la glicinina de soja se han identificado 5 subunidades mayores: A1aB1b, A2B1a, A1bB2, A3B4 y A5A4B3 (Utsumi y col., 1997), que pueden ser divididas en 2 grupos de acuerdo a la homología en la secuencia de aminoácidos. La composición de las subunidades en la glicinina varía de acuerdo a los diferentes cultivares. El grupo o subfamilia 1 (A1aB1b, A2B1a, A1bB2) comprende a polipéptidos de menor tamaño con mayor cantidad de aminoácidos azufrados que los del grupo 2 (A3B4 y A5A4B3) (Zhang y col., 2002). La variación del tamaño entre las subfamilias se debe a modificaciones en la región C-terminal de las cadenas ácidas, conocida como región hipervariable. Esta región contiene elevadas concentraciones de aminoácidos cargados y se encuentra próxima al sitio de clivaje post-traducciona l en la subunidad precursora (proglobulina) por lo que se encontraría en la superficie de la molécula. Como expresan Nielsen y col. (1997), el gran número de modificaciones observadas en la región hipervariable la hace una zona atractiva para introducir mutaciones e incrementar el contenido de aminoácidos azufrados.

Experimentalmente, se ha determinado la estructura cristalográfica de un homohexámero de la glicinina de soja (A3B4). A pesar de conocerse en forma teórica las posibles formas de ensamblado de los trímeros, el modo real en el que se realiza aún se desconoce. Una de las posibles causas de esto es que resulta bastante difícil de obtener los cristales adecuados de globulina 11S, debido a su alto grado de heterogeneidad. Adachi y col. (2003)

De acuerdo a lo informado por Adachi y col. (2003), la distribución de los residuos hidrofóbicos sobre la superficie del homotrímero, la posición de los sitios conservados de procesamiento enzimático y la estructura tridimensional serían factores determinantes para la formación del hexámero.

Vicilinas (7S): características estructurales.

Las masas moleculares aparentes de estas proteínas varían entre 140 y 210 kDa (Casey y col., 1986), al carecer de residuos de cisteína no pueden formar uniones disulfuro. Esta diversidad de tamaños es reflejo de la heterogeneidad de las subunidades que constituyen el oligómero, más precisamente el trímero, ya que las mismas se pueden dividir en dos grupos: un grupo cuyas subunidades presentan masas moleculares entre 45 y 55 kDa y otro con masas moleculares entre 70 y 80 kDa. Si bien son parcialmente homólogas, las de mayor tamaño presentan un inserto cerca del extremo N-terminal (Coates y col., 1985).

En algunas especies, ciertas subunidades pueden ser parcialmente clivadas por proteasas y glicosiladas en diferente grado durante su maduración, lo que aumenta la heterogeneidad de la proteína madura. Dada la coexistencia de subunidades 7S modificadas con otras que no han sido alteradas, queda planteado un interrogante acerca de la verdadera importancia de las modificaciones proteolíticas sobre el mantenimiento de la estructura oligomérica. La relativa variabilidad de los sitios de corte indicaría que son consecuencia de mutaciones no letales que producen subunidades susceptibles al ataque de endopeptidasas presentes en los cuerpos proteicos, aunque esto no está resuelto definitivamente (Nielsen y col., 1997).

Al igual que las proteínas 11S, los resultados obtenidos para la proteína 7S de soja (Thanh y Shibasaki, 1978a y 1976) y para la 7S de *P. sativum* indicaron que las subunidades se asociarían al azar durante la formación de los oligómeros. Thanh y Shibasaki (1978b) demostraron que los trímeros de β -conglucina de soja se pueden disociar a monómeros, y en ciertas condiciones, reasociarse a trímeros o hexámeros. En este mismo sentido se ha informado la formación de oligómeros 18S en proteína 7S de *P. vulgaris*, lo cual podría estar relacionado con la formación de macroestructuras en los cuerpos proteicos (Nielsen y col., 1997).

SUPERFAMILIA DE LAS PROLAMINAS DE RESERVA

Se trata de uno de los grupos de proteínas vegetales más extenso, esta superfamilia comprende a las proteínas de reserva de los cereales (prolaminas) solubles en soluciones alcohólicas y a un grupo de proteínas ubicadas en semillas ricas en aminoácidos azufrados y de baja masa molecular (Shewry y col., 2002). Algunas ejemplos de este último grupo incluyen a: proteínas alergénicas como proteínas no específicas de transporte de lípidos (nsLPT), inhibidores

de semilla como α -amilasa y tripsina y a las puroindolinas, proteínas responsables de otorgarle suavidad al grano de algunos cereales. La superfamilia de las prolaminas incluye a las proteínas de todos los cereales pertenecientes a la tribu Triticeae: cebada, centeno y trigo, a la Panicoideae: maíz, sorgo y mijo y también se encuentra presente en la avena y el arroz (Shewry y col., 2002b). La mayor parte de las prolaminas comparten dos características estructurales comunes: a) la presencia de diferentes regiones o dominios los cuales les permiten adoptar diferentes estructuras y b) la presencia de repeticiones de secuencias de aminoácidos en forma de motivos o bloques de pequeña longitud enriquecidos en aminoácidos específicos como la metionina (Shewry y col., 2002b).

En el caso particular de las proteínas pertenecientes a la tribu Triticeae, se trata de mezclas de proteínas altamente polimórficas con componentes cuyos pesos moleculares aproximados oscilan entre los 30 y 90 kDa.

Generalmente, las prolaminas son clasificadas en tres grupos de acuerdo con Mifflin y col., (1983): las ricas en azufre, las pobres en azufre y las de alto peso molecular.

Proteínas ricas en azufre: son las proteínas más abundantes, constituyendo el 80-90% del total de las fracciones proteicas con masas moleculares que oscilan entre los 30-45 kDa. Comprenden a componentes poliméricos, con puentes disulfuro intercatenarios e intracatenarios, donde cada una de estas especies proteicas incluye a dos familias de proteínas para cada especie: la cebada incluye a las β y γ -hordeínas; a ambos tipos de las γ -secalinas del centeno y en el trigo a las α -, γ -gliadinas y a las subunidades de las gluteninas de bajo peso molecular (LMW).

La composición aminoacídica de esta fracción, está conformada por dos dominios separados: uno N-terminal compuesto de secuencias repetidas y un dominio C-terminal de secuencias no repetitivas (denominadas regiones A, B y C similares en secuencia a otras proteínas ricas en azufre). El dominio repetitivo contiene repeticiones basados en uno o dos motivos peptídicos cortos ricos en prolina y glutamina, estas repeticiones se encuentran en gran proporción.

Proteínas pobres en azufre: carecen de residuos de cisteína y por lo tanto son incapaces de formar oligómeros. En todos los casos, las proteínas codificadas contienen casi en forma exclusiva repeticiones de un motivo octapeptídico que es flanqueado en su región N-terminal por secuencias cortas únicas de 12 residuos y en el extremo C-terminal por una secuencia de 6 residuos. Sus masas moleculares oscilan entre 30 y 75 kDa y se encuentran en un porcentaje del 10-20%. Se las puede encontrar formando polímeros en las proteínas tipo D de las subunidades

de las proteínas de baja masa molecular (LMW) de las gluteninas, y en forma monomérica en las ω -gliadinas.

Proteínas de alto peso molecular: Conforman mayoritariamente a las subunidades de alto peso molecular (HMW) de las gluteninas de trigo, las cuales han sido estudiadas en detalle ya que son las responsables de otorgarle elasticidad y capacidad de panificación a las masas hechas a base de proteínas de este cereal. Se las encuentra formando estructuras poliméricas y conforman el 6-10% de las proteínas totales con masas moleculares entre los 65 y 90 kDa.

PROTEÍNAS DE RESERVA 2S: CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.

Las semillas de muchas plantas contienen albúminas o globulinas con coeficientes de sedimentación de alrededor de 2S. Son solubles en agua y al menos algunas de ellas están relacionadas estructuralmente con las prolaminas. Estas proteínas presentan una alta tasa de polimorfismo, por lo que en diferentes especies pueden adoptar diferentes estructuras al igual que desempeñar distintas funciones.

Se encuentran presentes en las semillas de Crucíferas, en *Arabidopsis*, en ciertas Leguminosas como el lupino (*Lupinus angustifolius*) y en arveja, en la nuez de Brasil, girasol (perteneciente a la familia Compositae), algodón, zapallo y algunos pseudocereales como el trigo sarraceno, quinoa y amaranto (Shewry y col., 1999a). En este último constituyen un grupo de polipéptidos que incluye a las proteínas ricas en metionina (MRP) con masas moleculares entre los 4 y 20 kDa (Segura-Nieto y col. 1992 y 1994). Las albúminas 2S contienen 3 regiones conservadas relacionadas con las regiones A, B y C de las prolaminas. Estas regiones contienen 8 residuos conservados de cisteína que se encuentran presentes en la mayor parte de las albúminas 2S.

La ausencia de secuencias repetitivas y su amplia distribución en las Dicotiledóneas, sugerirían que estas proteínas podrían presentar cierto grado de homología con la superfamilia de las prolaminas de reserva (Shewry y col., 1995). Estas proteínas, se encuentran constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro intracatenarios (Ericson y col., 1986; Shewry y col., 1995). Se sintetizan como un único precursor proteico, el cual se cliva proteolíticamente con la pérdida posterior del péptido de unión, junto con un péptido señal (Crouch y col., 1983; Shewry y col., 1999a). Estas proteínas son posteriormente almacenadas en el interior de las vacuolas de reserva. En arveja, los puentes disulfuro intracatenarios se

encuentran ausentes (Higgins y col., 1986) y en girasol no se produce el clivado de las subunidades. (Anisimova y col., 1994; Shewry y col., 1995). A pesar de las diferencias estructurales descritas con anterioridad, las albúminas 2S son proteínas globulares compactas con residuos de cisteína conservados. Si bien es poco lo que se sabe de su estructura tridimensional, Menéndez-Arias y col. (1987) y Shewry y col. (1999a) mostraron que estas proteínas presentan aproximadamente un 50% de hélice α y baja proporción de hoja plegada β . El estudio de su estructura tridimensional ha despertado gran interés por su posible utilización en ingeniería genética. Altenbach y col. (1992), han utilizado a la albúmina 2S de la nuez de Brasil, con un alto contenido de metionina, para incrementar el contenido de este aminoácido en semillas de tabaco. Higgins y col. (1986) han utilizado a la albúmina del girasol para incrementar el contenido de metionina en ciertas pasturas (Tabe y col., 1993). Por otra parte, las albúminas 2S de *Arabidopsis* han sido utilizadas como huéspedes en la síntesis de polipéptidos biológicamente activos, aunque también se ha informado acerca del alto grado de alergenicidad que desencadenan estas proteínas (Pastorello y col. 2001).

FAMILIAS DE PROTEÍNAS NO DE RESERVA

Además de las superfamilias de proteínas de reserva anteriormente mencionadas existen otros componentes proteicos que no cumplen funciones de reserva pero que intervienen a lo largo del ciclo de vida de la planta incluso durante la germinación y post-germinación. Algunas de estas proteínas pertenecen a la familia de las albúminas 2S (superfamilia de las prolaminas) con actividad biológica como pueden ser los inhibidores de proteasas y las antifúngicas (también denominadas defensinas).

Las proteínas LEA (late embryogenesis abundant), las lipooxigenasas, las tioninas y las lectinas, que no se encuentran incluidas en la clasificación anterior, abarcan un amplio espectro de funciones que se llevan a cabo durante el ciclo de vida de las plantas. (Shewry y col., 1999 b; Carbonero y col., 1999; Domoney y col., 1999; Peumans y col., 1999; Casey 1999; García-Olmedo 1999 y Cuming 1999).

PROTEÍNAS DE RESERVA DEL AMARANTO.**GENERALIDADES**

Las proteínas de almacenamiento mayoritarias del grano de amaranto han sido ampliamente estudiadas. Distintos grupos de trabajo han optimizado diferentes metodologías para aislar las proteínas de amaranto. Dada las diferencias en las condiciones de extracción empleadas, en algunos casos resulta difícil la comparación de resultados. Como fuera mencionado con anterioridad, las fracciones más abundantes son las albúminas, proteínas solubles en agua, (Tabla 2), las globulinas y las glutelinas. Todos los estudios realizados coinciden en señalar que las prolaminas son las proteínas minoritarias de este pseudocereal (entre 1,5 y 11%).

Tabla 2: Cantidad relativa de las diferentes fracciones proteicas de la semilla de amaranto.

FRACCIÓN PROTEICA	PROPORCIÓN ^a	REFERENCIA ^b
ALBÚMINAS	50 - 65	(1), (2)
	10 - 20, 26	(3), (4) (5)
GLOBULINAS	13 - 20	(1), (2), (3), (4)
	56	(5)
GLUTELINAS	7 - 8,5	(1), (2)
	42 - 56	(3), (4)
	18	(5)
PROLAMINAS	7,2 - 11	(1), (2)
	1,5 - 2,1	(3), (4)

^a proporción como % respecto al total de proteína. ^b (1) Abdi y Sahib, 1976; (2) Duarte-Correa y col., 1986; (3) Bressani y García-Vela, 1990; (4) Marcone, 2000; (5), datos de nuestro laboratorio.

En aquellos casos en los que se ha observado un alto porcentaje de albúminas, el de glutelinas es menor y viceversa. Konishi y col. (1992) han asignado esta variabilidad a una fracción proteica muy singular con características de solubilidad única, que han denominado albúmina-2 y que según las diferentes formas de extracción se encontraría en una u otra fracción. Esta fracción será descrita más adelante como globulina-p.

Albúminas.

De acuerdo a la clasificación de Osborne con este nombre nos referimos a la fracción que tradicionalmente se extrae de la harina con agua. En base a los resultados obtenidos por Konishi y col. (1991), esta fracción se ubicaría por fuera de las vacuolas de reserva. Las inferencias realizadas por estos autores surgieron como consecuencia de analizar el comportamiento de ésta fracción al tratar la harina de amaranto con pronasa. Estos mismos autores estudiaron la solubilidad de estas proteínas en presencia de diferentes sales siendo en general elevada, mayor al 69%. Esta fracción se encuentra constituida por polipéptidos de variados tamaños la mayoría entre 10 y 43 kDa (Segura-Nieto y col., 1992), aunque también han sido detectados otros polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kDa (Martínez y col., 1996; Barba de la Rosa y col., 1992a; Konishi y col., 1991). En general, se destacan algunos polipéptidos con masas moleculares entre 12 y 35 kDa. La estabilidad térmica de esta fracción proteica es muy baja siendo su temperatura de desnaturalización de 64 °C (Martínez y Añón, 1996). Todas las descripciones de la fracción albúminas coinciden en señalar que sus polipéptidos componentes no se encuentran unidos por enlaces disulfuro.

En cuanto a la composición aminoacídica, ésta presentó elevada proporción de aminoácidos azufrados, glutamina-ácido glutámico y asparagina, siendo los aminoácidos que se encuentran en menor proporción leucina y treonina (Mora-Escobedo y col., 1990; Segura-Nieto y col., 1992). Por técnicas de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa se pudo encontrar que la fracción albúminas presenta un componente principal y otro minoritario que sedimentan a 1,4S-2S y 4,6S respectivamente. Los polipéptidos que constituyen el pico de 2S son de menor tamaño en tanto las proteínas que presentan un coeficiente de sedimentación de 4,6S tienen un peso molecular estimado de 60 kDa (Segura-Nieto y col., 1992). Mediante cromatofoco se ha podido determinar que existen dos poblaciones de especies proteicas distribuidas en un rango amplio de pI con valores entre 7-7,5 y 4,5-6,5 Konishi y col. (1991).

En contraposición a la descripción anterior, Marcone y col. (1994a) informaron que la fracción albúmina de *A. hypochondriacus* estaba constituida por polipéptidos monoméricos de un solo tamaño (12 kDa) los cuales interaccionaban de forma no covalente constituyendo un homooligómero de 133 kDa. Esta fracción presentó un pI de 7,5, elevados niveles de estructura en hoja plegada β y bajo contenido de estructura terciaria. Por otro lado, se han purificado y caracterizado distintos componentes proteicos de la fracción albúminas. Entre ellos se

encuentran un inhibidor de tripsina y un inhibidor de α -amilasas los cuales han sido purificados y secuenciados por Valdes-Rodriguez y col. (1993) y Lu y col. (1999) respectivamente. El inhibidor de tripsina es un polipéptido de 7,5 kDa y pI 7,5 con elevados contenidos de valina, arginina, ácido glutámico y carente de metionina. En cuanto a las características estructurales del inhibidor de α -amilasas el mismo se encuentra conformado por tres hebras β unidas mediante puentes disulfuro siendo esta estructura el común denominador para esta clase de inhibidores.

Tal como se mencionara anteriormente, entre las albúminas 2S se ha caracterizado una subclase denominada proteínas ricas en metionina (MRP) de peso molecular aproximado a los 18 kDa, cuya función biológica se desconoce. Es importante destacar que Ramírez-Medeles y col. (2003), realizaron la secuenciación y la caracterización bioquímica de una proteína perteneciente a esta misma familia, la cual presentaba un peso molecular aproximado de 9 kDa y estaría relacionada con proteínas no específicas del transporte de lípidos (nsLTP).

Chakraborty y col. (2000), clonaron un gen (AmA1) que codificaría una proteína de 35 kDa específica de las albúminas de amaranto. La mencionada proteína fue introducida y expresada en forma constitutiva en papas con la finalidad de mejorar el aporte nutricional de dichos tubérculos.

Por otra parte la fracción albúminas ha sido utilizada para el mejoramiento de propiedades funcionales y reológicas de productos panificados (Silva-Sánchez y col., 2004)

Globulinas.

Esta fracción proteica se extrae del residuo de harina resultante de la extracción de las albúminas con soluciones de pH cercano a la neutralidad y concentraciones salinas elevadas (en general fuerza iónica entre 0,4 y 1,1). Al igual que en las Leguminosas, en el amaranto existen dos tipos de globulinas, las 7S (minoritarias) y las 11S (mayoritarias).

Globulina tipo 7S.

Los estudios realizados por Marcone y col. (1999a) sobre esta fracción la caracterizaron como un hetero-oligómero de 186 kDa, constituido por una variedad de subunidades, de diferentes tamaños entre 15-90 kDa unidas de un modo no covalente, sin la presencia de uniones disulfuro. Son pocos los polipéptidos que comparte con la fracción 11S, y por ende su comportamiento estructural es diferente. En su composición se detectaron polipéptidos

monoméricos de 70-74, 50-46, 37-35, 28-26, 23-21 y 15 kDa. Esta fracción también fue caracterizada por Martínez y col. (1997), y su coeficiente de sedimentación se estimó en 7S. Se determinó su composición polipeptídica la cual fue similar a la mencionada anteriormente excepto por la ausencia de polipéptidos en la zona de 50-46 kDa. El peso molecular de la proteína nativa fue estimado por cromatografía de exclusión molecular en 450 kDa, por lo que se propuso que en las condiciones empleadas la proteína se encuentra parcialmente dimerizada. Al ser analizada mediante calorimetría diferencial de barrido junto con la globulina 11S, se pudo constatar que la misma presentó una $T_d = 80,2$ °C valor muy similar al encontrado para la 7S de soja. Mediante dicroísmo circular Marcone y col. (1999a) determinaron que esta proteína poseía baja cantidad de hélice α (12,6%) y elevada proporción de hoja plegada β (50%). Su punto isoeléctrico se encontraba entre 5,2 y 5,8; a pHs más ácidos su densidad de carga aumenta notablemente y se disocia en sus subunidades, no ocurriendo lo mismo a pHs alcalinos.

Globulina tipo 11S.

Esta globulina es la mayoritaria en las semillas de amaranto. Konishi y col. (1985) determinaron que constituye el 81% de la fracción cruda de globulinas, valor equivalente al obtenido por Marcone y Yada (1998) al analizar seis líneas genéticas diferentes de *Amaranthus*.

Esta fracción proteica, está constituida por subunidades polipeptídicas de diferentes tamaños. En la **Tabla 3** se muestran los valores informados por diferentes laboratorios.

En condiciones no reductoras se ha determinado un mayor contenido de los polipéptidos del grupo **I**, los cuales están prácticamente ausentes en presencia de 2-ME por lo que se ha propuesto que, a semejanza de otras globulinas 11S, estos polipéptidos están formados por polipéptidos más pequeños (grupos **II**, **III** y **IV**) unidos por puentes disulfuro.

Marcone y Yada (1991) detectaron un polipéptido de 67 kDa principalmente asociado a moléculas polimerizadas, además determinaron que el polipéptido de 75,5 kDa, presente en condiciones no reductoras, estaba constituido por dos subunidades de 37,5 kDa. Por isoelectroenfoque, se pudo comprobar que los polipéptidos de los grupos **II** y **III** se comportan igual que los polipéptidos ácidos y básicos de soja (Segura-Nieto y col., 1994). En el estado nativo estos polipéptidos se encuentran interaccionando para formar un hetero-oligómero.

Se ha informado para esta fracción un amplio rango de valores de masa molecular, que va desde 166 kDa (Barba de la Rosa y col., 1992b) hasta 440 kDa (Konishi y col., 1985). Otros autores como Segura-Nieto y col. (1994) y Martínez y col. (1997) determinaron un valor de 302

y 280 kDa respectivamente. Asimismo, Chen y Paredes-López (1997) informaron la presencia de dos especies con masas moleculares de 330 y 400 kDa.

Tabla 3: Masas moleculares de los polipéptidos de la fracción globulinas.

<i>SDS-PAGE sin 2-ME</i>				<i>SDS-PAGE con 2-ME</i>				<i>Referencia</i>
GRUPOS				GRUPOS				
I	II	III		I	II	III	IV	
75,5	46,5	37,5-31	20-14	67	37,5-31	26,5-20	14,5	(1), (2)
58	52	38	23		33-32	24-23		(3)
	56-52	39,6			36-31	24-19		(4)

(1) Marcone y Yada (1991); (2) Marcone y Yada (1992); (3) Barba de la Rosa y col. (1992b); (4) Martínez y col. (1997)

Como lo informaran Marcone y Yada (1998) existe una cierta heterogeneidad de valores de masa molecular, este hecho lo comprobaron al analizar seis especies y líneas genéticas diferentes encontrando valores que van desde 237 a 381 kDa. De todas formas, excepto para uno de los laboratorios las masas estimadas se encuentran dentro del rango observado para las globulinas tipo 11S (Debyshire y col., 1976).

Al igual que para otras globulinas 11S, en la correspondiente a amaranto se han observado, en pequeña proporción, agregados de mayor masa molecular estabilizados por uniones disulfuro (Marcone y Yada, 1998 y 1991; Martínez y col., 1997). El coeficiente de sedimentación para esta fracción proteica presentó valores coincidentes entre 11 y 13S (Martínez y col., 1997; Marcone y Yada, 1992; Barba de la Rosa, 1992b; Konishi y col., 1985).

La composición aminoacídica de globulina 11S parcialmente purificada sólo fue determinada por Marcone y Yada (1998), al ser esta la globulina más abundante, su composición coincide en líneas generales con la de la fracción cruda. Los aminoácidos más abundantes son glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico. En comparación, las globulinas de avena y soja presentaron menores cantidades de aminoácidos azufrados y lisina (Segura-Nieto y col., 1994).

La estabilidad térmica de esta fracción proteica, evaluada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) es elevada alrededor de 95 °C (Marcone y col., 1998; Gorinstein y col., 1996 b

y Martínez y Añón, 1996). Si bien la misma es comparable con las de otras globulinas 11S, como soja o avena (Scilingo y Añón, 1997 y Harwalkar y Ma, 1987), la entalpía de desnaturalización (ΔH) encontrada es mucho menor, entre 4,25 y 8 J/g

Mediante dicroísmo circular, se determinó que la globulina 11S de amaranto presenta elevado porcentaje de estructura en α hélice (31,4%) y estructura desordenada (41,6%) siendo el resto, hoja plegada β (Gorinstein y col., 1996 b). Marcone y Yada (1998) presentaron datos contrapuestos a los anteriores, con un bajo porcentaje de α hélice ($\cong 7\%$), 18% de giros β y una proporción variable de hoja plegada β (entre 34 y 71%). Estos últimos autores señalaron que a pesar de las similitudes en la estructura secundaria encontradas por ellos para diferentes líneas de amaranto, su estructura terciaria muestra diferencias importantes.

Barba de la Rosa y col. (1996) purificaron globulina 11S mediante cromatografía de exclusión molecular, colectando proteína de 398 kDa. Esta fracción está constituida por polipéptidos de los grupos **II** y **III** (Tabla 3) y uno extra de 59 kDa. Este polipéptido, probablemente una proglobulina inmadura, que no habían descrito en esta fracción con anterioridad, pudo ser secuenciado en su extremo N-terminal y a partir de estos datos se clonó el gen codificante. La secuencia de aminoácidos deducida de este modo mostró alta homología con las de propolipéptidos de otras proteínas 11S. Esto sugiere que los polipéptidos de la globulina 11S de amaranto se sintetizan como un único precursor del mismo modo que en las otras globulinas 11S. Además presenta siete residuos de cisteína de los cuales dos, uno en la posición 112 y otro en la 295 (posición siete del polipéptido básico), formarían un enlace intercatenario. Esto se basa en la gran homología entre la secuencia alrededor de las cisteínas y las correspondientes a las cisteínas involucradas en el enlace disulfuro de otras globulinas de este tipo. En la secuencia del pro-polipéptido de amaranto se determinó un posible sitio de clivaje cuya ruptura genera dos polipéptidos uno de 35,4 kDa ($pI = 5,79$) y otro de 24,0 kDa ($pI = 9,22$).

El gen mencionado, fue posteriormente expresado en tabaco y en maíz (Osuna-Castro y col., 2000; Sinagawa-García y col., 2004; Valdez- Ortiz y col., 2005).

Globulina-p (Gp).

Como se mencionara previamente una característica singular de esta fracción es su forma de extracción de la harina. Konishi y col. (1991) solubilizaron globulina-p con agua luego de la extracción exhaustiva de albúminas y globulinas. Esta fracción, denominada albúmina-2, es

además soluble en soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores que 0,1 M. Su pI aparente se encuentra entre 5 y 6 y su composición aminoacídica, comparada con la de albúminas, presenta mayor proporción de prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina y menor de lisina, metionina, cisteína y valina. A diferencia de la fracción albúminas, descritas anteriormente, esta proteína contiene en condiciones reductoras, cinco polipéptidos de masas moleculares 56, 36, 31, 26 y 22 kDa, más semejante a la composición de globulinas (Konishi y col., 1991).

En nuestro laboratorio, se aisló una proteína con las características de extracción descritas por Konishi y col. (1991) para albúmina-2 pero que presentaba, en condiciones no reductoras, un perfil polipeptídico muy similar al de la globulina 11S (Martínez, 1997 y Martínez y col., 1997). Los polipéptidos de esta proteína, en su mayor parte unidos por enlaces disulfuro, presentaron en condiciones reductoras un perfil electroforético igual al de la albúmina-2 (Konishi y col., 1991).

Una característica particular de esta proteína fue su alto grado de polimerización con sólo aproximadamente un tercio de sus moléculas no agregadas.

Las mismas mostraron una masa molecular cercana a 300 kDa (Martínez, 1997 y Martínez y col., 1997) siendo ésta, otra característica semejante a la de la globulina 11S. Teniendo en cuenta estos aspectos moleculares y su presencia en cuerpos proteicos se sugirió la denominación de globulina polimerizada (globulina-p o Gp). Los polímeros de globulina-p se encuentran parcialmente estabilizados mediante enlaces disulfuro (Martínez, 1997).

La globulina-p parcialmente purificada presentó una elevada estabilidad térmica, con una $T_d = 99,7$ °C determinada por DSC. Esta fracción exhibió mayor estabilidad a pHs entre 6,0-8,0, sufriendo desnaturalización a pHs extremos siendo ésta más acentuada en la zona ácida (Castellani y col., 1998).

Mediante un método de extracción secuencial alternativo Chen y Paredes-López (1997) extrajeron con agua una fracción proteica que asignaron a la globulina 11S. Sin embargo, por sus propiedades fisicoquímicas y composición polipeptídica (Romero-Zepeda y Paredes-Lopez, 1996) la misma podría corresponderse con la globulina-p.

Preparaciones parcialmente purificadas de globulina-p han sido estudiadas mediante fluorescencia y dicroísmo circular (Gorinstein, 1996b y c). De acuerdo a lo informado esta proteína presenta, frente a otras globulinas, mayor número de triptofanos en su superficie y mayor hidrofobicidad superficial.

Glutelinas.

Como se mencionara previamente, existen discrepancias en cuanto al rendimiento de extracción de esta fracción abarcando un rango entre 7 y 56%. El buffer de extracción más empleado es borato pH 10 el cual se utiliza, en general, en combinación con SDS y/o un agente reductor (2-ME) dado que los rendimientos disminuyen bastante en ausencia de los mismos (Segura Nieto y col., 1994; Paredes-López y col., 1993). Otro solvente que suele ser utilizado para la extracción de esta fracción es el NaOH 0,1 N con el cual se obtiene un rendimiento mayor.

De sus aminoácidos constituyentes el más abundante es el ácido glutámico/glutamina, después del cual se encuentran en cantidad decreciente arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990). La glutelina es una de las fracciones de amaranto menos investigadas hasta el momento, principalmente se ha estudiado su composición polipeptídica en diversas condiciones (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995; Segura-Nieto y col., 1994, Martínez y col., 1997). La misma es similar a la globulina-p (Martínez y col., 1997, Abugoch y col., 2003); en medio desnaturante no reductor se han descrito polipéptidos presentes con masas moleculares entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa además de polipéptidos agregados.

En presencia de 2-ME se observaron subunidades de masas moleculares semejantes a las de globulinas, en general se detectó una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados (Gorinstein y col., 1998 y 1991; Barba de la Rosa y col., 1992a, Martínez y col., 1997). La disminución de los polipéptidos de alta masa molecular que no entran en el gel indicaron que los mismos eran oligómeros unidos por enlaces disulfuro.

Abugoch y col (2003) determinaron que cuando dicha fracción es extraída con NaOH, se encuentra desnaturada. En cambio, si es extraída con buffer borato, presenta cierto grado de plegamiento

Mediante estudios inmunológicos se ha determinado la existencia de homología entre las subunidades ácidas de globulinas y los polipéptidos de 32 y 60 kDa de glutelinas de amaranto. Además se determinó cierto grado de homología entre estos polipéptidos y los de globulina de avena y glutelina de arroz (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995).

Prolaminas.

Al igual que en avena y arroz esta fracción, que se extrae normalmente con propanol 70%, se encuentra en muy baja proporción en amaranto.

En lo referente a su composición aminoacídica la leucina y la treonina son los aminoácidos esenciales más abundantes, y a diferencia de las prolaminas más comunes, su contenido en prolina es bajo (Barba de la Rosa y col., 1992a).

En general se ha descrito a esta fracción como constituida por polipéptidos de baja masa molecular (entre 10 y 22 kDa), aunque existen algunas discrepancias acerca de los componentes mayoritarios, ya que Gorinstein y col. (1991 y 1996c) detectaron subunidades principalmente en la región de 10 a 14 kDa, mientras que Segura-Nieto y col. (1992b) las encuentran entre 16 y 22 kDa. Por otro lado Segura-Nieto y col. (1994), han mostrado que el perfil electroforético de prolaminas presenta cambios dependiendo del solvente usado para desgrasar la harina, pudiendo ser una de las causas de estas discrepancias.

LEGUMINOSAS

Como habíamos visto, la mayoría de los cereales de importancia económica pertenecen a la familia de las Monocotiledóneas como el trigo, la cebada, el centeno y el maíz, ellos poseen proteínas de reserva mayoritarias clasificadas como prolaminas. El arroz y la avena constituyen una excepción ya que a pesar de ser cereales contienen globulinas como proteínas de reserva mayoritarias. Por otro lado, en las Dicotiledóneas, entre las que se encuentran la soja, arveja, girasol, amaranto y quinoa, las proteínas de reserva son, mayoritariamente globulinas.

La acumulación de las diferentes proteínas de reserva se produce en el interior de los cuerpos proteicos, en órganos específicos de las semillas como el embrión y los cotiledones y en determinados momentos del desarrollo. Globulinas y prolaminas presentan diferentes mecanismos de síntesis, transporte y ensamblado los que se describirán a continuación.

SÍNTESIS, TRANSPORTE Y ENSAMBLADO DE GLOBULINAS 7S Y 11S.

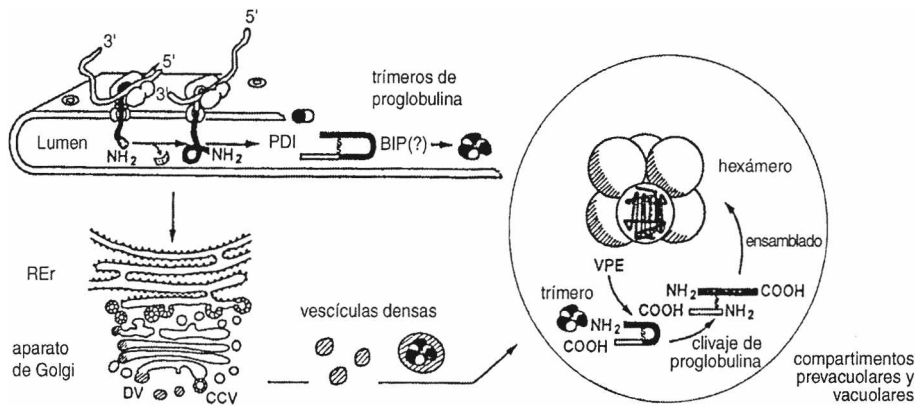


Figura 2 : Diagrama de síntesis, transporte y almacenamiento de leguminas. **REr**: retículo endoplásmico, **PDI**: proteína disulfuro isomerasa, **BIP**: posible intervención de una chaperonina (proteína de unión) en el plegamiento y ensamblado de los propolipéptidos. **VPE**: enzima de procesamiento vacuolar. En los compartimentos de almacenamiento se puede apreciar un esquema de proteína ensamblada con una estructura cuaternaria como la propuesta por Plietz (ver texto). Müntz, 1998

que se detallarán posteriormente.

Las globulinas de reserva son sintetizadas por ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico rugoso, (**REr**), como precursores polipeptídicos ó prepropolipéptidos. Contienen un péptido señal que determina su traslocación al interior del REr a medida que se sintetizan (ver esquema **Figura 2**). Este péptido señal es eliminado por acción de una serín proteasa durante la traslocación dando origen a las llamadas proglobulinas (Müntz 1998). Las proglobulinas sufren una oligomerización dentro del RE formando trímeros tanto para el caso de la globulina 7S como de la 11S, pudiendo o no ser su nivel de organización definitivo. Este proceso es asistido por proteínas denominadas chaperonas como la BiP (**binding protein**) y la disulfuro isomerasa (**PDI**). El transporte desde el RE al complejo de Golgi es mediado por vesículas cubiertas de proteínas denominadas COP II (Phillipson 2001 y Yang 2005). Estas vesículas se fusionan en la parte inicial del complejo de Golgi denominado *cis*-Golgi, liberando su carga, que es transportada a través de cisternas hasta el *trans*-Golgi. Durante este estadio, las globulinas 7S se glicosilan con un glicósido de alto contenido de manosa; mientras que las 11S no sufren este proceso. En algunas especies, algunas subunidades de la globulina 7S pueden ser parcialmente

En la **Figura 2**, se presenta la biosíntesis, maduración y ensamblado de las globulinas 11S. Las etapas concernientes a las globulinas 7S son similares, presentándose algunas diferencias que se señalarán oportunamente. Cada etapa comprende una serie de pasos específicos

clivadas por proteasas y glicosiladas en diferentes grados, la globulina 7S madura permanece como trímero. En el caso de las proglobulinas tipo 11S el procesamiento en este estadio consiste en el corte del propolipéptido dando origen a los polipéptidos α (ácido) y β (básico). La proteasa interviniente pertenece al grupo de las enzimas de procesamiento vacuolar o “vacuolar processing enzyme” (VPE) que se caracterizan por cortar en una secuencia Asn-Gly ubicada en la zona hipervariable de las proglobulinas 11S. Este procesamiento de proglobulinas 11S, está ampliamente distribuido, observándose tanto en coníferas, Monocotiledóneas y Dicotiledóneas (Nielsen y col., 1995). Este mismo procesamiento también fue observado en proteínas de almacenamiento tipo 2S (Hara-Nishimura y col., 1993). Los polipéptidos α y β producidos por la acción de esta endopeptidasa, se mantienen unidos mediante puentes disulfuro constituyendo la denominada “subunidad intermedia”. El corte produce un cambio conformacional muy importante en la estructura del trímero que provoca la formación de un hexámero a través de la interacción de dos trímeros. Las globulinas de reserva adquieren de esta manera una estructura compacta que las hace resistente a la acción de proteasas que co-existen con ellas en los compartimentos de reserva y que se activan cuando ocurre la germinación (Shutov 1996; Shutov y col., 2003)

Desde el Golgi, se desprenden diferentes tipos de vesículas que transportan las distintas clases de proteínas hacia su destino final. En el caso del transporte de proteínas de reserva el modelo más aceptado es el transporte en vesículas densas (VD) (Vitale y Hinz 2005; Robinson y col., 2005); aunque en zapallo se ha observado un transporte directo (sin pasar por el Golgi) en vesículas denominadas “precursor- accumulating vesicles” (PAC) (Hara-Nishimura y col., 1998).

CEREALES

SÍNTESIS Y TRANSPORTE DE PROLAMINAS EN TRIGO.

La ruta de acumulación de las prolaminas más estudiada es la de trigo (**Figura 3**). Durante la síntesis todos los precursores atraviesan el RE pero luego pueden ser transportadas utilizando dos vías alternativas (Levanony y col., 1992). Una fracción de las prolaminas, es transportada por una de las rutas que incluye el pasaje por el aparato de Golgi; y posterior formación de una vacuola de almacenamiento que contiene numerosos agregados de proteínas de reserva (Galili y Herman, 1997). Otras prolaminas se acumularían dentro del RE para constituir un cuerpo

proteico, éstos agregados son desprendidos del RE y, mediante un proceso análogo al de

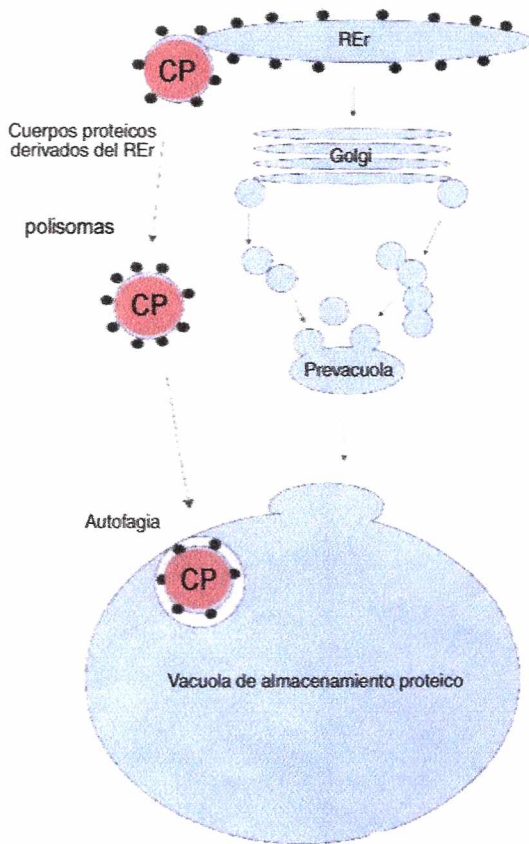
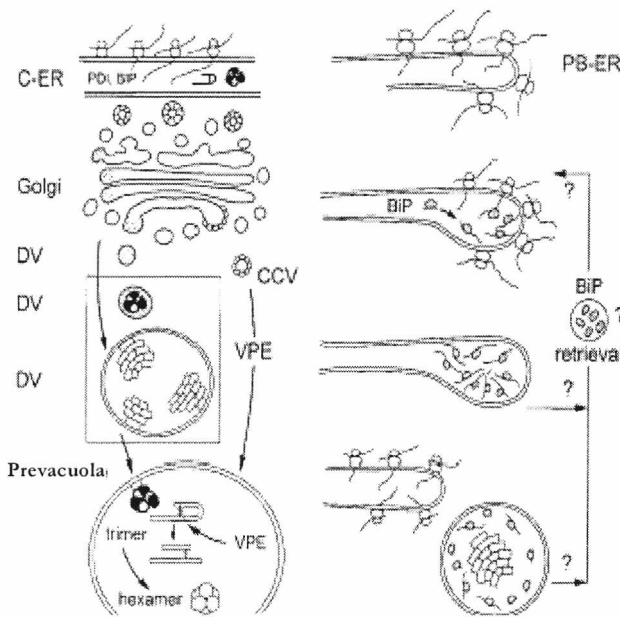


Figura 3 : Diagrama conceptual de la ontogenia de los cuerpos proteicos (CP) y las vacuolas de almacenamiento proteico. Estas dos rutas alternativas se han observado para las proteínas del trigo (ver texto).

autofagia; son internalizados dentro de vacuolas (figura, tomada de Herman y Larkins, 1999). Se han podido encontrar cuerpos proteicos dentro de las vacuolas rodeados de sus membranas originales (Galili y Herman, 1997).

Cabe señalar que las gliadinas ricas en azufre, al igual que las gluteninas, poseen residuos de cisteína que se encuentran en ubicaciones altamente conservadas, y que participan en la formación de puentes disulfuro. En la mayor parte de las prolaminas los puentes disulfuro son intracatenarios

y condicionan su estructura tridimensional. En algunas de las prolaminas con alto grado de agregación, la asociación entre los residuos de cisteína favorece la agregación de estos propolipéptidos. Esta propiedad de las prolaminas sugeriría que el ensamblado y plegamiento dentro del RE se encuentra influenciado por el estado redox del RE al igual que por la activación de enzimas del tipo disulfuro isomerasa.



Síntesis pro-glutelinas

Síntesis de prolaminas

Figura 4. Esquema de síntesis y transporte de las glutelinas y prolaminas al interior de los cuerpos proteicos en arroz. Segregación de los ARNm en diferentes regiones del RE. Gráfico extraído de Müntz 1998

En el arroz, cereal en el que están presentes glutelinas y prolaminas, cada una de ellas se sintetiza en regiones específicas del RE. Esta localización está determinada por secuencias presentes en sus ARNm que hacen que la traducción ocurra en subcompartimentos específicos del RE. Las glutelinas, al pertenecer estructuralmente a la misma familia que las globulinas 7S y 11S, se sintetizan de manera análoga mediante una vía de transporte que pasa a través del aparato de Golgi (**Figura 4**). En cambio, las prolaminas son

transportadas directamente a órganos de reserva por una vía que no atraviesa el Golgi. Durante este proceso las prolaminas muestran una asociación con chaperonas del tipo BiP, asociación que continúa hasta que se forman grandes agregados que son expulsados del RE (**Figura 4**)

CLASIFICACIÓN DE VACUOLAS.

Las vacuolas vegetales son organelas que tienen una amplia distribución. Cumplen muy diversas funciones y pueden tomar una amplia variedad de formas a lo largo del proceso de desarrollo, maduración y germinación. Todas las vacuolas contienen en sus membranas proteínas intrínsecas del tonoplasto denominadas TIP; estas proteínas pertenecen a la familia de las acuaporinas dentro de lo que se conoce como proteínas intrínsecas mayores o MIP y se encuentran presentes en animales, plantas, hongos y membranas bacterianas (López y col. 2003). Las TIP funcionan como marcadores para diferenciar a las vacuolas que poseen distintas funciones biológicas como por ejemplo: vacuolas de reserva, de las vacuolas líticas y de las vacuolas vegetativas. Las células vegetativas, almacenan una amplia variedad de proteínas, entre

ellas las lectinas y otras proteínas de la familia de las albúminas 2S. Las vacuolas vegetativas se sintetizan y transportan a través del sistema de endomembranas (RE y Golgi). A diferencia de lo que sucede en el proceso de acumulación de las proteínas de reserva, la síntesis de las vacuolas vegetativas está regulada por cambios de tipo estacional al igual que por los cambios propios que se registran durante el proceso de maduración (cambios hormonales que inducen la activación de determinadas familias de genes).

Las vacuolas de reserva ó vesículas densas (**VD**) en su estado maduro se denominan cuerpos proteicos y cuentan con una organización estructural simple conteniendo una matriz proteica. Esta suele variar según la especie, pudiéndose encontrar en algunos casos inclusiones como ser cristaloides proteicos o de oxalato de calcio (Lott, 1981). Las fracciones proteicas que se acumulan en su interior, pueden seguir el modelo de acumulación de las Leguminosas, donde se depositan globulinas y glutelinas en una única clase de vacuolas o bien tener una distribución selectiva de sus fracciones, como en el caso del arroz en dos clases de cuerpos proteicos. Las reservas minerales pueden o no concentrarse como globoides de fitina. De menor importancia y con menor frecuencia se pueden encontrar enzimas hidrolíticas, hidratos de carbono, ARN, sales ácidas de oxalato de calcio, lípidos y tocoferol.

A diferencia de las **VD**, las vesículas cubiertas de clatrina (**VCC**) transportan proteínas a las vacuolas líticas. Esta vía sería seguida por las proteínas que participan en el procesamiento de proteínas de reserva, aunque este proceso aún se encuentra en estudio ya que en las **PAC** se han encontrado tanto precursores de proteínas de reserva como enzimas de procesamiento vacuolar (Hara-Nishimura y col., 1998). Se han descrito otras vesículas acumuladoras de cisteín proteasas (**KV**) que se originan en el RE y no atraviesan el complejo de Golgi. Estas vesículas se han observado en las células de los cotiledones de semillas de *Vigna mungo* y en su interior las proteasas se encuentran como precursores. Durante la germinación estas vacuolas se fusionan con las **VD** volcando en su interior las proteasas que mediarán la movilización de las proteínas.

CUERPOS PROTEICOS EN DIFERENTES ESPECIES.

CUERPOS PROTEICOS DE CEREALES

Cuerpos proteicos de maíz y arroz.

Los primeros cuerpos proteicos que se forman en el maíz, son pequeños, esféricos y densos al microscopio electrónico (Lending y Larkins, 1989; Woo y col., 2001) y están constituidos solamente por β y γ zeínas como se evidencia en la **Figura 5**. A medida que van madurando adquieren zonas más claras al microscopio electrónico constituidas por α y δ zeínas, las cuales terminan ocupando la mayor parte del cuerpo proteico maduro relegando a las β y γ zeínas a un anillo en la zona externa hasta alcanzar un diámetro final de 1-2 μm . Así en estos cuerpos proteicos, al igual que como se verá, en los cuerpos proteicos heterogéneos de semillas Dicotiledóneas, la distribución espacial de las proteínas de reserva se encuentra muy controlada.

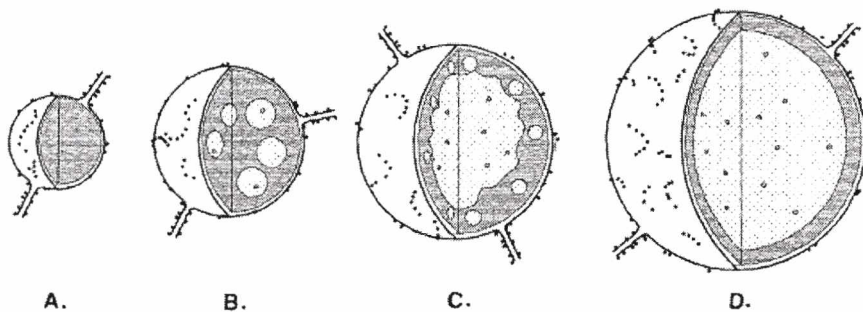


Figura 5 . Desarrollo de los cuerpos proteicos del endosperma de maíz. La zona más oscura corresponde a la zona de β - y γ - zeínas mientras que la zona más clara a la α - y δ zeínas.

Como fuera mencionado, en arroz el almacenamiento de las proteínas de reserva se lleva a cabo en dos cuerpos proteicos diferentes. Esto se pone de manifiesto en la **Figura 6** donde se puede observar que los cuerpos proteicos tipo I son claros y esféricos, se encuentran asociados con el RE y están rodeados de una membrana con ribosomas. Los cuerpos proteicos tipo II son opacos y de forma irregular, se encuentran depositados en vacuolas y se los asocia con el aparato de Golgi. Los cuerpos proteicos I están constituidos por prolaminas y los II por globulinas (Muench y Okita, 1997).

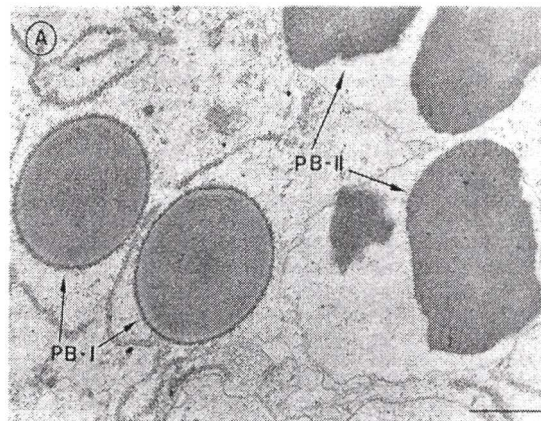
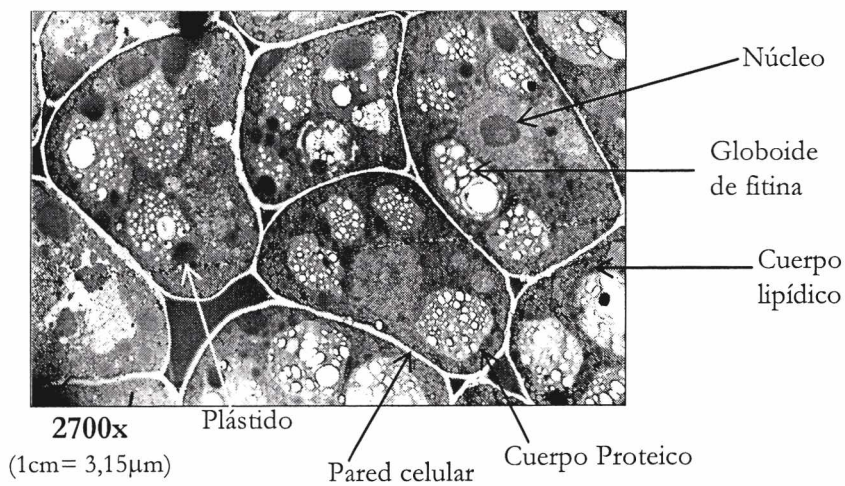


Figura 6 Microscopía electrónica de transmisión de una preparación de cuerpos proteicos de arroz donde se muestran las dos clases de cuerpos proteicos (**PB I** y **PB II**) presentes en esta especie. (extraída de Muench y Okita 1997)

CUERPOS PROTEICOS DE PSEUDOCEREALES.

Cuerpos proteicos de Amaranto, Quínoa y Trigo sarraceno: Características estructurales.



Los cuerpos proteicos de Amaranto (*A. hypochondriacus*) son muy similares a los de la Quínoa (*Chenopodium quinoa*) y el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) presentan un tamaño promedio entre los

2-5 µm y se tiñen densamente cuando se observan por microscopía electrónica de transmisión como puede observarse en la **Figura 7**.

Contienen inclusiones de globoides de fitina pero carecen de cristaloide proteico y están rodeados de numerosos cuerpos lipídicos o esferosomas, siendo esta última una característica que comparten con los cereales (Coimbra y col., 1994). Los cuerpos proteicos del amaranto presentan membranas sin ribosomas pudiéndose establecer un paralelismo morfológico con los encontrados para las Leguminosas. En el caso del amaranto, estas vacuolas se ubican principalmente en la región embrionaria y están ausentes en el perisperma (Konishi y col., 1995) Como se puede observar en la Figura junto a los cuerpos proteicos también se encuentran presentes otras organelas como los plástidos.

GERMINACIÓN

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

El estudio de la germinación en diferentes semillas de interés agronómico es una de las líneas de investigación más estudiadas ya que este proceso es un evento de gran relevancia en el ciclo de vida de las semillas. Son objeto de estudio los factores que regulan la latencia de las semillas y la reactivación de las diferentes rutas bioquímicas durante el proceso de imbibición y posterior crecimiento de la plántula. La germinación por definición, se inicia con la imbibición de la semilla en estado quiescente y concluye cuando la radícula se intercala entre las estructuras que rodean al

embrión. En el interior de la semilla se reactivan una serie de actividades fisiológicas y bioquímicas que provocan la movilización de sus reservas (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) para proveer energía y precursores moleculares durante el crecimiento de la plántula. Tal como se muestra en la **Figura 8**,

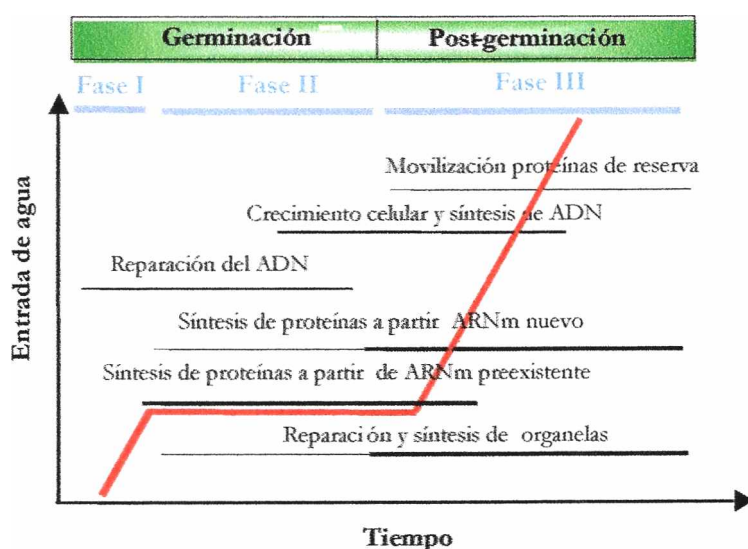


Figura 8 : Cinética de la entrada de agua hacia el interior de las semillas durante las diferentes fases de la germinación y post-germinación indicada por la curva en rojo. Extraída de Bradford (2003).

la germinación y el crecimiento posterior de la plántula se encuentran fuertemente influenciados por la entrada de agua a lo largo del tiempo en la semilla. Este es un proceso trifásico que permite delimitar los eventos concernientes a la germinación de aquellos de la post-germinación.

La fase inicial, **Fase I**, es consecuencia de un evento físico en el que se forma un gradiente de entrada de agua denominado potencial agua (ψ_a), entre la semilla y su entorno, aumentando de manera lineal hasta que se alcanza la **Fase II**. La tasa de imbibición de la semilla, al igual que la temperatura a la que ésta se produce, es fundamental ya que las membranas celulares se encuentran en un estado similar al de un gel. Durante los primeros estadios de imbibición este estado se revierte a un estado líquido.

La **Fase II**, en cuyo transcurso el contenido de agua en el interior de la semilla no se modifica significativamente es de mayor duración en el tiempo que la fase previa. Esta etapa es dependiente de la temperatura y su finalización coincide con la culminación de la germinación propiamente dicha. Durante la **Fase II** las semillas viables reactivan sus sistemas de producción de energía, reparan posibles daños o fallas ocurridas durante etapas previas o durante el desarrollo (reparación de organelas y de material genético) y se preparan para iniciar el crecimiento del embrión. Al finalizar esta etapa, se produce división y expansión celular acompañado de un aumento en la entrada de agua a los tejidos que suele estar mediado en parte por la presencia de expansinas. La mayor parte de las enzimas intervinientes en este proceso se encuentran reguladas por las hormonas vegetales, entre ellas, las giberelinas.

La **Fase III** de la imbibición se halla delimitada por un marcado incremento en el contenido de agua en el interior de la semilla como consecuencia del crecimiento del embrión. La aparición de la radícula a través de las estructuras embrionarias es un punto sin retorno para la semilla donde su objetivo final será el crecimiento de la plántula, siendo éste uno de los momentos más vulnerables de su ciclo de vida. Uno de los eventos de mayor importancia durante esta etapa es la movilización de las reservas: almidón, lípidos, proteínas y de los minerales en los cristaloides de fitina (Bewley y col., 1997; Bradford y col., 2004).

REGULACIÓN HORMONAL Y GENÉTICA.

El control de la reactivación metabólica se ejerce a lo largo del tiempo, a partir de diferentes familias de genes expresándose en determinados estadios fisiológicos, regulados por las diferentes hormonas vegetales. La regulación hormonal, desempeña un papel importante durante

el desarrollo y fundamentalmente durante la germinación. Existe un balance de las hormonas vegetales que se va modificando a lo largo del ciclo de vida de las semillas.

El ácido giberélico o giberelina (GA) es una fitohormona que controla diversos aspectos del ciclo de vida de las plantas, incluyendo la germinación, expansión de hojas y floración. Desde el punto de vista químico es un diterpenoide cíclico que se sintetiza a partir del geranio-geranil difosfato generándose las formas biológicamente activas entre como la denominada G_1 (Ogawa y col., 2003). El GA induce la movilización de las sustancias de reserva desde los reservorios tisulares hacia los sitios de crecimiento activo.

En los primeros estadios de germinación suele evidenciarse un aumento de la concentración de GA en la radícula a medida que se aproxima el momento de la movilización proteica (Tiedemann y col., 2000). En un comienzo, se propusieron algunas hipótesis acerca de la función que cumpliría la luz en la reactivación del proceso de movilización. Estudios posteriores descartaron esta idea sugiriendo que en realidad es la temperatura la que induce la síntesis de GA.

CAMBIOS MORFOLÓGICOS QUE SE PRODUCEN EN LAS VACUOLAS DE RESERVA (CUERPOS PROTEICOS) DURANTE LA MOVILIZACIÓN

Luego de la síntesis, transporte y acumulación de las proteínas de reserva en el interior de los cuerpos proteicos en un medio de naturaleza ligeramente ácida, la semilla sufre una disminución en la cantidad de agua y queda en estado quiescente hasta que se desencadena la germinación. Durante la movilización de las proteínas de reserva se producen una serie de cambios en la fisiología de las vacuolas de reserva. Estas abandonan su rol de compartimento de reserva para convertirse en organelas de carácter lítico, donde proteínas, lípidos, carbohidratos y fitina son degradados. Estos cambios se encuentran regulados por toda una serie de mecanismos bioquímicos (regulación hormonal, activación/silenciamiento de diferentes familias de genes).

Como ya fuera mencionado, en las membranas de las vacuolas maduras se encuentran presentes las proteínas integrales del tonoplasto (TIP) y diversas proteínas transportadoras. Cuando se inicia el crecimiento de la plántula en cereales y debido a la liberación de GA, se desencadenan una serie de cambios bioquímicos que dan origen a cambios morfológicos. Antes de producirse la germinación las vacuolas de reserva no se comportan como entidades independientes sino que se encuentran interconectadas por proteínas tonoplásticas. Al comienzo de la germinación, las vacuolas aumentan en tamaño y disminuyen en número y se inicia un

proceso similar al de la coalescencia de pequeñas vacuolas. Los remanentes del globoide de fitina no abandonan su ubicación original y se produce una disminución de la superficie tonoplástica.

Los cambios más notorios que se registran durante la movilización además de los ya descritos son: disminución en la densidad de tinción generalizada de las proteínas de reserva de las vacuolas y de sus inclusiones. También se observan remanentes de membrana y lípidos cuya naturaleza aún se desconoce. Bethke y col., (1998) postularon que estos remanentes de membrana podrían ser restos de organelas que habrían sido degradadas.

Varios autores, entre ellos Strzalka y col., (1995) e Inoue y col. (1995a y b) realizaron estudios sobre los cambios que se registran durante la movilización en las proteínas de membrana de cuerpos proteicos de semillas de zapallo (*Cucurbita sp.*). Estos estudios llevaron a resultados que sugirieron que es necesaria la degradación de ciertas proteínas de membrana de cuerpos proteicos para que se lleve a cabo la degradación de las proteínas de reserva.

MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA. DEGRADACIÓN DE GLOBULINAS.

La estructura de las proteínas está sin duda ligada a su función biológica. Las proteínas que son reserva de aminoácidos, y que serán utilizadas durante el desarrollo de la plántula en la germinación, se mantienen agregadas en la semilla con escaso contenido de agua. Las vacuolas de reserva maduras, cuerpos proteicos conteniendo los depósitos de proteínas ensambladas, se alojan en diferentes tejidos que cumplen funciones de reserva. Así en las Dicotiledóneas se encuentran en cotiledones y eje embrionario mientras que en cereales se ubican en el endosperma.

La degradación de las proteínas de reserva durante la germinación, se inicia en el lugar donde comienza el crecimiento y la diferenciación del embrión. En el endosperma de los cereales y en los cotiledones de las leguminosas la movilización más importante de las proteínas de reserva se produce durante la etapa de post-germinación o etapa de crecimiento (Bewley y Black, 1994). Sin embargo, en las semillas de Dicotiledóneas, se registra una síntesis endógena de proteínas en el embrión durante etapas más tempranas. Los mecanismos involucrados en el desfasaje en el tiempo que media entre la síntesis de proteínas y la movilización de las reservas no se encuentran completamente esclarecidos. Se especula que los aminoácidos necesarios para esta síntesis proteica provendrían de la degradación de proteínas endógenas del embrión (Schlereth y col., 2000). En las leguminosas, durante la post-germinación, el aporte de los aminoácidos sería

suministrado por las proteínas de almacenamiento contenidas en los cuerpos proteicos de los cotiledones. Ensayos inmunoquímicos realizados por Müntz y col. (2001) y Schlereth y col (2000) en *Vicia sativa* han ratificado la secuencia antedicha de degradación (embrión-cotiledones). El aumento de aminoácidos en la etapa de post-germinación es acompañado por un cambio en la composición de los mismos. Como consecuencia de la movilización de las proteínas de reserva (globulinas 7S y 11S) se produce la acumulación de aminoácidos de características ácidas y de compuestos de la familia de las amidas, siendo estas últimas, componentes principales de globulina 7S y 11S.

La vicilina (globulina 7S) precede a la movilización de la legumina (globulina 11S). La globulina 7S, representa la fuente inicial de aminoácidos durante los primeros estadios de germinación en *Vicia sativa*. Esta fracción se encuentra fundamentalmente en la radícula del embrión en crecimiento. Es en estos tejidos en expansión donde se localiza primariamente la degradación de la globulina 7S en *Vicia sativa* (Tiedemann y col., 2000). Presumiblemente, la legumina sería empleada como fuente de aminoácidos para el crecimiento posterior de la plántula aportada en gran medida por los cotiledones.

Se ha encontrado en varias especies, que la completa degradación de la fracción 7S se produce antes de las 24 h de imbibición. La vicilina es la primera en ser degradada (Schlereth y col 2000) por proteasas cisteínicas almacenadas en el interior de los cuerpos proteicos (Senyuk y col., 1998 y Tiedemann y col., 2001). La fracción 11S, en cambio se encontraría principalmente en las capas celulares más profundas de los cotiledones (células parenquimáticas). En *Vicia sativa* las leguminas comienzan a moverse a partir de las 24 horas de imbibición pero este proceso puede extenderse hasta los 3-5 días post-imbibición.

Durante la movilización de la globulina 11S, la subunidad ácida de las leguminas se degrada más rápidamente que la básica. Es posible que durante este proceso incluso esta fracción presente una conformación más inestable, como consecuencia de los cambios de pH sufridos en el medio celular durante la germinación. Estudios inmunoquímicos realizados en cotiledones tanto de *Vicia sativa* (Müntz, 1996) como en semillas de remolacha (*Beta vulgaris*) sometidas a un tratamiento de "priming" (Job y col., 1997) corroboraron lo mencionado anteriormente. Esto esta de acuerdo con el hecho que la subunidad ácida se encuentra en una localización más superficial que la subunidad básica. Ensayos electroforéticos realizados en condiciones desnaturalizantes en el transcurso de la germinación, sobre las leguminas de *Vicia sativa*, han permitido obtener como principales productos de hidrólisis a especies proteicas con masas

moleculares entre los 24-30 kDa, con valores mayores a los de la subunidad básica, indicando que estos productos intermedios provendrían de la hidrólisis de la subunidad ácida.

En condiciones no desnaturalizantes se ha encontrado en trigo sarraceno que durante la movilización de las globulinas, se produciría un hexámero modificado (13S) el cual presentaría pequeños cambios en su movilidad electroforética (Müntz y col., 2001). Estos mismos autores, han postulado que durante la hidrólisis, en esta especie, se encontraría involucrada la disociación de un inhibidor de proteasas. El mismo tendría una masa molecular de 12 kDa, estaría localizado en el interior de los cuerpos proteicos, asociado además a metaloproteasas las cuales permanecerían en estado inactivo durante el desarrollo de la semilla. Durante la germinación, la disociación de este inhibidor estaría regulado por la liberación al medio de zinc, proveniente probablemente de las reservas de fitina del interior de las células (Voskobyonikova y col., 1990).

FAMILIAS DE PROTEASAS INTERVINIENTES DURANTE LA MOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA EN LA GERMINACIÓN Y POST-GERMINACIÓN.

La movilización inicial de proteínas que se lleva a cabo en el embrión en los primeros estadios de germinación es mediada por proteasas prealmacenadas en el interior de los cuerpos proteicos o provenientes de vesículas que se fusionan a los mismos (Toyooka y col., 2000). Entre estas proteasas se encuentran las pertenecientes a la familia de las legumainas, cisteín proteasas presentes en los cuerpos proteicos que durante el desarrollo llevarían a cabo el procesamiento de las proglobulinas (VPE). Las globulinas maduras por su conformación no podrían ser posteriormente degradadas por las legumainas. Durante la germinación y desarrollo esta protección conformacional es superada por la acción de otras proteasas de especificidad más amplia tales como las metaloproteinasas y las cisteín proteinasas semejantes a la papaína. Este último cambio conformacional permite un segundo ataque por parte de las legumainas (Müntz y col., 2002). A medida que avanza la germinación se produce además la síntesis *de novo* de otras proteasas.

La mayoría de las proteasas se encuentran como precursores inactivos durante el desarrollo y maduración de la semilla. La activación de las proproteasas del tipo de las legumainas se llevaría a cabo a través de un proceso de autocatálisis que tiene lugar en medio ácido, similar al del interior de los cuerpos proteicos, o por acción de otras proteasas.

Shutov y col. (1987) propusieron que durante las primeras etapas de la movilización de las proteínas de reserva el mecanismo de hidrólisis preponderante sería el de tipo zipper permitiendo la formación de productos de hidrólisis intermedios de alta masa molecular. Estos productos no presentarían cambios significativos de masa molecular pero sí un aumento en su carga superficial negativa. A tiempos más largos de imbibición, de acuerdo a estos mismos autores, prevalecería el mecanismo one-by-one el cual conduciría a la formación de los oligopéptidos que serían transportados al citoplasma para su posterior conversión a productos de menor tamaño. En este último paso intervendrían otras proteasas del tipo de las aminopeptidasas con una ubicación citoplasmática, responsables de la hidrólisis de péptidos pequeños a aminoácidos.

La contribución de cada una de las proteasas en la degradación de las globulinas de reserva depende de su actividad relativa en cada una de las especies en estudio. En el interior de cuerpos proteicos alojados en los cotiledones de trigo sarraceno se ha descrito, por ejemplo, la presencia de metaloproteinasas como así también de proteasas aspárticas y carboxipeptidasas. (Müntz y col., 2002). En tanto que en el caso de la faseolina de arveja la degradación de la misma requiere de la acción simultánea tanto de las legumainas como de las proteasas cisteínicas (Zakharov y col., 2004).

OBJETIVOS

De lo expuesto anteriormente se desprende que las proteínas de la semilla de amaranto, si bien se asemejan a las proteínas de leguminosas, muestran a su vez características propias. Tal es la gran abundancia de sus albúminas y la presencia de una globulina de almacenamiento, la globulina-p, con propiedades intermedias entre las globulinas y las glutelinas. Estas particularidades abren el interrogante acerca de la función de las mismas en la vida de la planta y de cómo las proteínas de amaranto se asemejan o se diferencian en su función biológica de otras proteínas de semilla. Por esta razón nos hemos propuesto como

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las proteínas de reserva de amaranto desde el punto de vista biológico.

En particular caracterizar la movilización de dichas proteínas durante los primeros estadios de la germinación.

En consecuencia, los objetivos específicos a lograr son.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la participación de las distintas fracciones proteicas en la movilización de proteínas durante la germinación.
- ✓ Identificar las modificaciones estructurales de las proteínas durante las distintas etapas de germinación.
- ✓ Caracterizar a los posibles componentes de la fracción albúminas con función de almacenamiento.
- ✓ Detectar e identificar enzimas proteolíticas involucradas en la movilización de proteínas durante la germinación.
- ✓ Iniciar el estudio de los cambios que se desarrollan en el interior de los cuerpos proteicos en el proceso de germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

SEMILLAS Y HARINA

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* fueron cosechadas en la estación experimental del INTA Anguil, Provincia de La Pampa. La mayor parte de los ensayos llevados a cabo en esta tesis, fueron realizados con semillas enteras a diferentes tiempos de imbibición. En los casos donde fuera necesaria la utilización de harina, la misma fue preparada en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Para ello, las semillas enteras se molieron en un molino Udy, de 1 mm de mesh y se tamizaron a través de un cedazo de mesh 10xx. La harina pudo o no ser desgrasada mediante tratamiento con n-hexano al 10% p/v con agitación continua durante 24 horas a 4 °C. Para posteriormente separar la harina tratada del hexano mediante filtración a temperatura ambiente y secarla en las mismas condiciones. La harina así obtenida, desgrasada, se almacenó a 4 °C.

Las semillas de quinoa, adquiridas en un comercio público, al igual que las de trigo (cultivar Oasis) y girasol (cultivar ATAR-TC 3003) fueron molidas en nuestro laboratorio con un molino de cuchillas Janke & Kunkel (IKA®) modelo A-10 y se tamizaron a través de un cedazo de mesh 10xx.

PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS A DIFERENTES ESTADIOS DE IMBIBICIÓN

Las semillas de amaranto fueron hidratadas durante 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,02%, como tratamiento antifúngico. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres series de lavados de 10 minutos cada uno con agua destilada por un lapso de 30 minutos. Durante el lavado de las semillas se procedió al armado de los germinadores, formados por cajas plásticas (el tamaño de los mismos se ajustó a la cantidad de semillas utilizadas para cada experiencia) cuya base se cubrió con una capa de algodón humedecido con agua destilada. Sobre este último, se colocó una hoja de papel de filtro también humedecido donde posteriormente se ubicarán las semillas en forma homogénea, las cuales serán sometidas a diferentes tiempos de imbibición. Posteriormente las cajas se cerraron, y fueron colocadas en una estufa a 37 °C a diferentes tiempos de imbibición. Los mismos fueron: 0 (control), 6, 15, 24 y 48 horas de imbibición (h). Una vez transcurrido el tiempo, las semillas fueron secadas por el lapso de 1 hora a 42 °C en una estufa de manera de disminuir la actividad enzimática. Las semillas, una vez secas fueron fraccionadas y almacenadas a -80 °C hasta su posterior selección. El criterio utilizado para la selección de las semillas a los diferentes tiempos, se basó en la longitud de la radícula en crecimiento.

Las semillas control y con 6 h de imbibición, carecieron de radícula mientras que aquellas con una longitud de radícula menor a los 0,5 cm pertenecieron al tiempo de 15 h. Las semillas con una longitud de radícula de 0,5 cm fueron las de 24 h, mientras que las de 48 h presentaron valores por encima de los 0,5 cm. Las semillas una vez seleccionadas fueron almacenadas a -80 ° C hasta su posterior utilización. En el transcurso de este trabajo, la selección de las semillas fue realizada unas 6 veces.

Reactivos generales.

Buffer A: K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,4M.

Buffer B: K_2HPO_4 33,3 mM - KH_2PO_4 1,7 mM (pH 8,5).

Buffer C: dietanolamina 20mM (pH 8,5) con o sin el agregado de NaCl 1M según corresponda.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS A DIFERENTES ESTADIOS DE IMBIBICIÓN.

A partir de la harina obtenida por molienda en nitrógeno líquido de las semillas a distintos estadios de imbibición se realizó una extracción secuencial del contenido proteico. Las extracciones con cada uno de los solventes empleados fueron hechas una sola vez por el lapso de 60 minutos. La relación harina/solvente de extracción (gr. /ml) fue de 1/10 en todos los casos. Todas las centrifugaciones realizadas a lo largo del proceso de extracción se realizaron utilizando una centrífuga Beckman modelo Avanti J-25 (rotor JA-25-50). A cada uno de los solventes de extracción utilizados se les agregó un inhibidor de proteasas (fenil metisulfonil fluoruro; **PMSF** con una concentración final de 50 μ gr/ml). La secuencia de proteínas extraídas y los solventes empleados para cada etapa fueron los siguientes:

Fracción albúmina.

Se utilizó agua destilada como solvente de extracción. Luego de 60 minutos de agitar la suspensión harina/agua se centrifugó a 9.000 x g durante 20 minutos a una temperatura de 20 °C. El sobrenadante se separó y se lo llevó a pH 5,0 con HCl 2N, pH al cual se produce la precipitación isoeléctrica. El precipitado proteico se separó por centrifugación a 9.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El material insoluble centrifugado se

resuspendió en agua destilada ajustando el pH a 7,0 con NaOH 0,1N. La suspensión obtenida se congeló a -20 °C y se liofilizó en un equipo Heto modelo FD4.

Fracción globulina.

La extracción se realizó de la manera descrita para albúmina, sobre el residuo de harina remanente de su extracción. El buffer utilizado para extraer las proteínas fue el denominado "A" (ver reactivos generales). La precipitación isoelectrica se realizó a pH 6,0 obteniendo la globulina 11S (globulina). El precipitado proteico se separó por centrifugación a 9.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El mismo se resuspendió en agua destilada ajustando el pH a 7,0. Luego se procedió a su liofilización del modo descrito para la fracción albúmina.

Fracción globulina-p (Gp).

En este caso, el solvente de extracción fue agua destilada y se utilizó el residuo de harina resultante de la extracción de globulinas. El pH de precipitación isoelectrica fue 6,0. La separación de las proteínas se realizó mediante centrifugación a 9.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido, se resuspendió en agua destilada y se llevó a pH 7,0 para luego ser liofilizado (Gp).

Fracción glutelina.

Esta fracción proteica fue extraída del residuo de harina obtenido de la extracción de globulina-p. El buffer de extracción fue NaOH 0,1 M (pH 10,0) y la posterior precipitación isoelectrica fue llevada a cabo a pH 6,0. Para obtener la fracción liofilizada se procedió de la misma manera que para las fracciones mencionadas anteriormente.

Las extracciones realizadas a partir de las semillas enteras a lo largo del trabajo, fueron de 15. Cada extracción fue analizada por lo menos por triplicado para cada uno de los ensayos utilizados.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HARINA DESGRASADA

A partir de la harina desgrasada se realizó una extracción secuencial, de la cual se utilizó solamente a la fracción albúminas. Con cada uno de los solventes utilizados se realizaron tres extracciones, la primera de 60 minutos y las dos siguientes de 30 minutos. A cada uno de los solventes de extracción utilizados se les agregó un inhibidor de proteasas

(fenil metisulfonil fluoruro; **PMSF** con una concentración final de 50 $\mu\text{gr/ml}$). La relación harina/solvente de extracción (gr/ml) fue de 1/10 en todos los casos. La secuencia de proteínas extraídas, los solventes para cada etapa y los pHs de precipitación isoelectrica empleados fueron los mismos a los descritos con anterioridad.

Esta extracción fue realizada 2 veces y los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA.

Lowry.

El contenido proteico fue determinado por el método de Lowry (Lowry y col 1951): para la realización de la curva de calibración se utilizó una dilución 1/10 de una solución 10 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO, Precipitación alcohólica. Fracción V) disuelta en el mismo buffer que la muestra. Las lecturas de las distintas fracciones proteicas se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro Beckman DU 650, a una longitud de onda de 700 nm.

TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS REALIZADOS SOBRE LA GLOBULINA -P.

Se partió de dos suspensiones de globulina-p cada una de ellas, con una concentración proteica de 30 mg/ml en buffer B. La hidrólisis dicha fracción fue realizada con dos enzimas diferentes: papaína y tripsina. Una de las preparaciones fue destinada a la papaína (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) utilizando una actividad de 0.018 UI/ mg de proteína. La otra preparación se destinó a los ensayos con tripsina, (Type III de páncreas bovino, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) con una actividad enzimática de 14 UI/ mg de proteína. La temperatura de incubación empleada para ambas enzimas fue de 25°C. Una vez iniciada la hidrólisis y transcurrido los diferentes tiempos de hidrólisis analizados (0, 5, 30 y 120 minutos) se tomaron alicuotas de la suspensión de partida. La reacción enzimática se detuvo por el agregado de NaOH 0.1N en frío añadiendo igual volumen de buffer de muestra en condiciones desnaturalizantes y reductoras, para un posterior análisis por western blot.

OBTENCIÓN DE CUERPOS PROTEICOS.

Se partió de una preparación de semillas a diferentes estadios de imbibición. Las mismas se molieron en un mortero en presencia de sacarosa 0,5M pH 7,5 (**solución de extracción**) en frío. Esta suspensión se centrifugó en una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company) durante 2 minutos a 1000 rpm a 10° C. Al sobrenadante obtenido, se lo volvió a centrifugar a 6250 rpm durante 10 minutos a la misma temperatura, luego de lo cual se conservó tanto al sobrenadante (**SNc**) como al residuo. A este último, se lo resuspendió en 100 µl de la solución de extracción y se lo colocó sobre un colchón de 1,4 ml de sacarosa 40%. Esta suspensión se centrifugó durante 45 minutos a 12.000 rpm a 10 °C utilizando el mismo equipo mencionado anteriormente; el residuo obtenido se encuentra enriquecido en cuerpos proteicos (**CPc**).

A la preparación denominada (**SNc**) se la ultracentrifugó a 30.000 rpm durante 30 minutos a 10 °C en una ultracentrífuga Beckman (Optima TL Ultracentrifuge) en un rotor angular modelo TLA-100 obteniéndose: un sobrenadante (**SNs**) purificado (empobrecido en componentes globulínicos) y un residuo (**SNp**). El residuo de cuerpos proteicos (**CPc**), se purificó mediante un segundo pasaje por el colchón de sacarosa en idénticas condiciones a las anteriormente mencionadas utilizando una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company) obteniéndose la fracción (**CP₂**).

EXTRACCIÓN DE FRACCIONES DE RESERVA A PARTIR DE CUERPOS PROTEICOS

A partir del residuo de cuerpos proteicos (**CPc**) obtenido a partir de 0,2 g de harina a diferentes tiempos de imbibición se realizaron extracciones secuenciales con diferentes solventes. La relación harina/solvente fue de 1/5 siguiendo el siguiente orden de extracción: a) Agua y b) Buffer A. Las extracciones se realizaron a 20° C y las preparaciones obtenidas fueron agitadas en forma continua durante 1 hora. Transcurrido este lapso, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos a 20°C en una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company). Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20 ° C hasta su utilización.

ELECTROFORESIS.

Reactivos generales.

Buffer de electrodo: hidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,025 M, glicina 0,192 M (pH 8,3), con o sin dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v, para electroforesis desnaturalizante o nativa respectivamente.

Buffer de gel separador: Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) con o sin SDS 0,1% p/v. N', N', N', N', tetrametiletilendiamina (TEMED): en ambos buffers (separador o apilador) se utilizó una concentración 0,1% v/v.

Buffer de muestra para electroforesis desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v, SDS 0,1% p/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v con o sin 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

Buffer de muestra para electroforesis no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (PAGE-nativo): Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v y azul de bromofenol 0,05% p/v.

Buffer de tratamiento para electroforesis bidimensional: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 0,1% p/v, sacarosa 20% p/v, con o sin 2-ME 0,2 M (Utsumi y col., 1984).

Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon disolviendo la proteína liofilizada en buffer de muestra (2 mg/ml) o, cuando se trataba de soluciones proteicas, agregando 3 volúmenes de las mismas a 1 volumen de buffer de muestra 4x. En las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras las muestras fueron tratadas a 100 °C durante 1 minuto.

Todas las muestras, antes de ser cargadas en el gel correspondiente, se centrifugaron a 12.000 x g durante 20 minutos a 20 °C en una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company), y los sobrenadantes se sembraron a razón de 30-40 µg de proteína/calle cuando se realizó una tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250, o de 1-2 µg de proteína/calle cuando se realizó una tinción con nitrato de plata.

Desarrollo.

Todas las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini Protean. Se utilizó el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970), que se

detallaron previamente. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V (aproximadamente 1,5 horas).

SDS-PAGE.

Según se indica en las leyendas de cada figura, se utilizaron geles de poliacrilamida. (Petruccelli y Añón 1994), de concentración constante de acrilamida 12% p/v con gel de concentración en su parte superior (acrilamida 4% p/v) o bien a otra concentración de acuerdo a lo indicado en las leyendas.

La mezcla de proteínas patrón utilizadas para el cálculo de las masas moleculares de los polipéptidos fueron suministradas por Pharmacia en un único vial. La misma estaba constituida por: fosforilasa b (94 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Las proteínas patrón fueron solubilizadas en 200 μ l de buffer de muestra desnaturizante con 2-ME y sometidas al mismo tratamiento que se aplicó a las muestras. Se construyeron curvas de calibración relacionando el factor de distancia de las distintas proteínas (R_f), con el logaritmo de su peso molecular. Los pesos moleculares de los polipéptidos son el resultado de tres determinaciones como mínimo.

$R_f = D_x/D_f$ (D_x : distancia recorrida por el polipéptido x y D_f : distancia recorrida por el frente de corrida)

SDS-PAGE + 2-ME.

Se realizó del mismo modo que la electroforesis desnaturizante. Las proteínas patrones de masa molecular empleadas anteriormente fueron las mismas.

PAGE-NATIVO.

Para estas electroforesis se empleó el mismo sistema buffer que para las desnaturizantes pero sin el agregado de SDS. Se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 2 horas. Para las electroforesis realizadas en estas condiciones se utilizaron geles en gradiente lineal o de concentración constante según lo referido en las leyendas.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES (PAGE-nativo \rightarrow SDS-PAGE)

Luego de correr la primera dimensión (geles de 1 mm de espesor) se cortó la porción del gel correspondiente a dos calles con la proteína a analizar y se la sumergió en

30 ml de buffer de tratamiento (descrito previamente), manteniéndola a 55 °C durante 30 minutos con dos cambios de la solución. La porción de gel tratada se colocó sobre el gel de la segunda dimensión de 1,5 mm de espesor (SDS-PAGE o SDS-PAGE + 2-ME según correspondiera). En este mismo gel, en una calle aparte y como referencia, se sembró la mezcla de proteínas patrón de masa molecular. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 200V durante aproximadamente 1,5 horas.

Coloración.

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4) durante 12 horas y desteñidos con metanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v a temperatura ambiente. Los geles donde la cantidad de proteína era insuficiente para ser detectada por Coomassie Brilliant Blue R-250, fueron coloreados mediante la tinción de plata (Blum y col., 1987). Las diferentes tinciones empleadas se indican en cada figura.

ZIMOGRAMAS.

Preparación de las muestras.

Las soluciones proteicas se prepararon agregando 3 volúmenes de las mismas a 1 volumen de buffer de muestra (conteniendo 10 mM de 2-ME, 2% de SDS y 0,1M Tris pH 8,3). Las mismas se sembraron a razón de 30-40 µg de proteína/calle y no fueron sometidas a ebullición, para evitar la desnaturalización enzimática.

Desarrollo.

Las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini Protean en un baño de hielo-agua para evitar la acción enzimática. Las corridas electroforéticas se realizaron en las mismas condiciones que fueran descritas para el caso de las electroforesis realizadas en condiciones desnaturalizantes.

Preparación de los geles

Para los geles de concentración de poliacrilamida constante se cargaron las placas de vidrio soporte hasta las 3/4 partes con la mezcla de gelificación y se dejó polimerizar con el agregado de una pequeña capa superficial de agua. Una vez polimerizado el gel de separación se cargó sobre éste la mezcla de gelificación para el gel apilador. A las soluciones

preparadas anteriormente, se les agregó 0.2% de gelatina (Mallinkrodt) y se las homogeneizó con una varilla en un baño con agua cuya temperatura no superara los de 40 ° C hasta su completa disolución.

Cabe señalar que, además del gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina se corrieron en idénticas condiciones geles en ausencia de gelatina de manera de obtener el perfil electroforético de la mezcla de proteínas en estudio.

Revelado y tinción de los geles

Una vez realizada la corrida electroforética, los geles con gelatina fueron lavados con una solución de Tritón X-100 al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se los colocó en un buffer citrato de sodio 0,1M con 10 mM de 2-ME (**buffer de incubación**) al pH de estudio durante 12 horas en una estufa a 37° C. Transcurrido este tiempo, se les agregó la solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 para su coloración. De ésta manera lo que se obtiene es un gel teñido de azul y en blanco los sitios donde se ha registrado actividad proteolítica. En el caso de los geles sin gelatina se efectuó la tinción correspondiente a dichos geles y que fuera descrita anteriormente.

ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (IEF/SDS-PAGE+ ME)

Las fracciones albúminas y globulinas provenientes de harinas de semillas sin desgrasar a diferentes estadios de imbibición fueron analizadas mediante electroforesis en dos dimensiones (IEF/ SDS-PAGE+ME). La concentración proteica utilizada para todos los ensayos fue de 200 y 100 µg de proteína respectivamente para cada una de las fracciones mencionadas. La separación por punto isoeléctrico de las proteínas se llevó a cabo mediante la utilización de strips o tiras de 18 cm de longitud, conteniendo inmobilinas las cuales permitieron la formación de un gradiente lineal de pH entre 3-10 (Immobiline Dry Strips pH 3-10, 18 cm; Amersham Biosciences). Estas tiras fueron hidratadas durante 14 horas a temperatura ambiente, con un buffer conteniendo urea 7M, CHAPS 2%, tiourea 2M, DTT 28%, 10 µl buffer IPG 3-10 (Amersham Biosciences) y cubiertas con 3 ml de una solución de hidratación (De Streak Rehydration solution, Amersham Biosciences) para evitar su deshidratación. La técnica se llevó a cabo a temperatura ambiente en un equipo Ettan IPGphor System (Amersham Biosciences) utilizando la siguiente secuencia de

potenciales: 1 hora a 500V, 1 hora a 1000V y 4 horas a 8000V/hora hasta alcanzar al final de la corrida 30.000V/ hora.

Transcurrido este tiempo y antes de realizar la segunda dimensión las tiras fueron equilibradas en dos soluciones diferentes por un lapso de 1 hora en cada una de ellas a temperatura ambiente. La solución equilibrante 1 contiene urea 6M, glicerol 30% v/v, SDS 2% (p/v), 50 mM Tris-HCl pH 8,8 0,01% de azul de bromofenol y 30 mM de DTT. La segunda solución tiene la misma composición que la anterior a excepción del DTT que es reemplazado por iodoacetamida 60mM. El lavado con esta última solución se realizó únicamente para el caso de la fracción globulina.

Una vez realizados estos tratamientos se procedió al armado de geles en condiciones desnaturalizantes utilizando una concentración de acrilamida al 12% sin gel apilador utilizando el mismo equipo y las mismas condiciones que fueran detalladas anteriormente para electroforesis desnaturalizantes. Antes de la corrida las tiras fueron cortadas por la mitad de manera que pudieran ajustarse a las dimensiones del equipo utilizado para las electroforesis. Posteriormente las tiras fueron selladas con una solución de agarosa al 0,5% para evitar su deshidratación. Este ensayo se realizó una sola vez para cada una de las fracciones mencionadas. La determinación de los valores aproximados de pI se realizaron mediante una extrapolación con una ecuación de primer orden teniendo en consideración las características del gradiente de inmobilinas utilizado.

OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES Y ANÁLISIS DE LOS GELES.

Las imágenes de las electroforesis fueron digitalizadas con un equipo BIO-RAD (Gel Doc 1000), mientras que el análisis de las masas moleculares se realizó con el programa Molecular Analyst™/PC (versión 1.5) (BIO-RAD).

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

CROMATOGRAFÍA A PRESIONES MODERADAS.

Preparación de las muestras.

Para cada cromatografía se suspendieron 10 mg de la fracción proteica estudiada en 400 µl del buffer correspondiente. Se solubilizó durante 1 hora con agitación intermitente a temperatura ambiente en un agitador y luego se centrifugó a 12.000 x g y 20 °C durante 20 minutos en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R, International Equipment Company). Las muestras así obtenidas fueron sembradas manualmente en la columna.

Desarrollo.

Para realizar las cromatografías de exclusión molecular se utilizó una columna (0,7cm x 72 cm) rellena con SephacrylTM S-300 HR (Pharmacia, Upsala, Suecia). La misma fue empacada y equilibrada con tres veces el volumen de su lecho, para ello se utilizó el buffer correspondiente con agregado de NaN₃ 0,02% p/v a una velocidad de flujo de 0,25 ml/minuto mediante el uso de una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2 a temperatura ambiente. Las muestras fueron eluidas a 0,15 ml/minuto y temperatura ambiente. El volumen de las fracciones colectadas fue de 1 ml, se utilizó un colector Buchler (modelo Fractomet e Alpha 400) regulado por tiempo. A la salida de la columna se determinó, de modo continuo, la absorbancia a 280 nm mediante un detector UV BIO-RAD (modelo Econo UV). La misma fue registrada en un adquisidor de datos.

Calibración.

La columna fue calibrada con los siguientes patrones de peso molecular: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y albúmina (66 kDa), que fueron suministrados por la empresa Pharmacia (Upsala, Suecia). Se sembró 1 ml de soluciones de concentración 4 mg/ml de cada proteína patrón, las corridas fueron hechas en forma individual. El volumen muerto fue determinado con azul dextrano. Las condiciones de elución para cada proteína patrón fueron las mismas que las utilizadas para las muestras a procesar. El buffer empleado para la calibración fue el buffer A.

CROMATOGRAFÍA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EN MEDIO LÍQUIDO (FPLC).

Preparación de las muestras.

Las fracciones proteicas liofilizadas fueron suspendidas en el buffer correspondiente a una concentración de 4 mg/ml y solubilizadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se las centrifugó en una microcentrífuga IEC modelo Centra MP4R (International Equipment Company) a 12.000 x g durante 20 minutos a 20 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de 0,22 μ m de poro (Osmonics) y el filtrado así obtenido se inyectó en el equipo de FPLC (Pharmacia LKB) utilizando el reservorio correspondiente al volumen sembrado.

Desarrollo.

Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente utilizando dos tipos de relleno: Superosa 6B HR 10/30 Pharmacia LKB (Upsala, Suecia), o Superdex-75 Pharmacia LKB (Upsala, Suecia). Todos los buffers utilizados fueron previamente filtrados a través de filtros de celulosa con diámetros de poro de 0,22 μm (Osmonics). Las corridas se desarrollaron en el mismo buffer en el que se solubilizó la muestra. Para equilibrar la columna se pasó una cantidad de buffer equivalente a 2 volúmenes de la misma (50 ml). La velocidad de flujo seleccionada fue de 0,2 ml/minuto, la cual fue regulada con una bomba Pharmacia LKB P-500, la presión promedio de las cromatografías fue de 0,2 MPa. Se realizó una colección automática de fracciones del eluato (0,5 ml) empleando el colector FRAC-100 (Pharmacia LKB). Las fracciones obtenidas que no fueron analizadas inmediatamente se conservaron a -20 °C.

Calibración.

La columna se calibró con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0), 2-ME (para el volumen intersticial total, V_T) y las siguientes proteínas de masa molecular conocida: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina (66 kDa) y citocromo C (12,4 kDa), todas provistas por Sigma (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Los patrones se disolvieron en buffer A utilizando una concentración de 4 mg/ml y fueron eluidos con el mismo caudal que las muestras.

Luego se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa) con el K_{AV} , siendo K_{AV} :

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0}$$

V_e corresponde al volumen de elución, en mililitros, del pico de interés. V_T y V_0 han sido definidos previamente.

Los valores de absorbancia a 280 nm fueron determinados de modo continuo a la salida de la columna mediante un monitor UV-1 (Pharmacia LKB). El procesamiento de los perfiles obtenidos se realizó con el programa FPLC Director™ (Pharmacia LKB). Las cromatografías se realizaron por triplicado, a menos que se indique lo contrario.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Preparación de las muestras.

Las muestras liofilizadas fueron suspendidas en el buffer inicial de cromatografía (bajo contenido salino), centrifugadas a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R International Equipment Company) durante 20 minutos a 20 °C y por último filtradas mediante una membrana con poro de 0,22 µm de diámetro.

Desarrollo.

Se empleó una columna de Hi-Trap (Pharmacia, Upsala, Suecia) que fue equilibrada con un volumen equivalente de cinco columnas (\cong 25 ml) del buffer de baja fuerza iónica (**buffer inicial**), una columna de buffer de alta fuerza iónica y por último, nuevamente dos columnas del buffer inicial. El caudal empleado en todos los casos fue 0,5 ml/minuto a una presión promedio de 1,5 MPa. De modo automático, se colectaron fracciones de 0,5 ml empleando el colector FRAC-100 (Pharmacia LKB). El gradiente de elución utilizado fue de tipo lineal y está indicado en la figura correspondiente. El mismo se formó con el buffer inicial y un segundo buffer (buffer de alta fuerza iónica) cuya composición es igual a la del buffer inicial con el agregado de NaCl 1M. Para la mezcla de estas dos soluciones se usaron dos bombas Pharmacia LKB P-500 y un mezclador (Mixer 24V, Pharmacia LKB).

Como buffers iniciales se utilizaron, según los distintos objetivos de estudio:

- buffer C.
- buffer C con 1M de Na Cl

ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS

PRODUCCIÓN DE ANTISUERO ANTI-GLOBULINA-P DE AMARANTO

Los antisueros fueron producidos en conejos. El cuidado y la manutención de los mismos se realizó en el bioterio del IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Los conejos fueron inmunizados con soluciones de unidades estructurales (UE) de globulina-p preparadas por el Dr. Oscar Castellani. Se realizaron en total cuatro inmunizaciones espaciadas cada tres semanas. Luego de la tercera inmunización se extrajo una pequeña cantidad de sangre para determinar el título de los anticuerpos presentes. Posteriormente se realizó una

última inmunización. El suero se obtuvo 10-15 días después de la última inmunización mediante sangrado a blanco. Todo el proceso fue gentilmente supervisado por el Dr. Alberto Fossati. El suero fue precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% gota a gota en frío y con agitación permanente. Se lo centrifugó en una centrífuga Sorvall RC 5B Plus a 14.000 rpm durante 20 minutos a 10° C. El sobrenadante fue descartado y el residuo fue resuspendido en PBS (8 gr/lit de NaCl, 0,2 gr/lit de KCl, 0,2 gr/lit KPO_4H_2 , 2,9 gr/lit $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H} \times 12 \text{H}_2\text{O}$) y posteriormente dializado. Esta solución fue alicuotada y almacenada a -80° C hasta su utilización en los ensayos inmunoquímicos descritos posteriormente.

ENSAYO DE INMUNOREACTIVIDAD POR ELISA.

Sensibilización de las microplacas.

Se preparó una solución stock de las proteínas antigénicas en el buffer indicado en cada caso. Las microplacas, se sensibilizaron con 0,1 µgr de dicha solución antigénica. Las microplacas (Nunc Maxisorb) fueron mantenidas durante toda la noche a 4 °C.

Desarrollo.

Una vez sensibilizadas las microplacas se lavaron tres veces durante 2 minutos con 200 µl por fosa de PBS en presencia de Tween 20 al 0,05% v/v (PBS-Tween). Los sitios libres de cada fosa fueron bloqueados por el agregado de 200 µl de solución de leche en polvo descremada (Molico) al 3% p/v en PBS-Tween. El bloqueo se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C. Se continuó con dos lavados, de 2 minutos cada uno, con PBS-Tween (200 µl/fosa). Posteriormente se cargaron en cada fosa 100 µl de las diluciones seriadas del suero ensayado en PBS-Tween con leche en polvo al 1% p/v. Se incubó durante una hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo las microplacas se lavaron como fuera descrito anteriormente. A las microplacas lavadas, se les agregó una dilución (1/8.000) de la solución de antisuero de cabra, anti-γ globulinas de conejo conjugado con peroxidasa (BIO-RAD) disuelto en PBS-Tween con leche en polvo al 1% p/v. Se incubó durante una hora a 37 °C y se lavó tres veces. Para el desarrollo de color se agregaron 100 µl de una solución de 1 mg de ortofenilendiamina (Merck, Darmstadt Germany) en 1 ml de buffer citrato de sodio 0,1 M a pH 5, 1µl/ml de H_2O_2 al 30%. Luego de 10 minutos la reacción se detuvo agregando 50 µl de H_2SO_4 4 N en cada fosa. La absorbancia fue leída en un lector

de placas de ELISA (Tecan, modelo Spectra Rainbow SLT) a 420 nm. Los ensayos fueron controlados mediante tres tipos de blancos por duplicado: 1) fosas sin sensibilizar sobre las que se realizó todo el desarrollo posterior del ensayo; 2) fosas en las que no se agregó el antisuero en estudio; 3) fosas en las que no se agregó ni suero, ni conjugado. La densidad óptica de las microplacas fue determinada en un lector de placas vertical Tecan modelo Spectra Rainbow (SLT) a 492 nm de longitud de onda.

ELISA DE COMPETICIÓN

Sensibilización de las microplacas.

Se preparó una solución stock de las proteínas antigénicas en el buffer indicado en cada caso. Las microplacas, se sensibilizaron con 0,1 µgr de dicha solución antigénica. Las microplacas (Nunc Maxisorb) fueron mantenidas durante toda la noche a 4 °C.

Desarrollo.

Las microplacas, una vez sensibilizadas se lavaron tres veces durante 2 minutos con 200 µl por fosa de PBS en presencia de Tween 20 al 0,05% v/v (PBS-Tween). Los sitios libres de cada fosa fueron bloqueados por el agregando 200 µl de solución de leche en polvo descremada (Molico) al 3% p/v en PBS-Tween. El bloqueo se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C. Se continuó con dos lavados, de 2 minutos cada uno, con PBS-Tween (200 µl/fosa). Posteriormente se cargaron en cada fosa 100 µl de las diluciones seriadas de las distintas fracciones proteicas ensayadas en buffer B o buffer borato 0,1M pH 10, en un rango de concentraciones de proteína desde los 0,8ngr/ml hasta 4×10^4 ngr/ml, valores determinados por el ensayo de Lowry previamente descrito. Posteriormente se mezclaron iguales volúmenes de las soluciones antigénicas con las del anticuerpo en una dilución de 1:100.000. Las mismas fueron incubadas toda la noche a 4° C en tubos plásticos. Transcurrido ese tiempo, a cada una de las fosas previamente sensibilizadas se les agregó 100 µl/fosa de cada una de estas mezclas y se las incubó durante 30 minutos a 37° C. Luego del lavado de las placas, se las incubó con la solución del anticuerpo conjugado en una dilución de 1:8000 a 37 °C durante 1 hora.

Posteriormente se las lavó con la solución de PBS-Tween, se desarrolló el color de la reacción de la misma manera que para el ELISA común, la reacción fue detenida y se midió la absorbancia a 492 nm en el mismo equipo que fuera utilizado con anterioridad.

ANÁLISIS DE REACTIVIDAD POR WESTERNBLOT.***Electrotransferencia.***

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en un equipo Transblot System de BIO-RAD (USA) de acuerdo a la técnica de Towbin y col. (1979). La transferencia se realizó a 70 V y 250 mA durante 60 minutos en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) con 20% de metanol. Luego del proceso de transferencia los geles fueron teñidos con Coomassie Blue R-250 para comprobar la eficiencia de la migración de las proteínas del gel, y las membranas de nitrocelulosa se colorearon con una solución de rojo Ponceau, para verificar la presencia de las proteínas en la misma.

• Revelado con cloronaftol.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fueron bloqueadas mediante una incubación de 12 horas a 4°C en leche en polvo suspendida al 2% p/v en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 27 mM (TBS). Una vez finalizada la incubación se procedió a lavar la membrana con buffer TBS en presencia de Tween 20 al 0,05% v/v (TBS-Tween 20). El procedimiento de lavado se repitió tres veces (2 minutos cada vez). Posteriormente se incubó dicha membrana durante 1 hora a 37 °C con una dilución del suero policlonal correspondiente en buffer TBS-Tween 20 (entre 1/5000 v/v y 1/1000 v/v de acuerdo a lo que se indique en las leyendas). Luego se realizó una serie de tres lavados con TBS-Tween 20, después de lo cual la nitrocelulosa se incubó con una dilución 1:1.000 de la solución de anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa (BIO-RAD) usada para los ensayos de ELISA. Nuevamente se lavó tres veces con TBS-Tween 20 y finalmente se reveló con la siguiente solución: 18 µl de agua oxigenada 30%, en presencia de 9 mg de 4-cloronaftol disueltos en 3 ml de metanol y 15 ml de TBS, que produce un precipitado marrón-grisáceo en el lugar donde se encuentra la peroxidasa. La imagen así obtenida fue digitalizada.

- **Revelado por quimioluminiscencia.**

Se siguió el mismo protocolo de electrotransferencia que para el western blot descrito anteriormente. El sistema de revelado por quimioluminiscencia se utilizó para observar la reactividad de proteínas que se encuentran en muy baja proporción.

Como primer paso, se procedió a la preparación de los reactivos necesarios para llevar a cabo el revelado y la fijación de las placas fotográficas. Los reactivos utilizados para tal fin fueron, revelador (Revelador Imation 3M RXL-6) y fijador (Fijador radiográfico manual XR. Laboratorio Bacon S.A.I.C.) los cuales deben ser diluidos en una proporción de 1/4. Es necesario aclarar que la solución stock de revelado fue almacenada a 4 °C, por lo que al momento del ensayo la misma debe encontrarse a temperatura ambiente. Ambas soluciones ya diluidas deben mantenerse en oscuridad.

Posteriormente, se prepararon dos soluciones stock: a) luminol 0,2 mg (Sigma Co.,St. Louis MO)/ 5 µl de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Co.,St. Louis MO) y b) ácido para-cumárico (Sigma Co.,St. Louis MO) en una concentración de 0,15 mg/ 10 µl de DMSO.

A partir de estas soluciones se prepararon dos buffers que fueron utilizados para el desarrollo del revelado. El primero de ellos (**Buffer 1**) contiene: 5 µl de luminol (**solución stock a**), 2,2 µl de ácido para-cumárico (**solución stock b**), 33 µl de buffer de separador para electroforesis en condiciones nativas (cuya composición fuera descrita anteriormente) y 470 µl de agua bidestilada. El segundo buffer (**Buffer 2**) contiene: 3,1 µl de H₂O₂ 30%, 33 µl de buffer de separador nativo para electroforesis y 470 µl de agua bidestilada. Ambos buffers se mantuvieron en oscuridad.

Una vez realizada la transferencia, se colocó la membrana entre dos superficies plásticas y se retiró el excedente de líquido con la ayuda de un papel. Los pasos subsiguientes fueron realizados en un cuarto de fotografía, bajo las mismas condiciones de iluminación que se utilizan para el revelado manual de fotos. Se mezclaron los **buffers 1 y 2** y se agregó 1 ml de mezcla a la membrana de nitrocelulosa tratando de cubrir toda la superficie de manera homogénea. Se dejó que dicha mezcla actuara por el lapso de 1 minuto, una señal positiva de reconocimiento (antígeno-anticuerpo) se pone manifiesto con la emisión de luminiscencia.

Posteriormente, se retiró el excedente de reactivo, con la ayuda de un papel absorbente se colocó a la membrana en un casete (Kodak Holder). Para la posterior exposición, se colocó una placa fotográfica sensible (Kodak, Scientific Imaging Film) en el

interior del casete y se la expuso por un lapso que puede ir desde los 30 segundos hasta 1 minuto de acuerdo a la intensidad de la señal emitida.

Pasado este tiempo la placa se colocó en una solución de revelado de fotografía hasta la aparición de la señal deseada. Finalmente la placa se pasó con la ayuda de unas agarraderas plásticas a una solución de fijación. Luego de 1 minuto se retiró la misma y se la enjuagó suavemente con agua tibia.

MICROSCOPIAS

MICROSCOPIA ÓPTICA DE SEMILLAS DE AMARANTO

Se partió de semillas con diferente grado de imbibición (control, 15 horas y 48 horas). Las mismas fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% y mantenidas a 4°C durante 2-3 horas en vacío. Posteriormente, las semillas fueron lavadas dos veces con buffer PBS, para eliminar el exceso de fijador. Luego se deshidrataron en forma secuencial con etanol al 30%, 50% y 70%dejándolas en esta última concentración por un lapso de tiempo más prolongado para finalmente pasarlas a etanol 100%. Todo el procedimiento fue realizado a 4° C. Luego de la deshidratación alcohólica se llevó a cabo la inclusión de las muestras en resina de London, conocida comercialmente como LR (London Resin, Fluka), con el agregado de un catalizador para favorecer la polimerización de la misma. La imbibición de la muestra en la resina se realizó en forma gradual utilizando concentraciones crecientes de resina en etanol 100% (30:70 y 50:50) y por último resina pura. La inclusión de las muestras se llevó a cabo en tubos beam para microscopía electrónica y se polimerizaron a 70 °C durante 14 horas en cada una de las condiciones mencionadas. Posteriormente, las muestras fueron cortadas en un ultramicrotomo con cuchillas de vidrio. Una vez cortadas las mismas fueron montadas en un portaobjetos para su posterior coloración con el Azul de toluidina, el cual fue fijado con calor. Todo este protocolo fue supervisado por la Dra. Silvana Petruccelli.

MICROSCOPIA ÓPTICA DE PREPARACIONES DE CUERPOS PROTEICOS

Las preparaciones de cuerpos proteicos (**CPc**) al igual que los sobrenadantes (**SNC**) fueron realizadas de la forma descripta anteriormente. Las muestras, según se describe en las leyendas, fueron o no coloreadas con el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 y fueron observadas en un microscopio marca Leica, modelo DMLB.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) DE SEMILLAS.

La preparación y observación de las muestras se realizó en el servicio de Microscopía Electrónica del CRIBABB (Bahía Blanca). Las mismas, fueron fijadas para su traslado en una solución de glutaraldehído al 2,5%. Una vez recibidas en el CRIBABB, fueron lavadas con buffer fosfato Sorensen 0,1 M pH 7,2 y se fijaron por segunda vez en tetróxido de osmio al 2% por espacio de 1 hora. Posteriormente, fueron deshidratadas en una serie de concentraciones crecientes de acetona desde 25% hasta alcanzar una concentración final de 100%. Se las infiltró en resina Spurr utilizando una concentración creciente de resina. La polimerización se realizó a 70 ° C en estufa durante toda una noche. Las secciones ultrafinas de la muestra se realizaron en un ultramicrotomo marca LKB con cuchilla de diamante. La observación de las mismas se realizó en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL 100CX II a 80 KV.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS Y PROGRAMAS UTILIZADOS.

Los resultados fueron analizados estadísticamente empleando el programa SYSTAT. Se efectuaron análisis de varianza (ANAVA) y la comparación de medias se efectuó con el Test de la menor diferencia significativa (LSD). Todos los ensayos descritos anteriormente fueron realizados por lo menos por triplicado, salvo en aquellos casos donde se indique lo contrario.

CAPÍTULO 1

*Ubicación y relación estructural entre las
proteínas de amaranto.*

Como paso previo al estudio de la participación de las distintas proteínas de amaranto, especialmente las de almacenamiento, en el proceso de germinación hemos realizado estudios tendientes a profundizar el conocimiento de sus características fisicoquímicas. Con ese propósito hemos llevado a cabo estudios inmunoquímicos de dichas proteínas y profundizado en la caracterización de la fracción albúminas y de las proteínas ubicadas en el interior de los cuerpos proteicos y fuera de ellos.

ESTUDIOS INMUNOQUÍMICOS.

Parte de esta caracterización proteica se realizó mediante ensayos inmunoquímicos. Los mismos se llevaron a cabo utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-globulina-p preparado en nuestro laboratorio por el Dr. Castellani (Castellani 2000) tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos.

El empleo de anticuerpos ha sido ampliamente utilizado como herramienta para caracterizar la estructura y conformación de diferentes superficies antigénicas (Plumb y col. 1994; 1995; Vasco-Méndez y col. 1995 y Marcone y col. 1998). Los anticuerpos policlonales son más sencillos de producir en comparación a los monoclonales, constituyendo una población heterogénea de anticuerpos que reconoce un gran número de determinantes antigénicos (Harlow y Lane 1998). Esta población heterogénea puede reconocer epítopes comunes entre la proteína antígeno y otras proteínas ensayadas. Cada uno de los epítopes reconocidos contiene normalmente un número limitado de aminoácidos (entre 6 y 20), que se presentan en forma continua o discontinua. Los epítopes antigénicos pueden ser de dos tipos: epítopes secuenciales, los cuales se encuentran formados por una secuencia determinada de aminoácidos en el contexto de la estructura primaria de la proteína y epítopes conformacionales, que dependen de la conformación que adopte esta secuencia en el espacio pudiendo reconocer diferentes aminoácidos de secuencias discontinuas. En algunos casos, la presencia de determinantes antigénicos puede depender de ambos tipos de epítopes (Hopp 1986; Harlow y Lane 1988). El reconocimiento entre antígeno-anticuerpo se produce siempre y cuando haya un grado adecuado de exposición y accesibilidad al sitio reconocido.

Los factores que aumentan las posibilidades de que un sitio antigénico se presente expuesto en la superficie son los mismos que afectan al plegamiento de las proteínas en general: grado de hidrofiliidad, movilidad y potencial para formar estructuras con giros β o "loops"

(Hopp 1986). En ensayos anteriores Castellani (2000), mostró la fuerte reactividad inmunoquímica de dos especies proteicas de la globulina-p (unidades estructurales y agregados) frente al antisuero utilizado. Al analizar la reactividad inmunoquímica por western blot en condiciones desnaturalizantes, de las distintas fracciones proteicas de amaranto, mostró que las proteínas reactivas al antisuero fueron las pertenecientes a las globulinas (globulina, globulina-p y glutelina). La mayor reactividad inmunoquímica la presentó el polipéptido de 56 kDa (p56), presente en diferente proporción en las tres fracciones, seguido de los polipéptidos ácidos (30 kDa) y por último de los básicos (20 kDa). La fracción albúminas, con un perfil electroforético diferente al resto de las fracciones mencionadas, no mostró reactividad frente al antisuero en las condiciones ensayadas (Castellani 2000). Estos resultados estarían indicando la existencia de homología de secuencia entre los polipéptidos de globulina, globulina-p y glutelina de amaranto.

En otra serie de ensayos inmunoquímicos realizados en idénticas condiciones, quedó demostrado que la globulina-p de amaranto presentaba homología con las proteínas de quinoa. En cambio, no se pudo establecer homología apreciable con el trigo, la soja y el girasol indicando que por lo menos con respecto a estas proteínas de reserva, la divergencia evolutiva es mayor (Castellani 2000).

Como una forma alternativa para caracterizar las proteínas, en este trabajo se estudió la posible homología inmunoquímica de superficie entre las distintas proteínas de amaranto y proteínas de reserva de otras especies.

Homología con proteínas de reserva de otras especies.

Como se mencionara con anterioridad, la presencia de epítopes reactivos en la superficie de una molécula se encuentra determinada por la naturaleza química de los aminoácidos que lo componen al igual que su disposición en el espacio Marcone y col. (1998), informaron acerca del alto grado de conservación de determinadas regiones inmunogénicas presentes en las superficies moleculares de globulinas de Mono y Dicotiledóneas, basándose en la existencia de una relación ancestral común entre ambas familias. Entre los ensayos realizados por estos autores se incluyó el estudio de homología de superficie existente entre la globulina de amaranto con globulinas de diferentes Mono y Dicotiledóneas. Sus resultados sugirieron que las globulinas de amaranto, a pesar de pertenecer a la familia de las Dicotiledóneas, presentarían mayor grado de homología con las globulinas de Monocotiledóneas (trigo, avena, maíz, cebada y centeno).

En base a lo informado por Marcone y col.(1998), y a los resultados obtenidos anteriormente por Castellani (2000) se decidió analizar las posibles similitudes secuenciales y conformacionales presentes en diferentes especies vegetales. Estos análisis, se llevaron a cabo mediante ELISA, utilizando una única dilución de anticuerpo (ver sección de Materiales y Métodos) los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Porcentaje de reactividad de globulinas de Mono y Dicotiledóneas.

Especies analizadas (Fracción globulina)	Porcentaje de reactividad
Amaranto	100
Trigo común	3,2 ± 0,6
Trigo sarraceno	3,4 ± 0,8
Soja	--
Quinoa	100 ± 3
Cebada	2 ± 1
Girasol	20 ± 4
Arroz	3 ± 1
Avena	16 ± 4

Suero policlonal anti-gp medido por ELISA.
 Dilución de suero utilizada: 1: 100.000 (v/v).

Se puede observar que las globulinas de quinoa, exhibieron una reactividad frente al antisuero equivalente a la globulina-p de amaranto, mientras que las globulinas de girasol y de avena mostraron porcentajes de homología menores. De acuerdo a la evidencia presentada la globulina de amaranto compartiría algunos epítopes con las globulinas de girasol y de avena, pero no con las globulinas de soja, trigo, trigo sarraceno, arroz y cebada

En contraposición a lo informado por Marcone y col. (1998), los resultados obtenidos indicaron que las globulinas de algunos cereales al igual que las de algunas Dicotiledóneas presentarían diferencias estructurales importantes con respecto a las globulinas de amaranto. Asimismo, se sugiere que no todas las globulinas de las Dicotiledóneas, a pesar de pertenecer a la

misma familia taxonómica, presentan superficies moleculares con homología al ser enfrentadas a un dado antisuero.

Estas diferencias se podrían ver reflejadas además en el comportamiento de estas fracciones durante la degradación de las reservas de las semillas durante la germinación.

Grado de homología superficial entre las fracciones de amaranto.

La homología superficial entre las fracciones proteicas se analizó mediante western-blot en condiciones nativas y ensayos de ELISA. Los perfiles resultantes se presentan en la **Figura 10**.

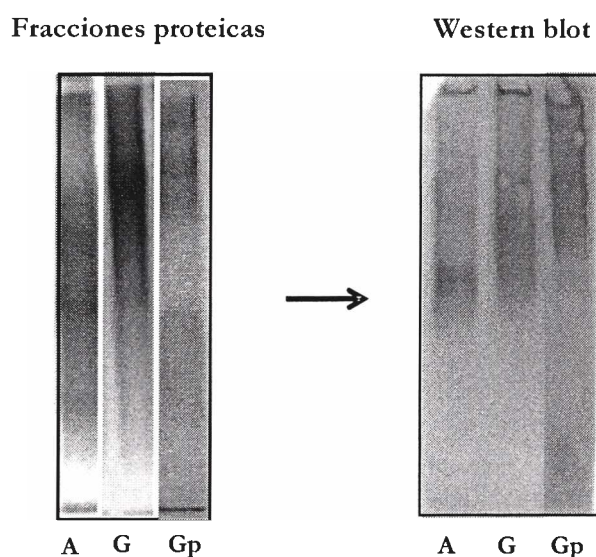


Figura 10: PAGE- nativo y western blot de las fracciones proteicas. **A:** Albúminas, **G:** globulina y **Gp:** globulina-p. Geles de acrilamida : 7%. Dilución de suero anti-gp: 1: 3000 (v/v). Tinción: Coomassie Brilliant Blue. Revelado de western blot con clonafitol.

Estos estudios mostraron la presencia de reactividad inmunoquímica en las fracciones albúminas, globulina y globulina-p. En condiciones nativas, la fracción albúminas se mostró reactiva, a diferencia de lo informado con anterioridad en condiciones desnaturizantes. Este hecho pone de manifiesto la existencia de cierto grado de homología entre las proteínas de las albúminas y las globulinas (globulina y globulina-p). La fracción glutelinas al encontrarse ya desnaturizada no fue analizada por PAGE-nativo, por tal motivo su estudio se realizó a partir del análisis de su superficie molecular por ELISA resultados que se discutirán seguidamente.

Se comparó el comportamiento inmunoquímico de las superficies moleculares de cada una de las fracciones proteicas (albúminas, globulina, globulina-p y glutelina) por medio de ELISA directo utilizando distintos solventes.

La naturaleza química de cada uno de ellos permite, en algunos casos, una mejor solubilización de las fracciones (buffer B y buffer borato), mientras que en otros actúan como agentes desnaturalizantes (borato con SDS y urea 9M). Estos últimos solventes, aumentan el grado de exposición de determinados epítopes ubicados en zonas más hidrofóbicas, como consecuencia de ello se produce una modificación la adhesión de cada fracción a las microplacas

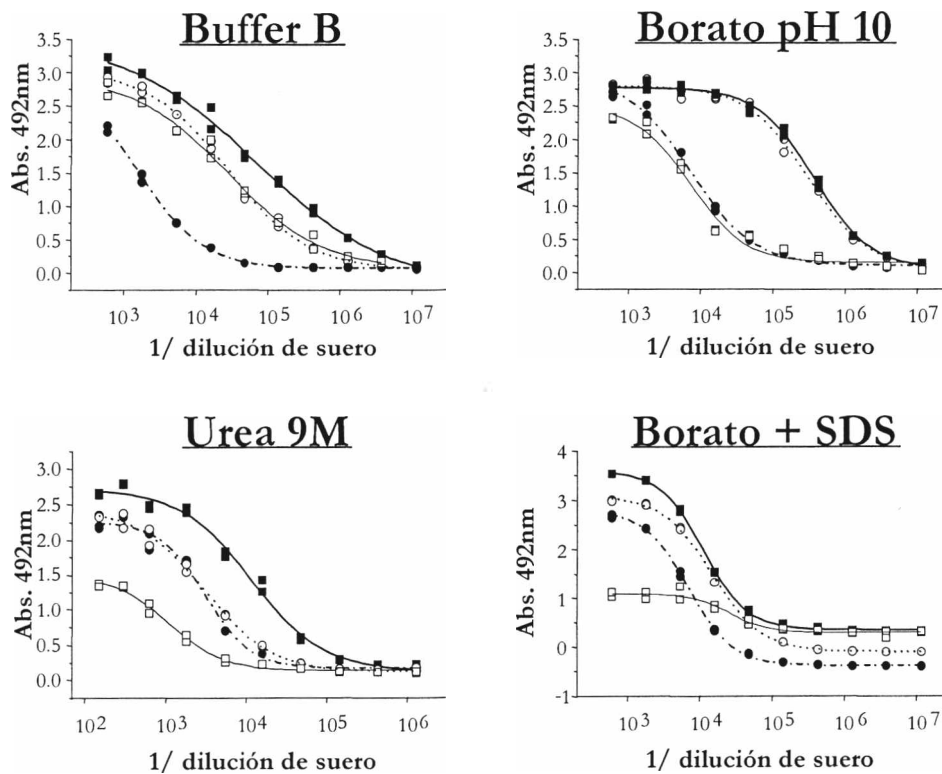


Figura 11: Curvas de titulación realizadas con el suero anti-gp utilizando a las distintas fracciones proteicas como antígenos. □: albúminas, ○: globulina, ■: globulina-p y ●: glutelinas. **Buffer B:** antígenos disueltos en buffer B. **Borato pH 10:** antígenos disueltos en buffer borato 0,1 M pH 10, **Urea 9M:** antígenos disueltos en urea 9M y **Borato + SDS:** antígenos disueltos en buffer borato 0,1 M pH 10 con 1% de SDS.

de acuerdo al tipo de solvente utilizado. Las curvas de titulación y los valores de título obtenidos para las fracciones proteicas en cada una de las condiciones ensayadas se muestran en la **Figura 11** y en la **Tabla 5** respectivamente.

La fracción globulina-p disuelta en buffer B muestra una reactividad inmunoquímica más elevada que el resto de las fracciones. Esto podría deberse ya sea a diferencias entre las superficies moleculares de las proteínas o bien que, tanto la globulina como la glutelina, con una

baja solubilidad en buffer B, se encuentren en un estado de mayor agregación (Barba de la Rosa y col. 1992, Abugoch y col. 2003).

Tabla 5: Títulos obtenidos para las diferentes fracciones proteicas disueltas en distintos medios (promedio \pm DS).

Fracciones	Buffer B	Borato pH 10	Borato-SDS	Urea 9M
Albúmina	$3,8 \pm 0,1 \times 10^4$ (d)	$9,3 \pm 0,1 \times 10^3$ (a,b,c)	$3 \pm 2 \times 10^3$ (a,b,c)	$3 \pm 2 \times 10^3$ (a)
Globulina	$3,3 \pm 0,1 \times 10^4$ (d)	$3,2 \pm 0,1 \times 10^5$ (f)	$1,4 \pm 0,1 \times 10^4$ (c)	$6 \pm 3 \times 10^3$ (a,b,c)
Globulina-p	$1,1 \pm 0,5 \times 10^5$ (e)	$4,3 \pm 0,1 \times 10^5$ (g)	$1,3 \pm 0,2 \times 10^4$ (b,c)	$1,2 \pm 0,2 \times 10^4$ (a,b,c)
Glutelina	$3,2 \pm 0,3 \times 10^3$ (a)	$8,9 \pm 0,5 \times 10^3$ (a,b,c)	$7,1 \pm 0,2 \times 10^3$ (a,b,c)	$5 \pm 2 \times 10^3$ (a,b)

La diferencia en las letras (a-f) en cada una de las fracciones de acuerdo a los diferentes tratamientos utilizados ponen de manifiesto las diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Se podría pensar que en este último caso no todos los epítops reactivos se encuentran expuestos al antisuero al momento de realizar el ensayo. A pesar de la baja solubilidad, en ambos casos, la cantidad de proteína soluble fue suficiente como para poder sensibilizar las microplacas. La fracción albúminas mostró reactividad con valores de título que se ubicaron por debajo de los valores alcanzados por la globulina-p. En buffer B, los valores de título obtenido para la fracción albúminas fueron similares a los de la globulina. Estos resultados no fueron coincidentes con los obtenidos para el western blot bajo condiciones desnaturalizantes realizados con anterioridad en el laboratorio Castellani (2000), ratificando lo obtenido por PAGE-nativo. La fracción globulina al igual que las glutelinas, incrementan su solubilidad en buffer borato pH 10, con lo cual no resultaría extraño que los valores de título se vean aumentados (**Tabla 5**, Globulina buffer borato). En estas condiciones, se encontraron valores de título similares entre las fracciones globulina-p y globulina (**Tabla 5**, Globulina y Globulina-p buffer borato). Las albúminas y las glutelinas, en este medio presentaron valores 10 veces menores a los encontrados para globulina y globulina-p (**Tabla 5**, Albúmina y Glutelina buffer borato). El título de la globulina en buffer borato pH 10; fue 10 veces más alto (**Tabla 5**, Globulina buffer borato) que el obtenido en buffer B (**Tabla 5**, Globulina buffer B); mientras que el título de las albúminas fue menor en buffer borato (**Tabla 5**, Albúmina buffer borato) que en buffer B (**Tabla 5**, Albúmina buffer B). Como se dijera anteriormente, la presencia de una mayor cantidad de especies proteicas

agregadas de la fracción globulina, en buffer B, explicaría los valores de título menores encontrados en este medio.

Estos agregados podrían presentar menor número de sitios reactivos cuando la globulina se encuentra embebida en las placas. El comportamiento de las albúminas, podría estar asociado a la pérdida de epítopes conformacionales. Para corroborar las afirmaciones antedichas, se realizó el mismo ensayo en presencia de agentes que actúan como desnaturizantes. Los títulos obtenidos para la globulina-p y la globulina disminuyeron mientras que el de las glutelinas no mostró diferencias en ninguna de las condiciones ensayadas. (**Tabla 5**, Globulina, Globulina-p y Glutelinas, buffer borato con SDS y urea 9M). En cuanto a la reactividad de la fracción albúminas se vió disminuía en los medios desnaturizantes.

En base a estos resultados se puede concluir que tanto la globulina-p como la globulina presentan gran cantidad de determinantes antigénicos en su superficie molecular detectados por el antisuero policlonal. Las diferencias más significativas entre estas fracciones proteicas estarían condicionadas a la estructura tridimensional de cada una de ellas. Más aún, considerando únicamente el efecto del desplegado proteico causado por el SDS y la urea, la reactividad de ambas globulinas dependería mayoritariamente de su estructura, mientras que en el caso de las glutelinas la reactividad estaría relacionada con su secuencia. El comportamiento de la fracción albúminas fue opuesto al observado para las glutelinas, y similar al de las globulinas por consiguiente podría ser explicado asumiendo la presencia de epítopes conformacionales en esta fracción.

Se realizaron diferentes ensayos de ELISA de competición de manera de poder determinar la fuerza relativa de unión al anticuerpo que presentan las diferentes proteínas en solución. Las fracciones proteicas fueron disueltas en buffer B (**Figura 12**). Los resultados presentados en la figura, mostraron que tanto la globulina-p como la globulina se comportan como buenos competidores, mientras que la fracción albúminas a pesar de competir con el resto de las fracciones, no desplazó fácilmente al anticuerpo. La glutelina soluble fue incapaz de competir con la globulina-p y con la globulina, y sólo compitió parcialmente con las albúminas. Las glutelinas, además, pueden ser desplazadas por el resto de las fracciones. Este comportamiento puede ser atribuido al hecho de que las glutelinas, que son muy poco solubles en buffer B, pueden presentarse como agregados sin epítopes reactivos en solución y/o al hecho de que los anticuerpos presenten muy baja afinidad por los epítopes de las glutelinas. Dado que

en buffer borato pH 10, las glutelinas son más solubles se realizó un ensayo de competición con las proteínas disueltas en este medio.

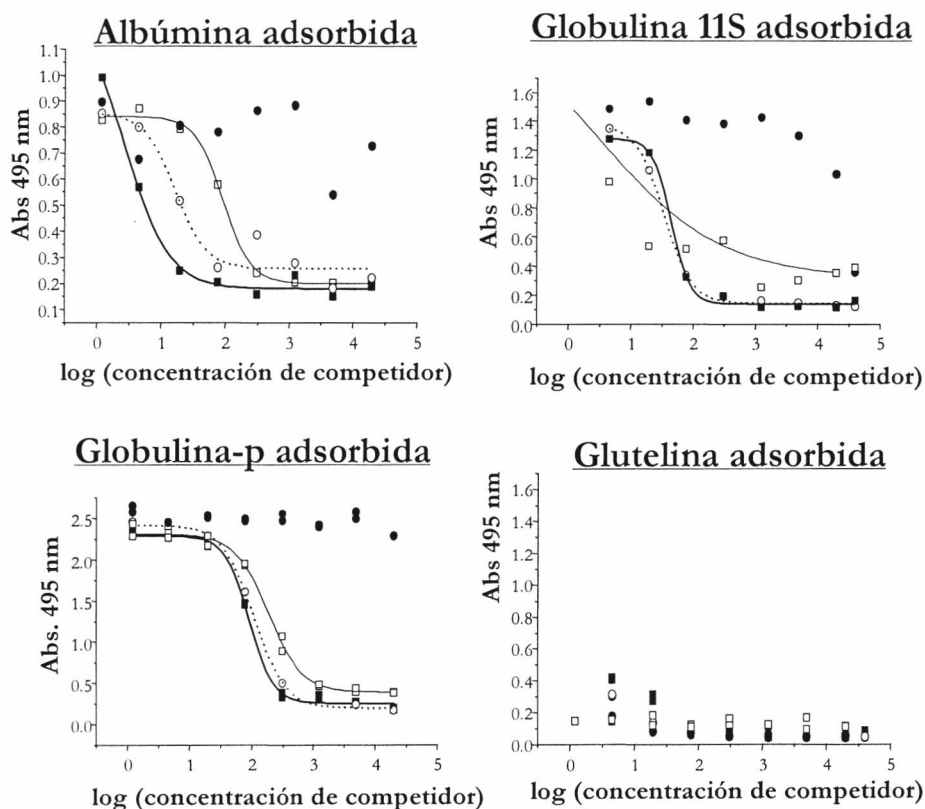


Figura 12: Curvas de titulación de las fracciones proteicas obtenidas mediante ELISA de competición. Competidores utilizados: □ : Albúminas, ○ : Globulina, ■ : Globulina-p y ● : Glutelinas, Proteínas adsorbidas A : albúminas, G : globulina, Gp : globulina-p y Gt : glutelina. Dilución de suero anti-gp: 1: 100.000 (v/v).

En la **Figura 13**, se muestran los resultados de competición de glutelinas y globulina-p contra globulina-p adsorbida. Los mismos evidenciaron que la fracción glutelinas es un mal competidor, aún en presencia de buffer borato.

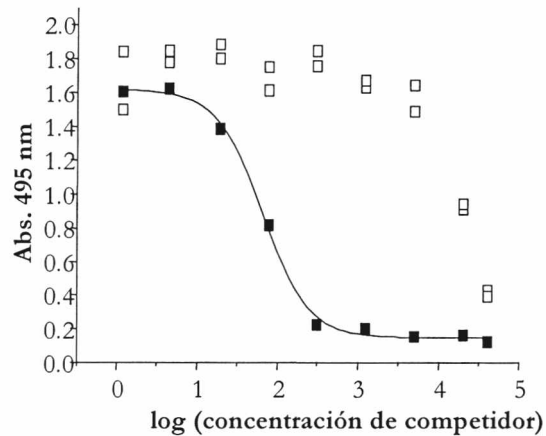


Figura 13 Curvas de titulación obtenidas utilizando un suero anti-gp mediante ELISA de competencia. Competidores utilizados: □ glutelinas y ■: globulina-p. Proteína adsorbida: Gp: globulina-p, Dilución de suero anti-gp: 1: 100.000 (v/v). La preparación de globulina-p fue disuelta en buffer borato pH 10.

Ensayos de hidrólisis enzimática de la globulina-p.

La globulina-p junto con el resto de las globulinas, al ser proteínas de reserva conforman el aporte primordial de aminoácidos durante la germinación. El estudio de los productos generados durante la hidrólisis parcial *in vitro* nos permitiría tener una idea preliminar acerca de los cambios que sufren sus polipéptidos durante la germinación. Considerando la elevada reactividad que presenta el polipéptido p56 frente al suero policlonal anti-gp y su susceptibilidad a la acción de las proteasas (Castellani y col, 2000), se llevó a cabo la hidrólisis *in vitro* de la globulina-p en función del tiempo. Para este fin se utilizaron dos proteasas: papaína y tripsina. El empleo de una proteasa perteneciente a la familia de las cisteín proteasas como es la papaína, permite simular las condiciones presentes durante la germinación *in vivo*. Las hidrólisis se realizaron en condiciones controladas (tiempos cortos) en buffer B, condiciones en que la proteína presenta mayor solubilidad. La formación de posibles productos de hidrólisis reactivos frente al anticuerpo fueron estudiados mediante western blot. (**Figura 14**)

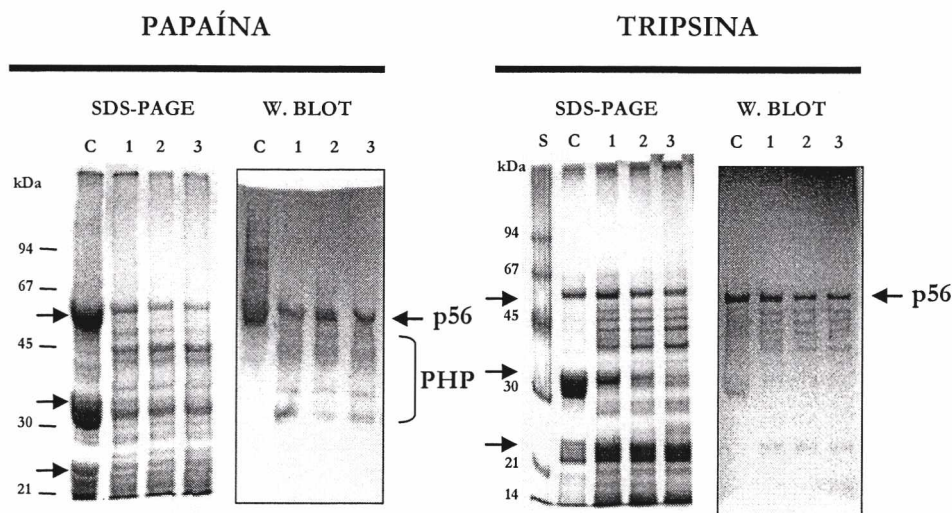


Figura 14: SDS-PAGE + ME y western blot de la globulina-p hidrolizada con papaína y con tripsina: Dilución de suero anti-gp: 1:3000 (v/v) **Tripsina:** S: proteínas estándar, C: globulina-p sin hidrolizar, 1: globulina-p hidrolizada durante 5 minutos, 2: globulina-p hidrolizada durante 30 minutos, 3: globulina-p hidrolizada durante 120 minutos. Para los ensayos con **papaína** se utilizó idéntica nomenclatura. **PHP:** productos de hidrólisis provenientes del tratamiento con papaína. Tinción: Coomassie Brilliant Blue. Revelado de western blot con cloronaftol.

En ella se puede observar que la globulina-p control (**Figura 14** calle C), contiene al polipéptido p56 y a los polipéptidos ácidos y básicos, señalados con flecha al costado izquierdo de los perfiles. También están presentes en el perfil del control utilizado en la hidrólisis con papaína, agregados de alto peso molecular estabilizados por enlaces disulfuro (Martínez y col. 1997) que no han sido totalmente reducidos por el 2-mercaptoetanol y cuya presencia se evidencia en el western blot (**Figura 14**; western blot, tratamiento con papaína).

Los perfiles correspondientes a las incubaciones realizadas con papaína mostraron la disminución del polipéptido de 56 kDa, p56, y de 30 kDa, polipéptido ácido (A) así como la aparición de péptidos con una masa molecular entre los 30-56 kDa (**Figura 14**, marcado como **PHP**). La reactividad inmunoquímica de estos productos de hidrólisis frente al anticuerpo, se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que probablemente una gran proporción de los productos de hidrólisis reactivos provengan de la disociación de los agregados de alta masa molecular y la ruptura del p56. El perfil

correspondiente a los productos formados, no presentó modificaciones significativas en el transcurso del ensayo, como así tampoco en la intensidad de reconocimiento entre el antígeno y el anticuerpo. A lo largo del ensayo realizado no se observó la aparición de polipéptidos reactivos de menos de 30 kDa.

El tratamiento enzimático realizado con tripsina durante los primeros cinco minutos mostró la aparición de cuatro bandas con un peso molecular entre 40 y 50 kDa como se puede observar en los perfiles electroforéticos de la **Figura 14**. Estos productos de hidrólisis formados, presentaron una reactividad muy débil frente al suero anti-gp y provendrían probablemente de la degradación del polipéptido de 56 kDa (**p56**; señalado en la Figura). Al igual que para el caso de la papaína la reactividad del p56 se mantuvo constante a lo largo de todo el ensayo. No se evidenció la aparición de agregados de alta masa molecular con reactividad inmunoquímica probablemente debido a una reducción completa de todos los enlaces disulfuro. La intensidad de las bandas de los polipéptidos de 30 kDa, disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de exposición a la enzima, paralelamente a la aparición de productos de hidrólisis de masa molecular menor a los 30 kDa (**Figura 14**). Estos resultados no nos permitieron discernir si los productos detectados provienen de la hidrólisis del p56 o de los polipéptidos ácidos. Durante el transcurso de la hidrólisis, se produjo la desaparición de la reactividad de los polipéptidos de 30 kDa. En el SDS-PAGE, los polipéptidos de 20 kDa (**B**) mostraron un aumento en su concentración junto con la aparición de productos de muy bajo peso molecular. En el western blot, los polipéptidos B de la fracción control no presentaron reactividad inmunoquímica. Sin embargo, las fracciones hidrolizadas mostraron una tenue reactividad inmunoquímica de estos polipéptidos. Estos resultados podrían explicarse considerando que durante el tratamiento enzimático se generan especies reactivas provenientes de la hidrólisis de los polipéptidos de mayor masa molecular.

En ambos tratamientos enzimáticos, se hizo difícil de estimar si la banda de 30 kDa es un polipéptido **A** sin hidrolizar o si se trata de un producto de hidrólisis del p56. Los perfiles obtenidos en los tratamientos con tripsina indicaron que el polipéptido **A** es más susceptible a la acción enzimática que el p56.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FRACCIÓN ALBÚMINAS.

Hemos visto que algunas proteínas de la fracción albúminas presentan características superficiales similares a las globulinas de almacenamiento. Como se mencionara en la Introducción la fracción albúminas comprende, en su mayor parte, a proteínas con variada

función enzimática. Algunas de estas proteínas podrían desempeñar funciones tipo “house keeping” en los distintos procesos metabólicos. En el amaranto, donde las albúminas representan un alto porcentaje de las proteínas totales la información existente es algo contradictoria. Algunos investigadores indican que esta fracción está constituida por una variedad de componentes con diferentes características estructurales (Segura-Nieto y col., 1994); en tanto que otros han identificado un componente mayoritario (Marcone y col., 1994 a). Teniendo en consideración lo expuesto y como paso previo al estudio de la participación de las distintas fracciones proteicas en el proceso de germinación, se realizaron distintos análisis con el objeto de obtener mayor información acerca la fracción albúminas. Los resultados obtenidos mediante análisis electroforéticos se muestran en las **Figura 15 A y B**.

Los perfiles electroforéticos obtenidos en condiciones desnaturalizantes con y sin tratamiento reductor presentados en la **Figura 15A**, mostraron gran similitud entre sí. Como ya fuera informado (Segura-Nieto y col. 1994; Marcone y col. 1994 a y Martínez y col. 1997) la fracción albúminas, a excepción de los agregados, estaría constituida en su mayor parte por proteínas monoméricas. La presencia de estos agregados podría deberse a dos razones, que sean agregados propios de las albúminas (**APA**) o bien que se trate de una contaminación de naturaleza globulínica (**PAPM**). El perfil electroforético realizado en condiciones no reductoras, mostró la presencia de agregados proteicos que están ausentes en condiciones reductoras. Estos agregados por lo tanto podrían estar estabilizados por puentes disulfuro, razón por la cual se los considera integrantes de la fracción globulinas (**PAPM**). Por otro lado también se observaron polipéptidos de alta masa molecular en condiciones reductoras los cuales no se corresponden con polipéptidos de globulinas por lo que se consideran pertenecientes a la fracción albúminas (**APA**). Al igual que Segura-Nieto y col. (1994), se observaron polipéptidos de variado peso molecular que fueron identificados con un número romano en mayúscula, algunos de los cuales se asignaron a proteínas ya descritas como las lectinas (**III, IV y V**) y al grupo de proteínas de muy bajo peso molecular entre ellas: las proteínas ricas en metionina y los inhibidores de proteasas. El perfil electroforético de las albúminas realizado en condiciones nativas, que se muestra en la **Figura 15B**, permitió la separación de siete especies proteicas con diferente movilidad, identificadas mediante letras mayúsculas (**A hasta H**) siendo las especies proteicas **A, C, D y F** las más abundantes.

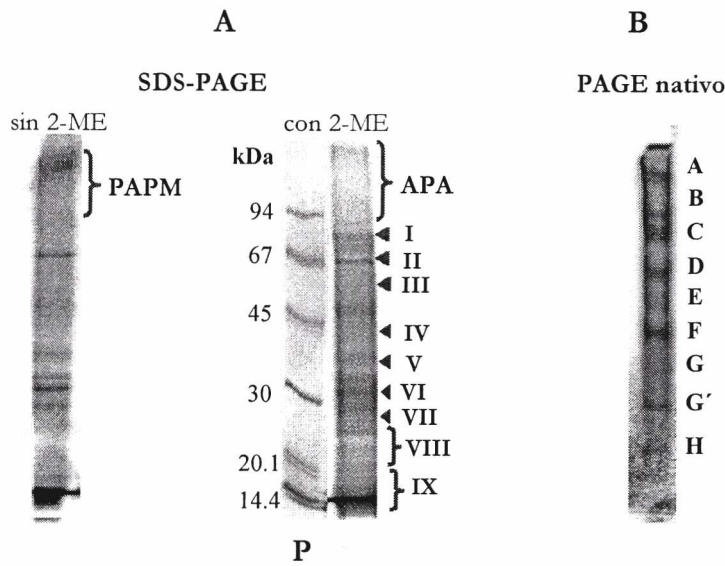
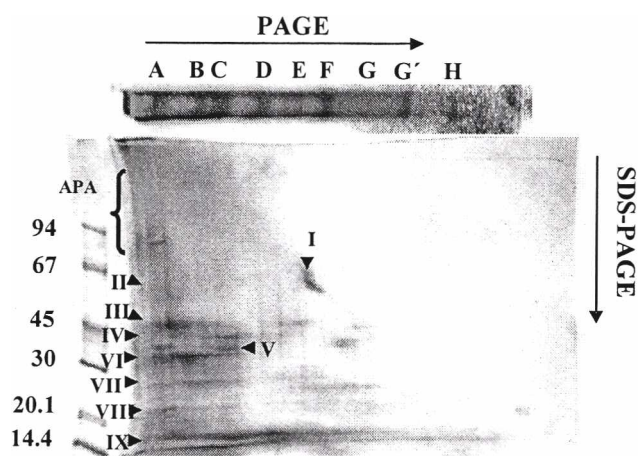


Figura 15: A. SDS-PAGE sin y con tratamiento reductor. P: patrón de peso molecular. PAMP: polipéptidos de alta masa molecular. APA: agregados propios de la albúmina PM > 70 kDa; I. 67-70 kDa; II. 52-54 kDa; III. lectina de 45 kDa*; IV. 37-38 kDa; V. lectina de 32 kDa*; VI. lectina de 30 kDa*; VII. 27 kDa; VIII. Péptidos entre 20,1-26 kDa y IX. Polipéptidos < a 20 kDa. * Segura-Nieto y col. (1994). B. PAGE-nativo, las diferentes especies proteicas fueron identificadas mediante letras (A-H). Tinción: Coomasie Brilliant Blue.

Para determinar la composición polipeptídica de las proteínas separadas mediante PAGE-nativo se llevó a cabo una electroforesis bidimensional. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 16**. En ella se puede observar que muchas de las proteínas que conforman la fracción albúminas presentan una gran variedad de polipéptidos. Para un mejor análisis los resultados obtenidos se esquematizan en el cuadro contiguo a la figura. Se puede observar la presencia de una mayor proporción de polipéptidos de masa molecular menor a los 45 kDa, presentes en casi la totalidad de las especies identificadas. Entre ellas se encuentra incluida una subunidad de 12 kDa como informara Marcone y col. (1994 a), pero la misma no sería ni la única ni la más abundante. Las bandas que contienen mayor variedad de polipéptidos son las A, B y C. La proteína D está formada casi exclusivamente por polipéptidos de masa molecular inferior a 20 kDa y la banda F, posee como componente mayoritario el polipéptido I (67-70 kDa). Las especies identificadas con las letras E y G se corresponderían con las lectinas.



	A	B	C	D	E	F	G	G'	H
APA > 70 kDa	X	--	--	--	--	--	--	--	--
I. 67 - 70 kDa	--	--	--	--	--	X	--	--	--
II. 52-54 kDa	--	--	--	--	--	--	--	--	--
III. 45 kDa	X	X	--	--	X	--	--	--	--
IV. 37 kDa	--	X	X	--	--	--	--	--	--
V. 32 kDa	X	--	X	--	--	--	X	--	--
VI. 30 kDa	XX	X	--	--	--	--	--	--	--
VII. 27 kDa	--	--	--	--	--	--	X	--	--
VIII. 20,1-26 kDa	X	--	--	--	--	--	--	--	--
IX. < 20 kDa	X	XX	XX	XX	XX	--	X	--	--

Figura 16: Electroforesis bidimensional de las fracción albúminas y cuadro de abundancia relativa de los polipéptidos que componen dicha fracción. 1ª dimensión: PAGE-nativo (geles en gradiente de acrilamida 7-14%); 2ª dimensión: SDS-PAGE (geles en gradiente de acrilamida 7-20%). Tinción : Coomassie Brilliant Blue.

Considerando los resultados presentados en la sección anterior, que mostraron que proteínas de la fracción albúminas tenían superficies reactivas al antisuero anti-globulina-p, se intentó identificar las especies con reactividad cruzada con globulina-p mediante western-blot de las proteínas separadas mediante electroforesis en condiciones nativas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**.

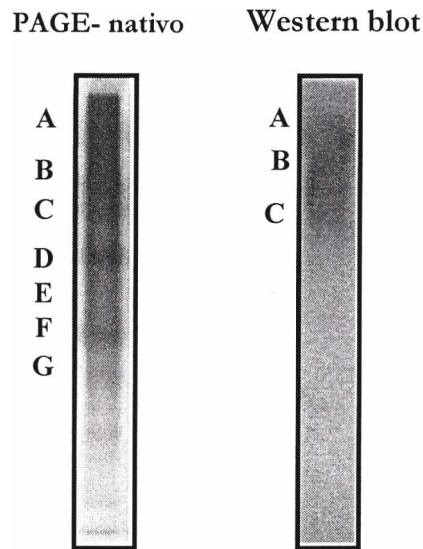


Figura 17: PAGE- nativo y western blot de la fracción albúminas. Geles de acrilamida: 12%. Tinción: Coomassie Brilliant Blue. Dilución de suero anti-gp: 1: 3000 (v/v). Revelado por cloronaftol.

Estos perfiles presentan una distribución de sus proteínas algo diferente a la mostrada en la **Figura 15** debido a la diferente concentración de acrilamida utilizada. Los resultados obtenidos por western blot muestran que las especies reactivas serían aquellas que mostraron una menor movilidad electroforética, éstas se corresponderían con las bandas **A**, **B** y **C** cuya composición polipeptídica se mostró anteriormente. Los estudios de caracterización de las albúminas se continuaron mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando columnas de diferente rango de separación. Es necesario señalar que los valores informados de peso molecular en ambos métodos cromatográficos son estimativos ya que estas proteínas interactúan con los rellenos comúnmente utilizados para su separación cromatográfica, hecho coincidente con los datos encontrados por Sathe y col. (2002b) en la separación de albúminas de almendra (*Prunus dulcis* L.). Los perfiles cromatográficos obtenidos se presentan en las **Figuras 18** y **19** respectivamente.

En el caso de la cromatografía realizada con la columna de mayor tamaño de poro (**Figura 18**) la mayor parte de la proteína eluyó a volúmenes altos, cercanos al límite de exclusión (**pBPM**), con valores de masas moleculares menores a los 60 kDa. En menor proporción también se pudo comprobar la aparición de una población de especies de elevada masa molecular (200-600 kDa, **pAPM**) entre las cuales se podrían encontrar proteínas contaminantes de

naturaleza globulínica. La presencia mayoritaria de moléculas de baja masa molecular nos condujo a la utilización de otra columna de menor tamaño de

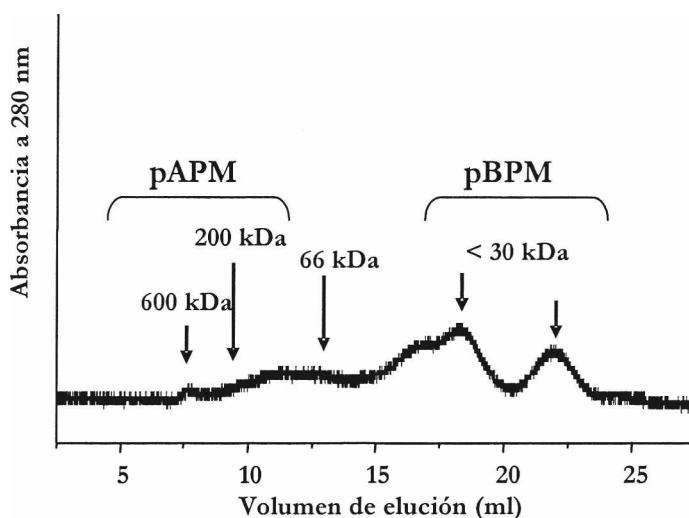


Figura 18: Cromatografía de exclusión molecular de la fracción albúminas (relleno de columna, Sephacryl S-300. Rango de exclusión: 1×10^4 - $1,5 \times 10^6$). Los pesos moleculares indicados corresponden a los patrones de calibración (Materiales y Métodos). **pAPM:** proteínas de alta masa molecular, **pBPM:** proteínas de baja masa molecular.

poro (Superdex-75; rango: 3000-70.000 Da) para una mejor resolución de este tipo de especies. Se realizó además un SDS-PAGE de manera de poder analizar la composición polipeptídica de esta fracción. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 19**, en la que se informan los valores de peso molecular calculados (Materiales y Métodos).

El perfil cromatográfico de la **Figura 19**, presentó una gran cantidad de picos (indicados en la **Figura 19**, con números romanos en rojo) varios de ellos correspondientes a especies de muy baja masa molecular (**pMBPM**). El análisis por SDS-PAGE de las proteínas de mayor tamaño incluidas en el volumen muerto (Pico **i**), indicó que las mismas estarían integradas por polipéptidos de tamaño superior a 20 kDa (**Figura 19 B**, calle 1). Las proteínas de los Picos **iv** y **v** estarían integradas por polipéptidos de menos de 20 kDa (**Figura 19**, calles 4 y 5).

Los análisis cromatográficos muestran que la fracción albúminas estaría formada en gran proporción por especies proteicas de baja y muy baja masa molecular (indicados en la **Figura 19**, **pBPM** y **pMBPM**), estando presente en menor proporción, proteínas de masa molecular entre los 200-600 kDa (indicados en la **Figura 19**, **pAPM**). Estas especies podrían corresponderse con contaminantes de naturaleza globulínica anteriormente mencionados.

Comparando los resultados obtenidos mediante la electroforesis nativa y la cromatografía de exclusión molecular se puede concluir que la técnica electroforética ha permitido una mejor separación de las albúminas de mayor complejidad polipeptídica. A

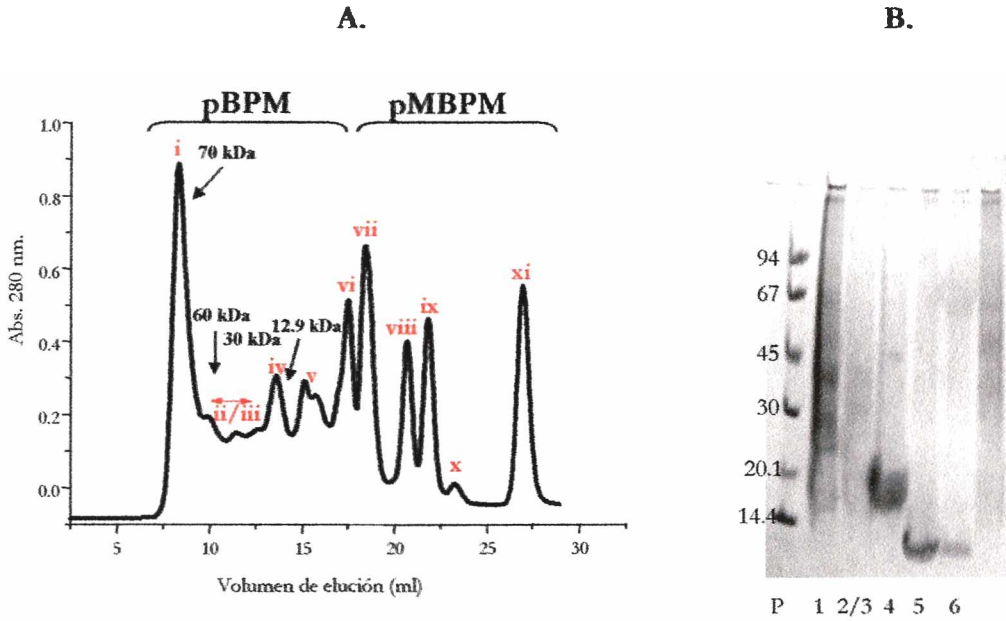


Figura 19: Cromatografía de exclusión molecular de albúminas y electroforesis provenientes de la cromatografía. **A.** Cromatografía de exclusión molecular (Superdex-75), elución con buffer A. Los pesos moleculares indicados corresponden a los patrones de calibración. **pBPM:** proteínas de baja masa molecular. **pMBPM:** proteínas de muy baja masa molecular. **B.** SDS-PAGE de fracciones colectadas en la cromatografía y precipitadas con tricloroacético. Calle 1: Pico **i**, Calle 2/3: Pico **ii/iii**, Calle 4: Pico **iv**, Calle 5: Pico **v** y Calle 6: Pico **vi**. Geles de acrilamida al 12%. Tinción: Coomassie Brilliant Blue.

partir de estos resultados se proyectó la realización de una cromatografía de intercambio iónico que se presenta en la **Figura 20**.

El análisis del perfil cromatográfico obtenido, permitió la identificación de nueve picos (indicados en la **Figura 20** por letras minúsculas **a, b, c, d** y **f-k**) y dos hombros no resueltos (**c** y **e**). El primer pico (señalado con la letra **a** en la figura), corresponde a especies cargadas positivamente que no fueron retenidas por la columna. El resto de las proteínas separadas, con diferente carga no pudieron ser detectadas en los análisis por SDS-PAGE dada la baja cantidad de proteína presente.

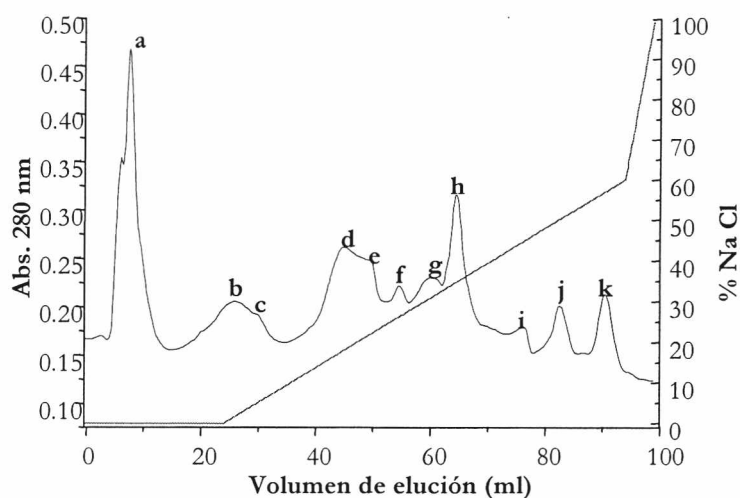


Figura 20: Cromatografía de intercambio aniónico de la fracción albúminas. Columna utilizada: Hi-Trap (Q-Sephrose HP). Buffer dietanolamina pH 9. Elución con gradiente: NaCl 0-60% en buffer dietanolamina.

Finalmente, se caracterizaron los polipéptidos de la fracción albúminas mediante electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque-SDS-PAGE en condiciones reductoras presentadas en la **Figura 21**. Los resultados obtenidos ponen nuevamente de manifiesto la gran diversidad de especies polipeptídicas presentes en esta fracción con masas moleculares que oscilan entre los 90-14 kDa. Este ensayo, nos permitió individualizar más de 80 especies polipeptídicas diferentes (señaladas con números consecutivos a igualdad de masa molecular en la **Figura 21**).

Es importante señalar que para la identificación de las mismas se utilizaron en forma conjunta los resultados obtenidos a partir de colorear los geles en forma sucesiva con dos técnicas de diferente grado de sensibilidad. (Coomasie Brilliant Blue; gel a y tinción con plata; geles b y c de la figura). Con la finalidad de facilitar el análisis, y como se puede observar en la figura se fueron identificando las manchas de acuerdo a diferentes intervalos de masas moleculares. A partir de esta clasificación se delimitaron tres grupos: ① polipéptidos con masas moleculares entre los 67 y 45 kDa identificados en el gel a, ② polipéptidos con valores de masa molecular menor a los 45 kDa y mayor a los 20,1 kDa, señalados en el gel b y ③ polipéptidos con masas moleculares menores o iguales a los 20 kDa, identificados en el gel c. En una primera evaluación de los resultados obtenidos, se pudo constatar que la mayor parte de los polipéptidos

se ubicaron entre los pHs 5,0 y 8,0. Como se había observado anteriormente, se corroboró la presencia de un grupo de polipéptidos de elevado peso molecular (identificados en el gel a como **APA** y delimitados mediante una elipse en color negro) con masas moleculares por encima de los 67 kDa. Este grupo de polipéptidos se ubicó en una zona con características levemente ácidas. Debido a los elevados valores de peso molecular de estos polipéptidos los mismos no fueron incluidos en ninguno de los grupos mencionados anteriormente.

La identificación de los polipéptidos que pertenecen al primer intervalo, mostró que la mayor parte de ellos se encuentran en el rango de pH levemente ácido a los cuales se les adjudicó la siguiente numeración: **1 a 5** (67 kDa), **8 a 14** (aproximadamente 56 kDa), **19 y 20** y del **24 al 26** (con masas moleculares aproximadas de 45 kDa). Sólo tres polipéptidos se ubicaron en una zona de pH más ácida que el resto, los mismos son: el **1** y el **2** con una masa molecular aproximada de 67 kDa y el péptido número **11** con una masa algo mayor a los 45 kDa. Aquellos que se ubicaron en regiones de pH levemente alcalino fueron los péptidos: **6 y 7** (67 kDa), **15 a 18 y 21 a 23** (aproximadamente de 56 kDa) y el **27** (45 kDa).

El segundo grupo, indicado en el gel b, al cual pertenecen los polipéptidos con masas moleculares entre los 45 y 20,1 kDa se ubicaron en el rango de pH 5,0 – 8,0. No se registraron especies en zonas de mayor acidez. Los polipéptidos **28 a 33** (30 kDa), **41 a 43, 49 y 50** (menor a los 30 kDa) se ubicaron en la zona ligeramente ácida, mientras que los identificados como **34 a 39** (30 kDa), **44 a 46, 47, 48 y 51** (con valores de masa molecular menor a los 30 kDa) se ubicaron en la región más próxima a la neutralidad. El único polipéptido que evidenció mayor carácter alcalino fue el número **40** (con una masa de alrededor de 30 kDa) .

Los resultados obtenidos para el último grupo de polipéptidos con masas moleculares de 20,1 kDa o menores, gel c, presentaron una mayor diversidad en especies proteicas. En coincidencia con el resto de los grupos, el grueso de los mismos presentó valores de pI cercanos a la neutralidad. Los polipéptidos con valores de pI levemente ácidos fueron los que recibieron la siguiente numeración: **53 a 58, 67 a 71, 79 a 81, 83 a 86 y 88 a 91** (con masas moleculares de aproximadamente 20 kDa). Aquellos con números: **59 a 63** (con masas moleculares de aproximadamente 20 kDa), **72 a 77, 82, 87 y 92** (masas menores a los 20 kDa) se ubicaron en regiones próximas a la neutralidad. Por último, los polipéptidos con mayor carácter alcalino fueron los identificados con los números: **52, 63 a 66** (de aproximadamente 20 kDa) y el **78** (menor 20 kDa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los resultados expuestos con anterioridad se podría sugerir que aquellos polipéptidos con valores de pI alcalinos fueron los que presentaron menores masas moleculares (péptidos 52, 65, 66 y 78; señalados en la **Figura 21** con línea punteada en blanco) mientras los que tuvieron valores de pI más ácidos mostraron masas moleculares más elevadas, alrededor de los 67 kDa identificados con una línea llena en gris oscuro en la figura (péptidos 1, 2 y 11).

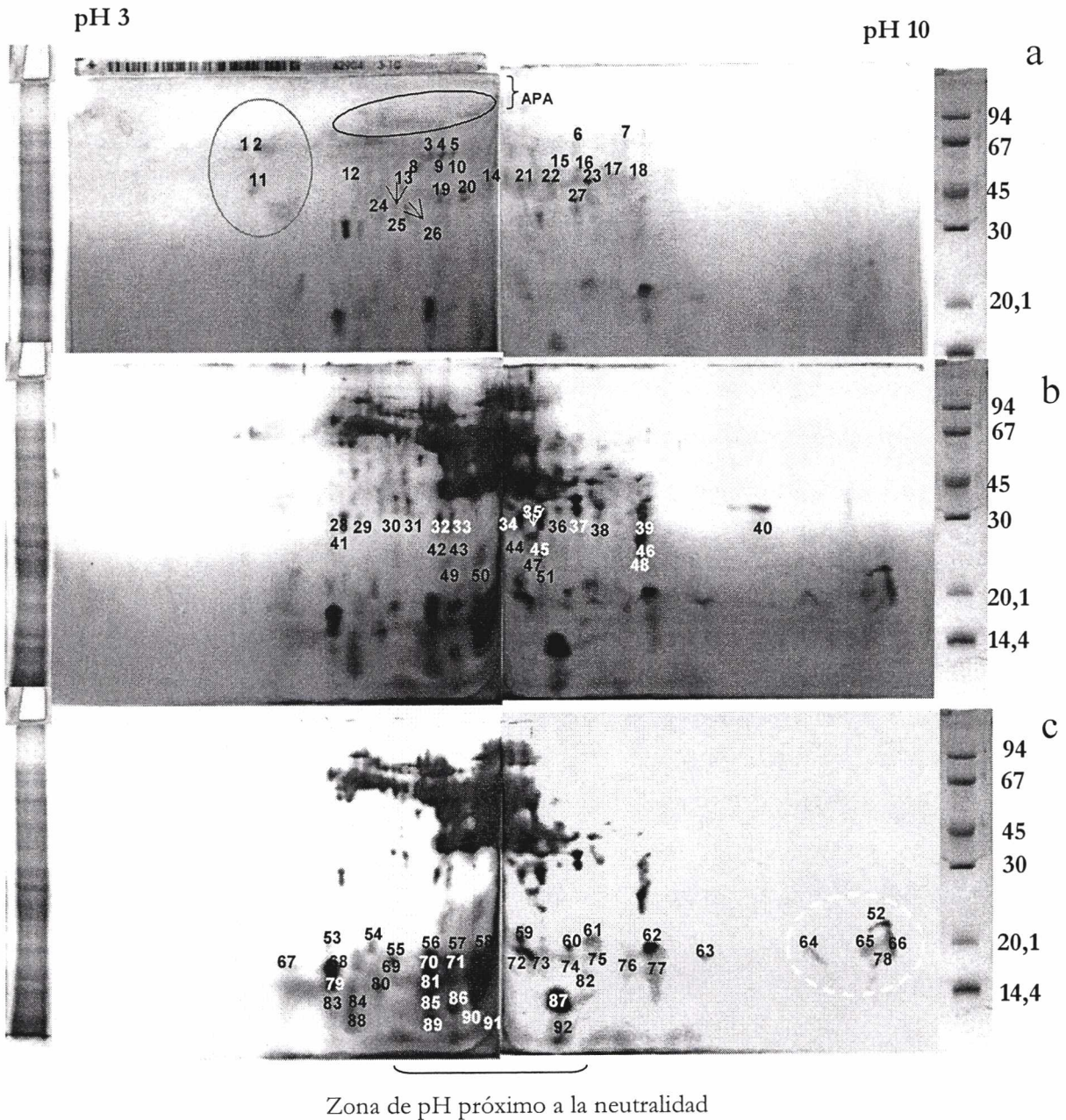


Figura 21: Electroforesis bidimensional de albúminas en condiciones reductoras. 1º dimensión: IEF. 2º dimensión: SDS-PAGE. **a:** Gel teñido con Coomassie Brilliant Blue; **b:** Gel teñido con coloración de plata, **c:** imagen b modificada por cambios en brillo y contraste. A la izquierda se muestra el perfil SDS-PAGE de albúminas y a la derecha el perfil de los patrones de masa molecular con los correspondientes valores en kDa.

Los polipéptidos que presentaron valores de pI más ácidos, podrían corresponderse con la banda identificada con la letra **F**, que fuera separada por PAGE-nativo (**Figura 15B**) como un único componente polipeptídico de 67 kDa. Las subunidades descritas por Marcone y col. (1994 a), con una masa molecular de 12 kDa y con un valor de pI neutro serían los polipéptidos identificados con los números **89 a 92** mostrados en la **Figura 21**, gel c.

Se realizó una comparación entre los perfiles obtenidos en la electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE de la fracción albúminas, con perfiles de la globulina que se presentarán en el Capítulo 2 (**Figura 33 A**). Esta comparación mostró que, los polipéptidos de albúminas que coinciden con manchas en el perfil de las globulinas fueron escasos. Por su ubicación en el perfil no puede descartarse que algunas de las manchas en la zona de 30 kDa numeradas del **28 al 36** y las de la zona de 20 kDa puedan corresponder a polipéptidos de globulinas. Por otro lado los polipéptidos de masa molecular entre 67 y 45 kDa, presentes en albúminas y globulinas, están ubicados en la zona ligeramente ácida en el caso de albúminas y ligeramente alcalina para globulinas. Por lo tanto, estos polipéptidos de alta masa molecular, no provendrían de una contaminación de globulinas sino que serían propios de la fracción albúminas.

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA PRESENTES EN LOS CUERPOS PROTEICOS.

Ubicación de las proteínas de las distintas fracciones proteicas en la célula vegetal.

Como fuera detallado en la Introducción, los cuerpos proteicos son el destino final de las proteínas de reserva, luego de un complejo proceso de síntesis. Mediante análisis por SDS-PAGE de las proteínas que se encontraban en el interior ó fuera de los cuerpos proteicos Konishi y col (1991) mostraron que las globulinas se ubican en el interior de los cuerpos proteicos mientras que las albúminas tendrían una localización citoplasmática. Con dicha finalidad, se estudiaron tanto las proteínas del interior como aquellas que se encuentran por fuera de los cuerpos proteicos.

La separación de los cuerpos proteicos se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Debido a la similitud de tamaño entre los gránulos de almidón y los cuerpos proteicos de amaranto (Nakamura y col 1998), nuestras preparaciones de cuerpos

proteicos se encontraban contaminadas con gránulos de almidón tal como lo muestran las microscopías ópticas que se presentan en la **Figura 22A**.

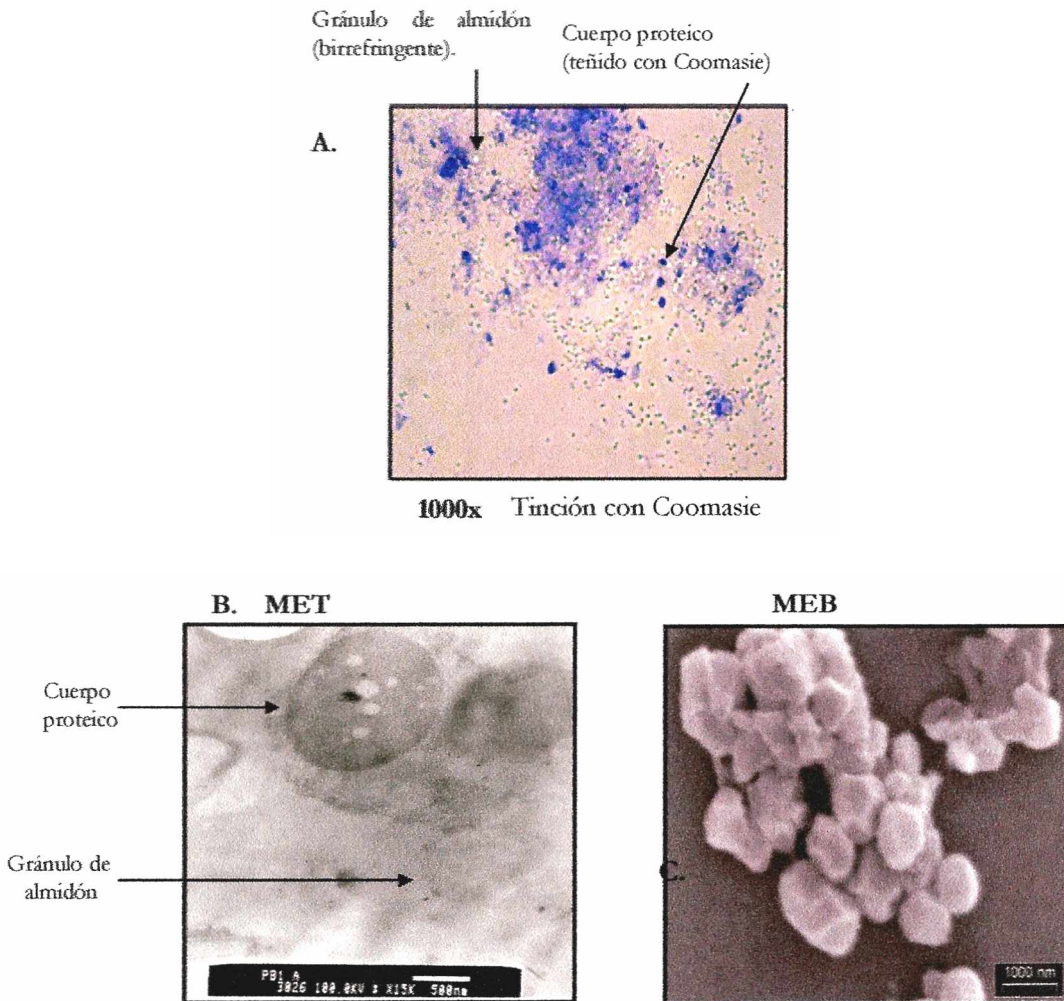


Figura 22. Observaciones por microscopía de una preparación de cuerpos proteicos **A:** Microscopía óptica (1000x), tinción: Coomassie Brilliant Blue (proteínas). **B:** Microscopía electrónica de transmisión (MET). **C:** Microscopía electrónica de barrido (MEB) de gránulos de almidón presentes en la preparación de cuerpos proteicos

En la microscopía óptica los gránulos refringentes serían los de almidón, mientras que aquellos con tinción positiva para Coomassie Brilliant Blue correspondería a cuerpos proteicos (**Figura 22A**). Las microscopías electrónicas presentadas en la **Figura 22B** confirmaron la presencia de gránulos de almidón en nuestras preparaciones.

Se utilizó como material de partida para el estudio de las proteínas que no se encuentran contenidas en el interior de los cuerpos proteicos, al sobrenadante (SNc, descrito en Materiales y Métodos) de la sedimentación de los cuerpos proteicos.

El análisis realizado mediante microscopía óptica presentado en la **Figura 23A** de dicho sobrenadante, mostró la presencia de una pequeña cantidad de partículas contaminantes (cuerpos proteicos o gránulos de almidón).

Este sobrenadante mostró, a su vez un alto grado de turbidez, por lo que se decidió realizar una clarificación mediante ultracentrifugación. El extracto obtenido, presentó un aspecto más límpido que el anterior y se lo denominó (SNs); el análisis realizado por microscopía óptica se muestra en la **Figura 23B**.

Dicha microscopía mostró la fuerte disminución en número de gránulos (almidón y cuerpos proteicos) con respecto al presentado en la **Figura 23A**. La preparación de cuerpos proteicos fue purificada mediante un pasaje doble por un colchón de sacarosa (ver Materiales y métodos CPc y CP₂)

Se realizaron diferentes ensayos electroforéticos e inmunoquímicos de las proteínas contenidas en las fracciones anteriormente descritas. En la **Figura 24** se presentan los perfiles SDS-PAGE y los western-blot de las proteínas pertenecientes a las fracciones antes descritas.

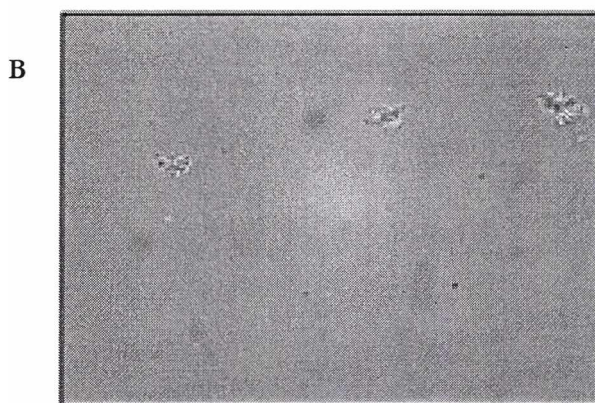
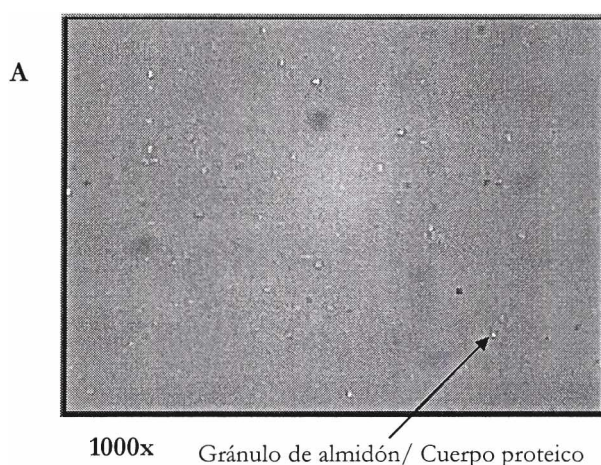


Figura 23A: Microscopía óptica proveniente de una preparación de proteínas externas a los cuerpos proteicos (SNc) **B.** Microscopía óptica proveniente de una preparación de proteínas externas a los cuerpos proteicos clarificados por ultracentrifugación. (SNs)

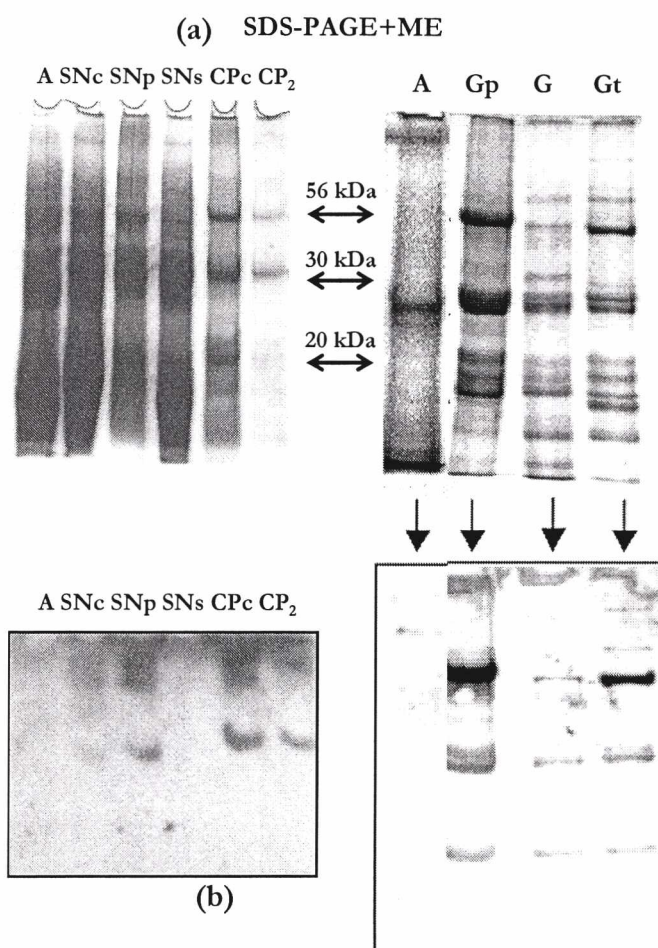


Figura 24: SDS-PAGE +ME y western blot de proteínas de amaranto. **(a)** **A:** fracción albúminas. **SNc** y **SNs:** fracción de proteínas externas al cuerpo proteico preparación cruda y purificada por ultracentrifugación respectivamente, **SNp:** sedimento proveniente de la ultracentrifugación de **SNc**. **CPc** y **CP₂:** preparación de cuerpos proteicos con diferente grado de purificación. Dilución de suero anti-gp: 1/500 (v/v). Revelado western blot por quimioluminiscencia. **(b)** SDS-PAGE+ ME y el western blot de fracciones proteicas **A:** albúminas, **G:** globulina, **Gp:** globulina-p, y **Gt:** glutelinas (Castellani 2000). Dilución de suero anti-gp: 1/5000 (v/v). Revelado de western blot con cloronaftol. Tinción: Coomassie Brilliant Blue.

Cabe señalar que se agregaron a la figura perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas de amaranto a efectos de facilitar el análisis comparativo entre ambas. Los perfiles electroforéticos mostraron que la composición polipeptídica de los sobrenadantes y de la fracción albúminas (calles: **SNc** y **A**) presentan una gran similitud. Asimismo, del análisis de los perfiles electroforéticos de los cuerpos proteicos (calles **CPc** y **CP₂**), resulta evidente que son

similares a la combinación de los perfiles de las fracciones globulínicas (globulina y globulina-p) compartiendo los polipéptidos de 56, 30 y 20 kDa tal como se indica en la figura.

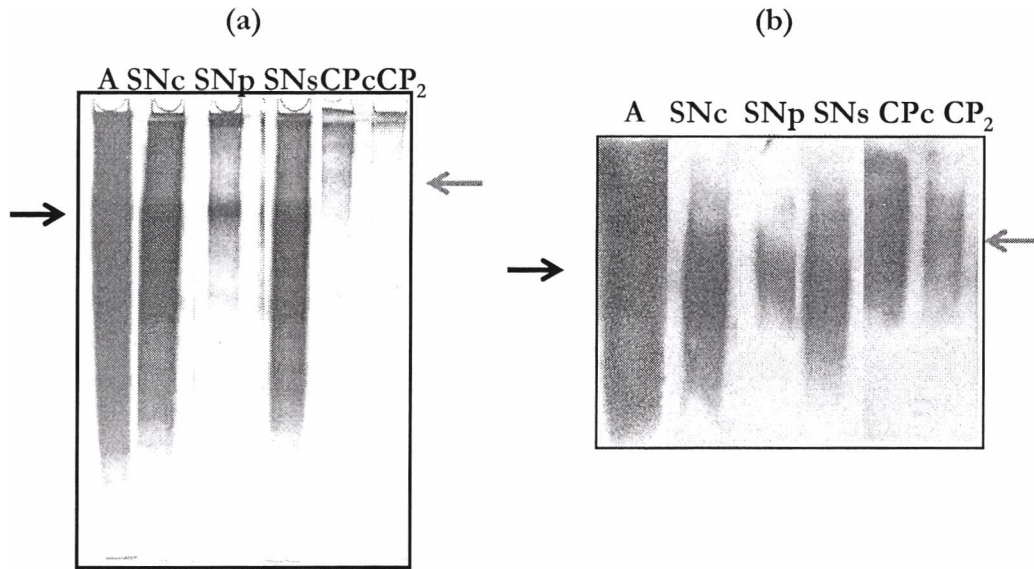


Figura 28: (a) PAGE-nativo y (b) western blot de las siguientes fracciones: **A:** fracción albúminas **SNc** y **SNs:** fracción de proteínas externas al cuerpo proteico preparación cruda y purificada por ultracentrifugación respectivamente, **SNp:** sedimento proveniente de la ultracentrifugación de **SNc**. **CPc** y **CP₂** : preparación de cuerpos proteicos con diferente grado de purificación. Geles de acrilamida: 12%. Tinción: Coomassie Brilliant Blue. Dilución de suero anti-gp: 1/500 (v/v). Revelado de western blot por quimioluminiscencia.

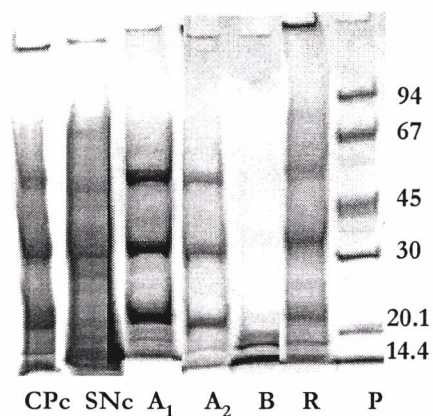
Los ensayos inmunoquímicos presentados en la **Figura 25**, mostraron que la preparación de proteínas contenidas en los cuerpos proteicos, poseen reactividad frente al antisuero policlonal, resultando indistinto trabajar con el **CPc** o con el **CP₂**. En cuanto a la reactividad que presenta la fracción de las proteínas externas a los cuerpos proteicos, se puede observar un comportamiento diferente de acuerdo al grado de purificación. El sobrenadante crudo (**SNc**) así como el sedimento resultante de su centrifugación (**SNp**), presentaron reactividad frente a antisuero por lo que podría pensarse en la presencia de contaminación con globulinas provenientes de cuerpos proteicos. En concordancia con esto, la fracción denominada **SNs** sobrenadante de la sedimentación no mostró reactividad inmunoquímica al igual que la fracción albúminas. Estos resultados sugieren que el tratamiento por centrifugación del sobrenadante ha permitido eliminar los cuerpos proteicos contaminantes ya que sus proteínas son inmunoquímicamente detectadas sólo en el sedimento. Los resultados de los análisis mediante electroforesis nativa confirman la inferencia realizada previamente. En la **Figura 25** se puede

observar que el perfil correspondiente al sobrenadante de la clarificación de la fracción citoplasmática, es similar al de las albúminas (**Figura 25**, calles **SNs** y **A**, respectivamente); mientras que el perfil del sedimento (**SNp**) presenta similitud con el correspondiente a las globulinas (**Figura 28**, calles **G** y **Gp**). En el western blot se puede observar que los tres sobrenadantes presentan reactividad, resultado esperable ya que, en condiciones nativas, proteínas de la fracción albúminas se han mostrado reactivas.

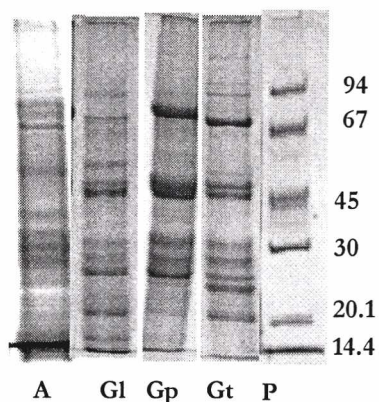
Con la finalidad de completar el análisis de sus características fisicoquímicas, se estudiaron las proteínas contenidas en el interior de los cuerpos proteicos extrayéndolas mediante solubilización secuencial de forma similar a la utilizada en la preparación de fracciones proteicas de harina (ver en sección Materiales y Métodos). El objetivo de estos ensayos radica en la necesidad de conocer la posible relación entre estas características y su movilización durante la germinación temprana. Los perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas se analizaron en una primera instancia en condiciones desnaturalizantes con y sin tratamiento reductor y se presentan en la **Figura 26 A y B**.

En cada una de las figuras mencionadas, se muestran los perfiles de las diferentes fracciones proteicas para facilitar la comparación. Al realizar las primeras extracciones secuenciales con agua sobre la preparación de los cuerpos proteicos las fracciones extraídas (**Figura 26 A y B**, calle **A₁** y **A₂**) mostraron un perfil que resultó ser la combinación de los perfiles obtenidos para las globulinas (calles: **G**, **Gp** y **Gt** de la **Figura 26 A y B**). Una extracción posterior, con buffer A sobre el residuo anterior (calle **B** **Figura 26 A y B**), permitió la extracción en forma aislada de una fracción globulínica constituida por polipéptidos de muy bajo peso molecular la cual será denominada **GBPM**. Con el objeto de extraer globulina-p ó restos de ella, dado que esta proteína se extrae con agua luego de tratar la harina con buffer salino, se realizó una tercera extracción con agua sobre el residuo proveniente del tratamiento con buffer A (calles **A₃**). Los resultados no mostraron presencia de componentes proteicos en ninguno de los ensayos realizados. Este hecho nos hizo suponer que el contenido de proteínas solubles de los cuerpos proteicos se habría agotado. Finalmente, al analizar el residuo o insoluble luego de todas las extracciones realizadas, calles **R**, el perfil obtenido se asemejó al de las glutelinas. De acuerdo a nuestros resultados el tratamiento con agua permite extraer una gran proporción de las proteínas internas a los cuerpos proteicos globulina 11S, globulina-p y globulina 7S.

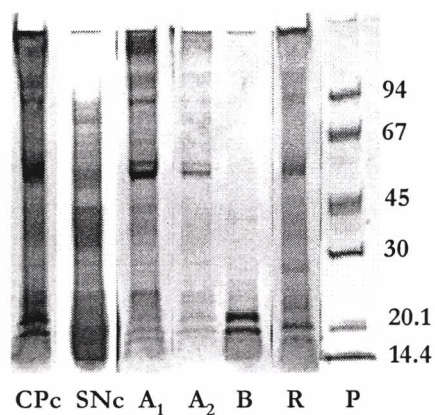
(a) SDS-PAGE + ME



Fracciones proteicas



(b) SDS-PAGE



Fracciones proteicas

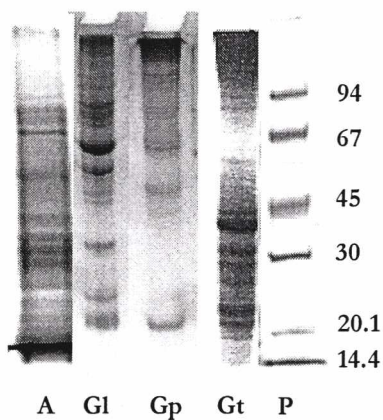


Figura 26. SDS-PAGE de proteínas extraídas de los cuerpos proteicos y de fracciones proteicas extraídas de harina **(a)** SDS-PAGE con tratamiento reductor. **(b)** SDS-PAGE sin tratamiento reductor. **CPc:** Preparación de cuerpos proteicos; **SNc:** sobrenadante crudo de cuerpos proteicos; **A₁:** 1^a extracción con agua; **A₂:** 2^a extracción con agua; **B:** Extracción con buffer salino; **R:** residuo o insoluble **P:** Patrón de peso molecular. Geles de acrilamida: gradiente 7-20% Fracciones proteicas: **A:** Albúminas, **G:** Globulina, **Gp:** Globulina-p y **Gt:** Glutelina. Tinción Coomasie Brilliant Blue.

En una instancia posterior de ensayos, y partiendo de una preparación de cuerpos proteicos se realizó una extracción en forma secuencial de sus proteínas con un buffer de alta fuerza iónica (buffer A) y luego con uno de moderada fuerza (buffer B). Este mismo ensayo se repitió con una secuencia de extracción inversa. Los perfiles electroforéticos obtenidos se

presentan en la **Figura 27**. Ellos muestran que si en primera instancia se tratan los cuerpos proteicos con un buffer de alta fuerza iónica (**Figura 27**, calle: **BA** tratamiento 1) se extraen los polipéptidos de bajo peso molecular junto con la globulina 11S. En una extracción posterior con buffer B (**Figura 27**, calle: **BB** Tratamiento 1) se extraen agregados de alta masa molecular pertenecientes a la globulina-p, junto con la globulina 11S. Estos resultados nos indicarían que para poder obtener una fracción enriquecida en los polipéptidos globulínicos de baja masa molecular no sería necesario realizar una extracción previa con agua. Una primera extracción con buffer B (**Figura 27**, calle: **BB** Tratamiento 2) sobre los cuerpos proteicos no es suficiente para poder extraer a la **GBPM** del interior de los mismos, pero permite extraer a los agregados pertenecientes a la globulinas-p.

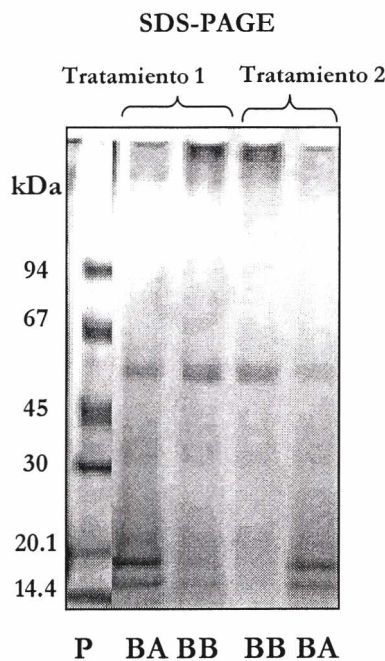


Figura 27: SDS-PAGE de una extracción con buffer A (**BA**) y buffer B (**BB**) de una preparación de cuerpos proteicos.

Estos resultados nos permitieron concluir, en forma preliminar, que la **GBPM** es insoluble en agua o en soluciones de baja fuerza iónica (como el buffer B). A partir de estos ensayos se podría inferir que los polipéptidos **GBPM** poseen un comportamiento similar a la globulina no así a la globulina-p la cual es poco soluble en soluciones de alta fuerza iónica.

Para corroborar la identidad de las proteínas extraídas de los cuerpos proteicos con los distintos solventes utilizados, se realizó un análisis mediante PAGE-nativo, los perfiles

obtenidos, se muestran en la **Figura 28**. Se puede observar que las proteínas extraídas con agua (**Figura 28**, calle: **A₁**) presentan un comportamiento similar a la globulina-p y/o al total de proteínas contenidas en el interior de las vacuolas de reserva (**Figura 28**, calle: **A₁** y **Gp/G**). La baja proporción de proteínas obtenidas en una segunda extracción con agua,

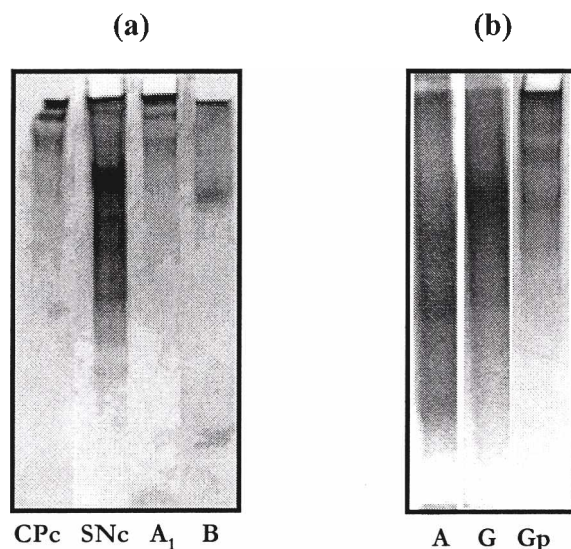


Figura 28: PAGE-nativo de proteínas de semilla. **(a)** **CPc:** Preparación de cuerpos proteicos, **SNc:** sobrenadante de cuerpos proteicos, **A₁:** 1° extracción con agua y **B:** extracción con buffer salino. Geles de acrilamida: 7%. **(b)** Fracciones proteicas: **A:** albúminas, **G:** globulina y **Gp:** globulina-p. Geles de acrilamida al 6%. Tinción: Coomassie Brilliant blue.

nos impidió detectarlas mediante electroforesis. El perfil electroforético de la fracción extraída con buffer A (calle **B**) fue muy similar al encontrado para la globulina 11S (**Figura 28**, calles: **B** y **G**). Cabe señalar que las diferencias encontradas entre los perfiles electroforéticos de las preparaciones de cuerpos proteicos y las fracciones proteicas se deben a diferencias en la concentración de acrilamida de los geles.

Se realizaron cromatografías de exclusión molecular de las proteínas contenidas en los cuerpos proteicos. Las fracciones analizadas fueron: **A₁**, proteínas extraídas con agua, y **GBPM**, fracción extraída con buffer A. Los perfiles (**Figura 29**) pusieron de manifiesto que la fracción extraída con agua contiene agregados de alta masa molecular (mayor a los 1000 kDa) propios de la globulina-p, unidades hexaméricas (270 kDa), características de globulina-p y globulina y moléculas de bajo tamaño (menores de 56 kDa) que suelen acompañar a las globulinas. El perfil

de **GBPM** mostró que esta fracción se encontraría conformada por una combinación de agregados de alta masa molecular, una gran proporción de proteínas con una masa molecular menor a los 56 kDa, y se encontraría empobrecida en moléculas hexaméricas típicas de las globulinas. Esta fracción globulínica, **GBPM**, no había sido aislada mediante la extracción secuencial de la harina, sin embargo

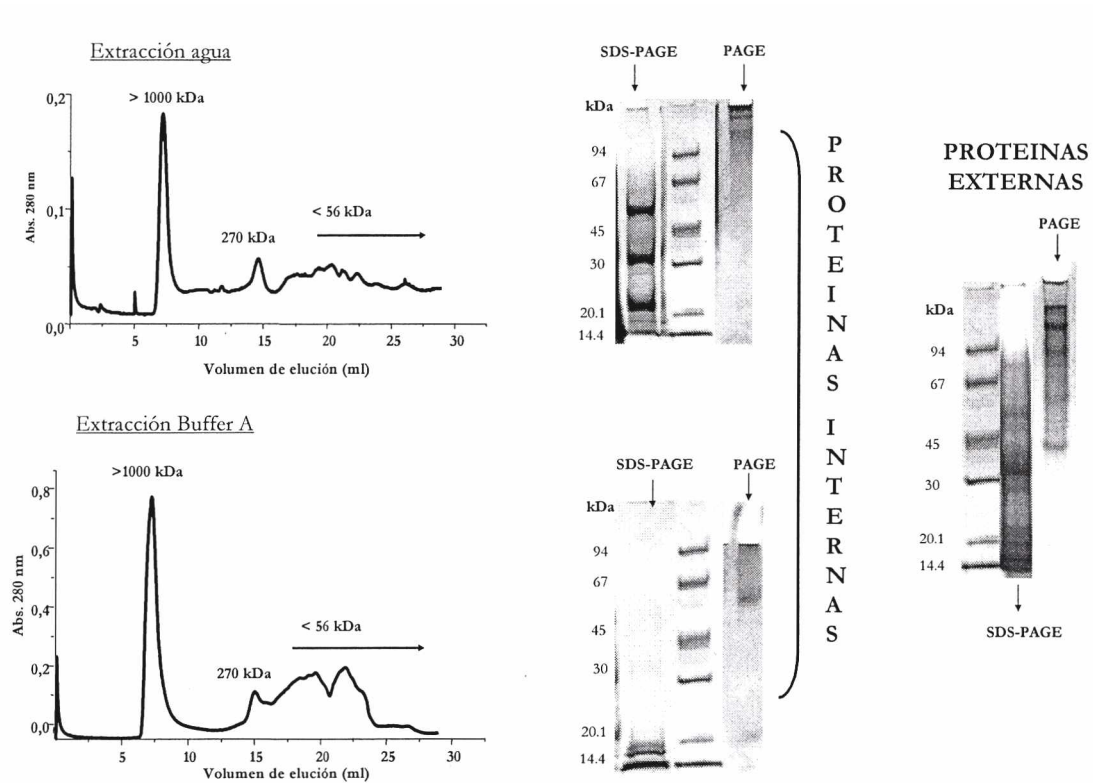


Figura 29: Cromatografía de exclusión molecular. Relleno utilizado Superosa 6B Extracción agua: equivalente a Extracción (A). Solvente de elución: buffer de moderada fuerza iónica pH 8.5. Extracción buffer A: equivalente a extracción (B). Solvente de elución: buffer salino. Proteínas externas: perfiles en condiciones nativas y desnaturalizantes de la fracción SNC.

presenta características moleculares similares a una fracción globulínica (Globulina II) aislada por Chen y col. (1997) mediante dos métodos de extracción diferentes sobre harinas desgrasadas. De acuerdo a lo anterior la extracción de proteínas mediante tratamiento secuencial con agua y solución salina da resultados diferentes según se parta bien de harina desgrasada ó semillas molidas (sin desgrasar) ó bien de cuerpos proteicos. Resulta curioso que las globulinas 7S y 11S, extraíbles en solución salina, hayan podido extraerse de los cuerpos proteicos por tratamiento con agua. Asimismo la globulina-p, que sólo se extrae con agua a partir de la harina tratada

previamente con solución salina, no requiera esta extracción previa cuando se trata de los cuerpos proteicos. Konishi y col. (1991) propusieron que la globulina-p estaría localizada en los cuerpos proteicos razón por la cual no era extraída con agua junto con las albúminas. Es de suponer que durante un primer tratamiento de la harina con agua ya se estarían rompiendo los cuerpos proteicos con lo que en esa extracción tendría que estar presente la globulina-p junto con las albúminas. La necesidad de la extracción previa de las globulinas se podría explicar si consideramos que la globulina-p está localizada en los cuerpos proteicos en una región más interna que las globulinas 7 y 11S. Nuestros resultados se pueden explicar teniendo en cuenta la solubilidad de las especies proteicas extraídas de las vacuolas. La globulina-p es soluble en solución salina de baja fuerza iónica (μ), **GBPM** es soluble en soluciones salina de alta μ , mientras que las globulinas 7 y 11S son solubles en soluciones salinas tanto de alta como de baja μ . Si consideramos que el contenido de sales de la preparación de cuerpos proteicos sedimentados era suficiente para que el agua del tratamiento se transformara en una solución salina de baja μ , en ella se solubilizarían tanto la globulina 7S y la 11S como la globulina-p, mientras que en un primer tratamiento con $\mu=0,5$ se solubilizarían la globulina 7S, la 11S y la **GBPM** pero no la globulina-p. En los dos casos la globulina-p es extraída junto ó posteriormente a la globulina 11S.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los estudios inmunoquímicos realizados se podría decir que las proteínas de almacenamiento de amaranto (globulinas) presentarían diferencias estructurales importantes con las de algunos cereales y Dicotiledóneas. Por otro lado las proteínas de amaranto presentaron similar reactividad inmunoquímica con las globulinas de quinoa y menor proporción con proteínas de avena y girasol.

Las proteínas de reserva de amaranto, globulina, globulina-p y glutelinas, presentaron similitud en epítopes de secuencia con lo cual se diferenciaron de la fracción albúminas que no presentó homología alguna. En cuanto a los epítopes conformacionales el comportamiento de globulina-p y globulina fue más semejante alejándose de ellas las glutelinas. Este comportamiento puede atribuirse a los cambios conformacionales sufridos por esta última fracción por el tratamiento a pH alcalino durante su extracción.

Con el objeto de contar con información previa al estudio del procesamiento de las proteínas durante la germinación se analizó los cambios producidos por la globulina-p cuando

fue sometida a tratamientos controlados con papaína y tripsina. Con ambas enzimas los polipéptidos primeramente hidrolizados fueron el p56 y el polipéptido A de 30 kDa. Estos resultados son coincidentes con los observados por Castellani y col. (2000) en estudios de la acción de papaína sobre globulina-p. Los resultados de este trabajo mostraron que en los primeros estadios de hidrólisis se forman productos con masas moleculares entre 30-56 kDa que por su tamaño y reactividad inmunoquímica provendrían de la hidrólisis del p56.

La caracterización estructural de las albúminas demostró que esta fracción está integrada por un gran número de proteínas de diferente naturaleza, hecho que apoya su ubicación como proteínas tipo house keeping. Estos resultados, coincidentes con los obtenidos por Segura-Nieto y col. (1992) se contraponen a los informados por Marcone y col. (1994 a), siendo posible que las diferencias encontradas se deban a diferencia metodológica. La mayoría de las proteínas de esta fracción son de peso molecular inferior a 66 kDa constituidas por polipéptidos de baja masa molecular cuyos puntos isoeléctricos se encuentra mayoritariamente entre 5,0 y 8,0. Por el comportamiento de sus polipéptidos no pudo descartarse que esta fracción contenga polipéptidos contaminantes provenientes de la fracción globulinas. De todos modos los mismos estarían en muy baja proporción ya que no presentaron reactividad inmunoquímica ante el anticuerpo anti-Gp.

Su reactividad inmunoquímica en condiciones nativas, presente en especies de baja movilidad electroforética sugeriría la posible homología con proteínas de almacenamiento. A pesar que esta fracción se encuentra por fuera de los cuerpos proteicos, le cabría la posibilidad de que algunos de sus componentes tengan entre sus funciones el ser reserva de aminoácidos durante la germinación.

Se caracterizaron las fracciones a utilizar para el estudio de las proteínas del citosol y del interior de los cuerpos proteicos. Se obtuvieron dos fracciones de proteínas citoplasmáticas una preparación no purificada, **SNc**, con una leve contaminación con cuerpos proteicos, y otra con una mayor purificación, **SNs**, con la contaminación muy reducida. El análisis de las proteínas extraídas de estas dos preparaciones mostró, al igual que lo informado por Konishi y col (1991) que las proteínas del citosol se correspondían con las integrantes de la fracción albúminas. Las preparaciones de cuerpos proteicos, ya sea parcialmente purificada o no contenían una cantidad importante de gránulos de almidón los cuales no interfieren con los estudios que se realizan en este trabajo. En coincidencia con Konishi y col. (1991) se encontró que las proteínas del interior de los cuerpos proteicos se correspondían con las de almacenamiento globulinas 7 y 11S,

globulina-p y glutelinas. La extracción secuencial de las proteínas de los cuerpos proteicos realizada utilizando distintos solventes, nos permitió caracterizar una fracción globulínica, **GBPM**, sólo soluble en solventes de alta fuerza iónica integrada por polipéptidos de baja masa molecular. Por otra parte, los resultados obtenidos nos han permitido proponer que, en el interior de los cuerpos proteicos, la globulina-p tendría una localización más interna que las globulinas 7 y 11S. Esta hipótesis está de acuerdo con las experiencias de Konishi y col. (1991) que muestran que en un tratamiento de la harina de amaranto con pronasa resultan degradadas las albúminas y las globulinas pero no la globulina-p.

CAPÍTULO 2

*Movilización de las proteínas durante la
germinación.*

MOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN.

Etapas de la germinación en semillas de amaranto.

Como paso previo al análisis de las proteínas de las semillas de amaranto durante la germinación, se analizaron los cambios en el aspecto general de las semillas a los distintos tiempos de imbibición en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Las características particulares de las semillas observadas en cada uno de los tiempos de imbibición se presentan en la **Figura 30**.

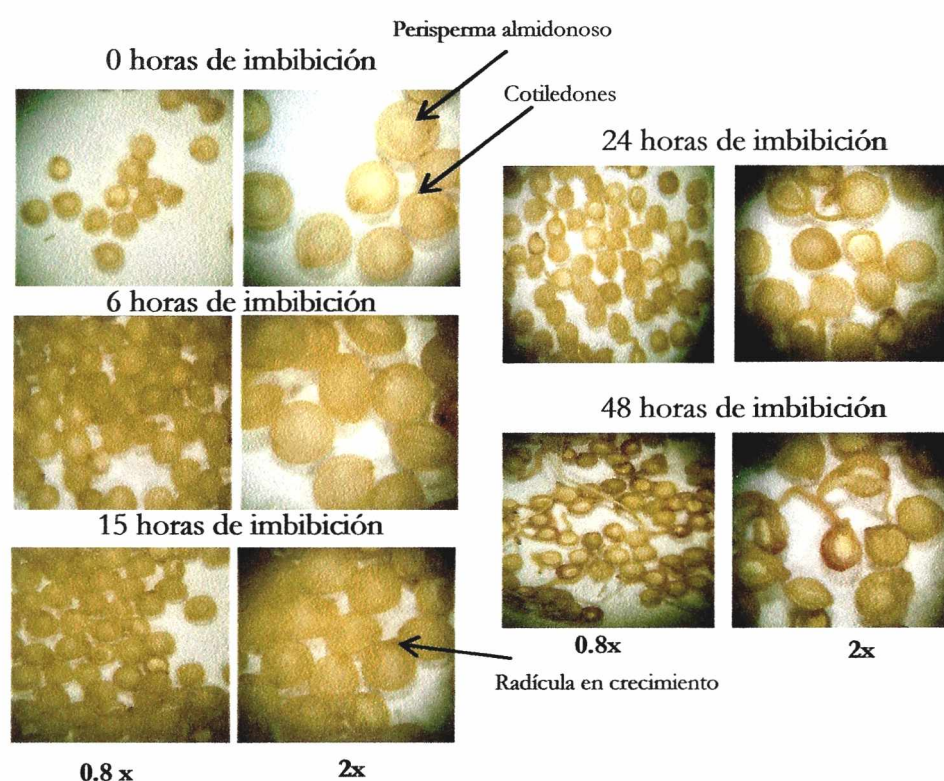


Figura 30: Fotografías digitales de semillas a diferentes tiempos de imbibición observadas bajo lupa a dos aumentos diferentes (0,8x y 2x).

Se puede observar que en las semillas sin germinar queda bien delimitada la zona del perisperma almidonoso (región central) de lo que es la zona de los cotiledones (rodeando al mismo) tal como se mostró anteriormente en la **Figura 1** en la Introducción. A las 6 horas de imbibición (6 h) las semillas aumentaron su tamaño con respecto al estadio anterior presentando un grado mayor de hidratación donde los límites entre las distintas regiones observadas en el estadio anterior no son tan evidentes.

A las 15 horas de imbibición (15 h) se puede observar que la radícula ha emergido en forma muy incipiente de la cobertura de la semilla (correspondiendo a la zona más oscura en las fotografías con mayor aumento, señalado con un flecha llena). En esta etapa es donde culmina el período de germinación propiamente dicho involucrando a las Fase I y Fase II descritas en la Introducción. Los estadios de la germinación correspondientes a los tiempos de imbibición más prolongados, que se describirán a continuación (24 y 48 horas de imbibición) corresponden a la etapa de post-germinación, que involucra lo descrito como Fase III (movilización de macromoléculas, entre ellas las proteínas de reserva). A las 24 horas de imbibición (24 h), la radícula rompe la cobertura externa de la semilla registrándose una leve disminución en el tamaño de las mismas. Finalmente a las 48 horas de imbibición (48 h), la radícula ha emergido en mayor grado que en el estadio anterior. Las semillas, además, muestran un menor tamaño y exhiben una característica que permite distinguirlas del resto de los estadios: la aparición de un pigmento de color rosado que se dispone en las capas más externas de la cobertura de la semilla, tal como puede observarse en la foto perteneciente a dicho estadio. De acuerdo a datos bibliográficos, en semillas germinadas de amaranto la síntesis de este pigmento es una función del tiempo de imbibición que a una temperatura de incubación de 37°C alcanza su máximo a las 24 horas de imbibición (Mora-Escobedo y col., 1991). En las fotos a los distintos tiempos de imbibición, se puede observar que las semillas de los diferentes lotes no se comportan de manera homogénea, evidenciándose semillas con diferente grado de germinación o poder germinativo. Esto se hace más evidente en los tiempos más prolongados de imbibición. Por esta razón para la realización de los estudios de este trabajo se seleccionaron las semillas más representativas de cada estadio. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente mencionadas, la etapa de germinación de las semillas de amaranto incubadas en las condiciones descritas concluiría aproximadamente entre las 12 y las 15 horas de imbibición; momento en el que emerge la radícula.

Dada la dificultad que presentó la separación de los cotiledones del resto de la semilla, la totalidad de los ensayos que se describirán fueron realizados a partir de harinas integrales, provenientes de semillas enteras incubadas durante diferentes tiempos.

CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS.

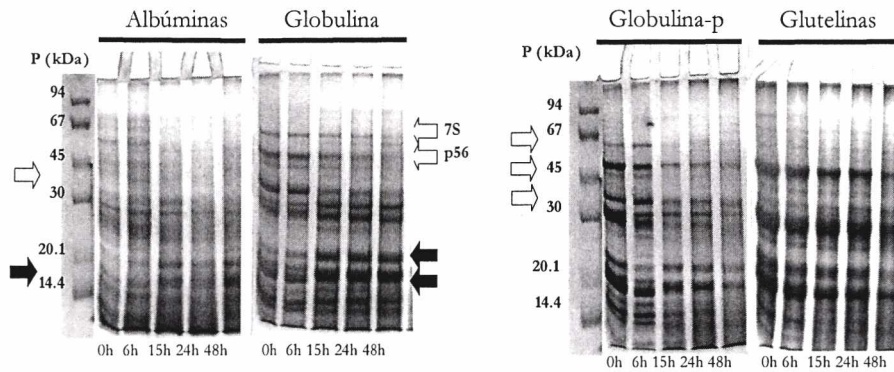
Fracciones proteicas.

La movilización de las proteínas de reserva durante la germinación temprana fue estudiada, en una primera instancia, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El objetivo específico de esta serie de estudios radicó en la posibilidad de analizar el patrón de degradación polipeptídica de cada una de las fracciones proteicas, obtenidas por extracción secuencial durante las etapas de germinación y post-germinación.

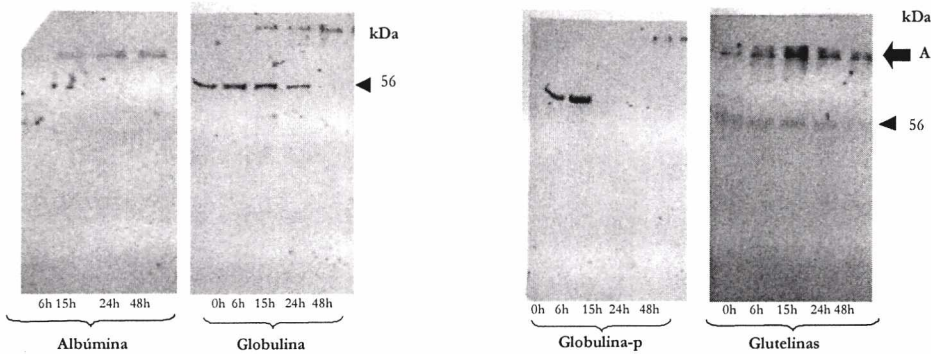
Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 31 a**. Los perfiles de las proteínas obtenidas a tiempos de imbibición inferiores a 15 h - 6, 8 y 12 h – no presentaron diferencias con respecto al control sin embeber (sólo se muestra el de 6h en la figura). En la Figura se puede observar que a las 15 horas de imbibición existe una disminución de polipéptidos de masa molecular mayor o igual a los 40 kDa (marcados con flecha vacía al costado de la Figura) presentes en las fracciones: albúminas, globulina y globulina-p (**calle: 15 h** en las respectivas fracciones). En globulina y globulina-p se evidencia la disminución del polipéptido de 56 kDa (p56 en la figura) desde las 15 h en adelante. Asimismo se encontró una disminución en la intensidad de los polipéptidos en la zona de los 30 kDa (indicada en la Figura), que es más evidente en la globulina-p que en la globulina. En la globulina se puede apreciar, además, que a partir de las 15 h tiene lugar una disminución en la intensidad de la banda correspondiente a un polipéptido con masa molecular menor a los 67 kDa. El mismo se encuentra en baja proporción en la fracción control (**Figura 31 a** calle 0 h, fracción globulina) pudiendo ser un componente polipeptídico de la globulina 7S. Si bien la fracción globulina-p no presenta componentes polipeptídicos de 67 kDa, la presencia de este polipéptido podría deberse a una contaminación proveniente de la fracción anterior. Esta contaminación no se presentó en todas las preparaciones de globulina-p. La degradación temprana, durante la etapa de germinación, de la globulina 7S en amaranto, estaría en coincidencia con lo informado para *Vicia sativa* por Schlereth y col. (2000).

En las globulinas (globulina y globulina-p) y en las albúminas, la disminución de los polipéptidos de mayor masa molecular fue acompañada de la aparición de nuevos polipéptidos (indicados en la Figura con flechas llenas), que corresponderían a productos de hidrólisis.

(a) SDS-PAGE +ME



(b) Western blot (revelado por quimioluminiscencia) Anticuerpo: 1/5000



(c) Western blot (revelado por quimioluminiscencia) Anticuerpo: 1/1000

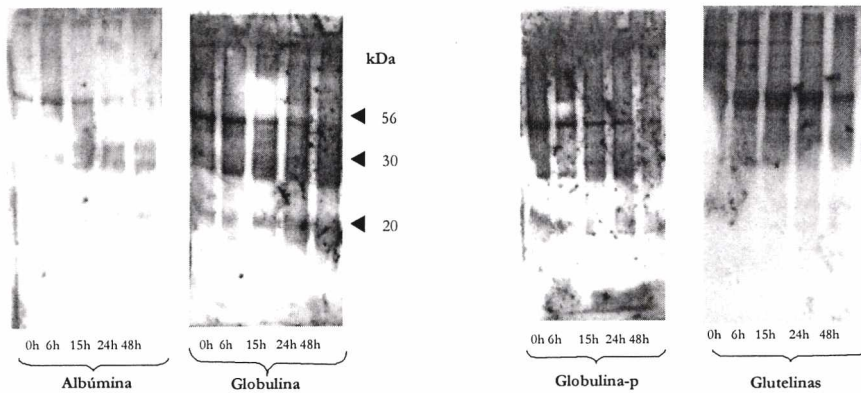


Figura 31: (a) SDS-PAGE con tratamiento reductor de las fracciones proteicas de Amaranth obtenidas por extracción secuencial de harinas provenientes de semillas con distintos tiempos de imbibición. **Tiempos:** 0h: control, 6h, 15h, 24h y 48h. Geles de acrilamida 12%. **P:** proteínas patrones de peso molecular. **kDa :** valores de las masas moleculares de las proteínas patrón. **Tinción:** Coomassie Brilliant Blue. (b) Western blot (revelado por quimioluminiscencia) de las fracciones proteicas corridas en idénticas condiciones que a. **Dilución de suero anti-gp:** 1/5000 en Figura b y 1/1000 v/v en Figura c.

En las albúminas y globulinas, estos cambios se hicieron mucho más intensos a las 48 horas de imbibición. Estos resultados se contraponen a los informados por Schlereth y col. (2000), quienes analizaron el comportamiento de la fracción albúminas en cotiledones y en tejido embrionario en *Vicia sativa*. Estos autores no encontraron cambios en los perfiles electroforéticos de dicha fracción hasta las 72 h de imbibición

A diferencia de lo que ocurre con las fracciones mencionadas anteriormente, las glutelinas no presentaron cambios significativos en sus perfiles electroforéticos hasta las 48 horas de imbibición siendo el polipéptido de 56 kDa, al igual que en el resto de las globulinas, el primero en movilizarse (si bien en la figura aparece levemente disminuido, en otros ensayos realizados se pudo corroborar la disminución más pronunciada del mismo a partir de las 24 h). La menor tasa de degradación polipeptídica observada en las glutelinas, estaría relacionada con su mayor grado de agregación en el interior de los cuerpos proteicos. En concordancia con lo que fuera encontrado para el amaranto, Müntz y col. (2001) al igual que Schlereth y col. (2000) informaron que para *Vicia sativa* no se registran diferencias significativas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de reserva durante la etapa de germinación, Fase I y Fase II. Coincidentemente, en el caso del amaranto se observó la falta de cambio en todos los perfiles correspondientes a tiempos inferiores a 15 h (estadio de germinación).

Si se compara la secuencia de hidrólisis de los polipéptidos de globulina-p *in vitro* por tratamiento con tripsina y papaína (Capítulo 1) con los resultados de la degradación de esta proteína durante la germinación, se pueden observar patrones de hidrólisis similares. Sin embargo, en los análisis *in vitro* se observaron productos de hidrólisis entre 30 y 45 kDa que no se detectan en las proteínas germinadas. Con el objeto de explorar la presencia de productos de hidrólisis del polipéptido p56 se decidió estudiar entonces, el comportamiento inmunoquímico de cada una de estas fracciones a lo largo de la germinación y la post-germinación. El análisis de estos resultados nos permitiría determinar la presencia de productos de hidrólisis reactivos durante la etapa de germinación y también explorar si la reactividad de los epítopes de cada una de las fracciones proteicas se ven modificados en el transcurso de la misma.

Los resultados obtenidos por medio de los ensayos inmunoquímicos en condiciones desnaturalizantes se presentan en la **Figura 31 b y c**. En el caso de la fracción albúminas bajo condiciones desnaturalizantes, esta fracción manifestó la presencia de polipéptidos reactivos. Este resultado se opone al presentado en el Capítulo 1, en el que se

mostró ausencia de reactividad inmunoquímica frente al anticuerpo de la albúmina en condiciones desnaturalizantes. Esto nos condujo a pensar en la posibilidad de una contaminación de globulinas como consecuencia de la presencia de cuerpos proteicos rotos en esta preparación. A partir de las 15 h se registró la presencia de agregados reactivos alojados en el punto de siembra (**Figura 31 c, dilución del anticuerpo 1:5000**). Estas proteínas podrían corresponder a globulinas de almacenamiento provenientes de la ruptura de cuerpos proteicos en el proceso de germinación. En el transcurso de la degradación proteica, no se observaron polipéptidos reactivos de mayor movilidad.

Los ensayos inmunoquímicos realizados sobre las fracciones globulina y globulina-p ratificaron la reactividad del p56 en los estadios más tempranos de hidrólisis, esta reactividad se mantuvo hasta las 24 h en la globulina mientras que para la globulina-p la reactividad del p56 se perdió a las 15 h (**Figura 31 b, dilución del anticuerpo 1:5000**).

La fracción glutelinas, presentó una tenue reactividad del p56 en comparación con la globulina y la globulina-p; esta reactividad fue disminuyendo a medida que se avanzó en el tiempo de hidrólisis. Los agregados de alta masa molecular, característicos de esta fracción presentaron reactividad frente al antisuero, la cual fue desapareciendo paulatinamente (**Figura 31 b, dilución del anticuerpo 1:5000**).

Ante la posibilidad de la existencia de productos de hidrólisis con baja reactividad inmunoquímica se decidió utilizar una mayor concentración de anticuerpo y de antisuero conjugado de manera de aumentar la sensibilidad del ensayo (**Figura 31 c, dilución del anticuerpo 1:1000**). La globulina y la globulina-p, presentaron reactividad inmunoquímica en todos sus componentes polipeptídicos: p56, polipéptidos entre 56 y 30 kDa y polipéptidos de 30 kDa y con menor intensidad, polipéptidos de 20 kDa. Si bien en estas condiciones no se pudieron detectar productos de hidrólisis reactivos de masas moleculares entre 40 y 50 kDa, no se puede descartar la posibilidad de que estos productos estuvieran enmascarados. Los perfiles de la fracción globulinas muestran, a su vez, un incremento en la reactividad de la banda de 20 kDa, esto podría interpretarse como la aparición de productos de hidrólisis de dicha masa molecular.

La fracción albúminas, en estas nuevas condiciones, presentó un perfil de polipéptidos reactivos con masas coincidentes a las encontradas para las globulinas (**Figura 31 c**). Esto nos confirma la contaminación con globulinas mencionada anteriormente, de todos modos la presencia de estos polipéptidos se da en muy bajas proporciones ya que se pusieron de manifiesto al aumentar la sensibilidad del ensayo. Los resultados mostraron la presencia del p56 a

las 0 y 6 h y una disminución en su reactividad junto con un aumento en la reactividad de los polipéptidos de 20 y 30 kDa a partir de las 15 h. Estos resultados nos permiten suponer que dichos polipéptidos podrían corresponder a productos de degradación del polipéptido p56.

En una serie posterior de ensayos se analizaron las fracciones albúminas y globulinas (fracciones mayoritarias del grano) a diferentes tiempos de imbibición mediante electroforesis bidimensional (IEF→SDS-PAGE). Los tiempos de imbibición seleccionados tuvieron como finalidad el estudiar con mayor detalle, los cambios que habían sido descritos anteriormente en la **Figura 32 A**. En ambas fracciones se había constatado que la movilización temprana de los polipéptidos se inicia a las 15 h y que a las 48 h de imbibición se ponían de manifiesto modificaciones mayores con respecto a la fracción sin germinar.

Para facilitar la comparación y el análisis, en la **Figura 32 A** se muestra nuevamente el perfil bidimensional de albúminas provenientes de semillas sin germinar.

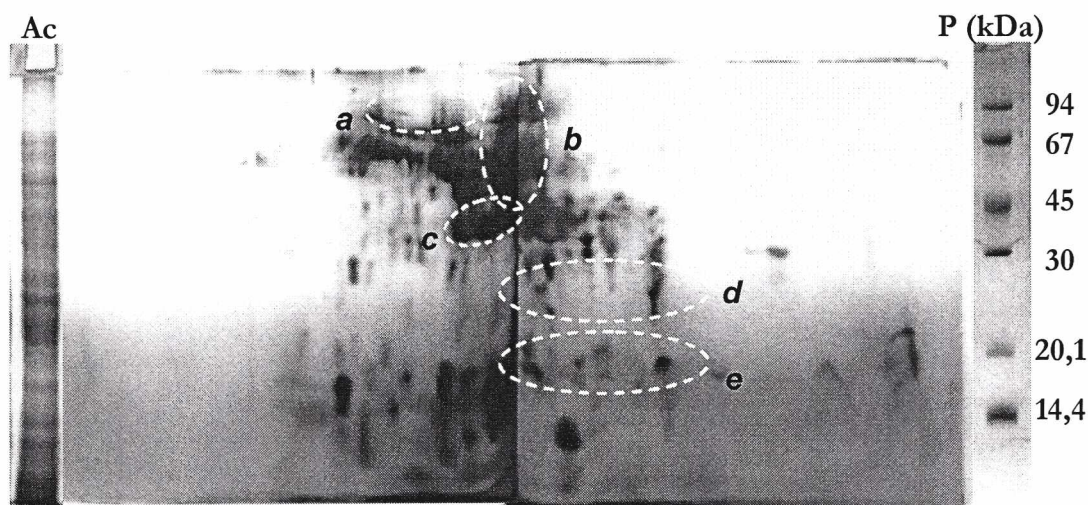


Figura 32A Isoelectroenfoque de la fracción albúminas con 0h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**Ac**). Geles de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brilliant Blue (en patrones y fracción proteica); tinción con plata (isoelectroenfoque).

Como fuera señalado anteriormente la fracción albúminas presentó una amplia variedad de polipéptidos distribuidos en un rango amplio de pHs habiéndose podido separar más de 80 especies proteicas diferentes. Al comparar los perfiles obtenidos a las 15 h con los de la fracción sin germinar, se pudo constatar que cinco familias de polipéptidos (*a*, *b*, *c*, *d* y *e*) (señalados en la **Figura 32 A** con trazos discontinuos) habían desaparecido.

Los polipéptidos identificados con la letra **a**, de características ligeramente ácidas y con una masa molecular por encima de los 67 kDa pertenecerían a la familia de agregados propios de la fracción albúminas (**APA**) que fueran descritos en el Capítulo 1. Los polipéptidos identificados con las letras **b**, **c**, **d** y **e** todos ellos de características neutras ó ligeramente alcalinas, presentaron diferencias en cuanto a sus masas moleculares siendo las mismas de alrededor de 45, 30 y 20 kDa respectivamente.



Figura 32B Isoelectroenfoque de la fracción albúminas 15h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**A₁₅**). Geles de acrilamida 12%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (en patrones y fracción proteica); tinción con plata (isoelectroenfoque).

Los productos formados en esta fracción a las 15h se señalaron con letras en rojo en la **Figura 32 B**, los mismos se distribuyeron mayoritariamente en la zona de pHs ácidos con las siguientes masas moleculares: **a-c** (45 kDa), **d-f** (30 kDa), **g** (menor a 30 kDa) y **h-j** (mayor a 20 kDa). Los polipéptidos que presentaron mayor carácter ácido fueron los identificados con las letras **a-c**. No se evidenció la presencia de productos de hidrólisis con características neutras y/o alcalinas con masas moleculares por debajo de los 30 kDa. Estos resultados nos indican que la mayoría de los productos de hidrólisis en esta fracción son de carácter ácido. En cuanto al origen de los productos formados, aquellos con masas moleculares entre 45 y 30 kDa provendrían en su mayor parte de la hidrólisis de los polipéptidos de **APA**. Los que presentaron masas moleculares por debajo de los 30 kDa podrían provenir de la escisión de los **APA** y/o de polipéptidos de 30 kDa.

En el estadio de 48h, los polipéptidos hallados fueron muy pocos, como puede observarse en la **Figura 32 C**.

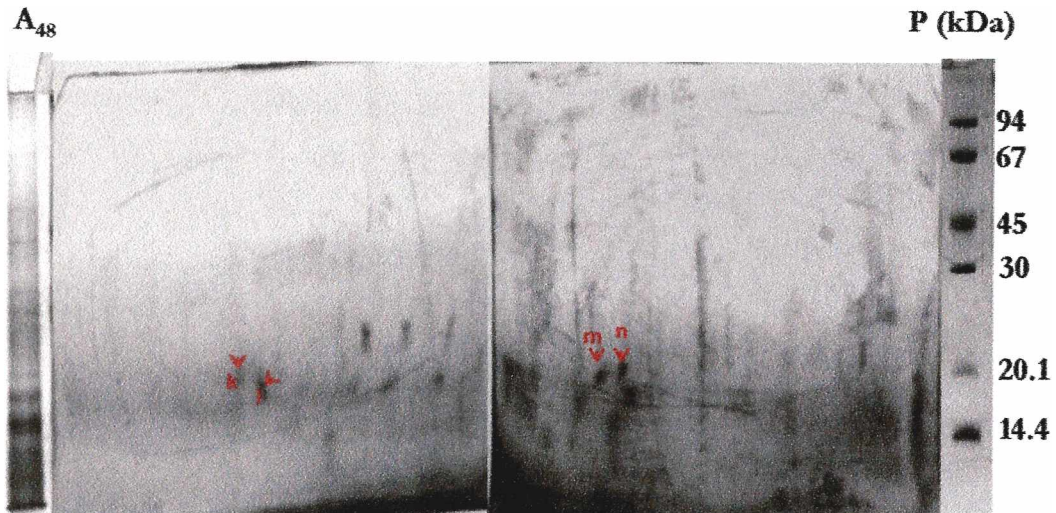


Figura 32 C Isoelectroenfoque de la fracción albúminas 48h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**A₄₈**). Geles de acrilamida 12%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (en patrones y fracción proteica); tinción con plata (isoelectroenfoque).

Los productos formados en este estadio, tal como muestra la figura fueron los **k, l, m** y **n**. Los dos primeros de características ácidas, mientras que los dos últimos se ubicaron en una zona de pH neutro. La baja concentración de proteína presente en este ensayo nos impidió determinar si los polipéptidos señalados en esta fracción, serían los únicos presentes en este estadio de imbibición.

En cuanto a la fracción globulinas, se procedió de la misma manera que para las albúminas. En la **Figura 33 A** se presenta la fracción sin germinar de la globulina para poder realizar inferencias sobre las fracciones hidrolizadas. El perfil obtenido muestra que dicha fracción se encuentra conformada por polipéptidos con características neutras con masas moleculares de 56 y 45 kDa (indicados en la figura como **p56** y **p45**).

Como en todas las globulinas, también se encuentran presentes los polipéptidos ácidos de 30 kDa (**Figura 33 A; A**) y los básicos de 20 kDa (**Figura 33 A; B**), estos resultados son coincidentes con los informados anteriormente en el Capítulo 1.

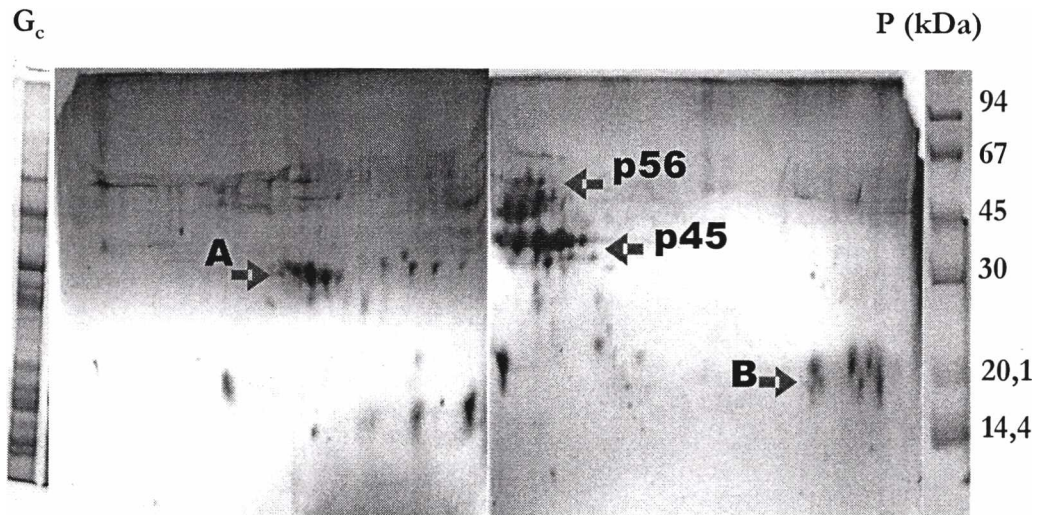


Figura 33 A Isoelectroenfoque de la fracción globulinas a 0 h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**G_c**). Geles de acrilamida 12%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (en patrones y fracción proteica); tinción con plata (isoelectroenfoque).

A las 15 h de imbibición las globulinas (**Figura 33 B**) mostraron una disminución en los polipéptidos con masas moleculares entre 56-45 kDa, en la zona de pH neutro (señalada en la figura como p56 y p45 con flechas huecas). La presencia de polipéptidos de 30 kDa, de características ácidas no se vio modificada en este estadio de imbibición. Asimismo, se registró la aparición de otros polipéptidos de idéntica masa molecular pero alojados en la zona de pH neutro (señalado como grupo 1 con línea discontinua). Estos polipéptidos probablemente provengan de la escisión del p56 y/o podrían haberse formado a partir de la solubilización de agregados insolubles cuyo ingreso al gel se habría visto impedido en estadios anteriores.

Los polipéptidos indicados en la figura como 2, 3 y 4 con masas moleculares entre 20,1 y 14,4 kDa podrían ser productos de hidrólisis formados a partir de los polipéptidos ácidos de 30 kDa y/o de polipéptidos de 45 y 56 kDa.

Los polipéptidos de características alcalinas y con una masa molecular de alrededor de 20 kDa, señalado en la figura con la letra (**B**), permanecieron constantes durante el tiempo de hidrólisis ensayado.

Haciendo una comparación entre la fracción albúminas y las globulinas a 15 h, se puede observar que varios de los productos de hidrólisis formados se encuentran presentes en ambas fracciones. Algunos de los polipéptidos ácidos de 30 kDa (**A**) de la fracción globulinas y de los

identificados como grupo 1 (**Figura 33 B**) podrían corresponderse con los polipéptidos de la fracción albúminas identificados con las letras **d-g** (**Figura 32 B**). Los productos de hidrólisis con una masa molecular aproximada de 20 kDa, encontrados en la fracción globulinas de características neutras e identificados en la **Figura 33B** como **3** y **4** podrían hallarse entre los polipéptidos de idénticas características en la fracción albúminas.

El último tiempo de hidrólisis estudiado fue el de 48 h, cuyo perfil electroforético se presenta en la **Figura 33 C**. Se registran nuevos productos de hidrólisis de características ácidas (señalados con flechas llenas en la figura **C** y **D**) pero con masas moleculares entre los 30-20,1 kDa. Los productos de hidrólisis formados en el estadio anterior de alrededor de 20 kDa y de características ácidas (grupos **2, 3** y **4**; **Figura 33 B**) desaparecieron a las 48 h.

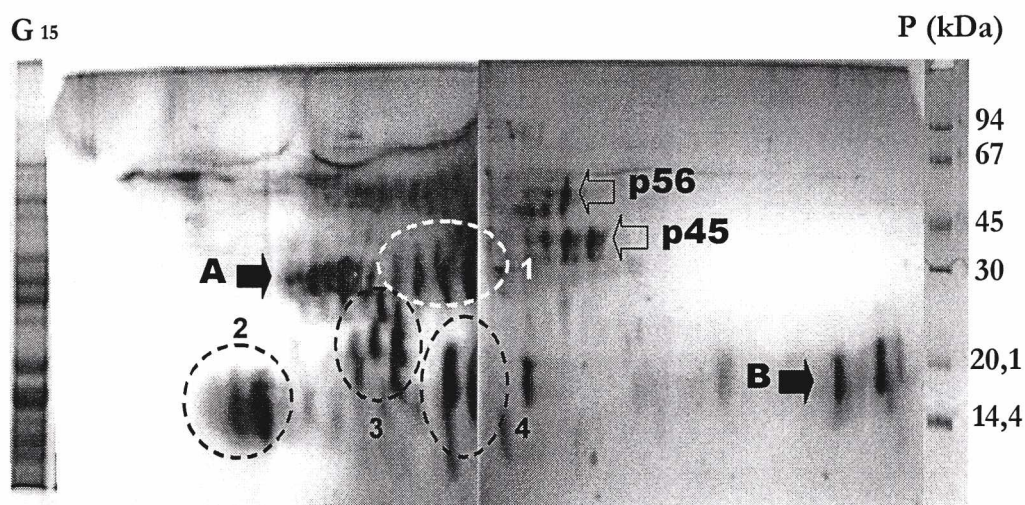


Figura 33B Isoelectroenfoque de la fracción globulinas con 15 h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**G₁₅**). Geles de acrilamida 12%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (en patrones y fracción proteica); tinción con plata (isoelectroenfoque).

A pesar de los cambios registrados en la naturaleza de los productos formados, los polipéptidos básicos de 20 kDa permanecieron sin hidrolizar aún a las 48 horas de imbibición.

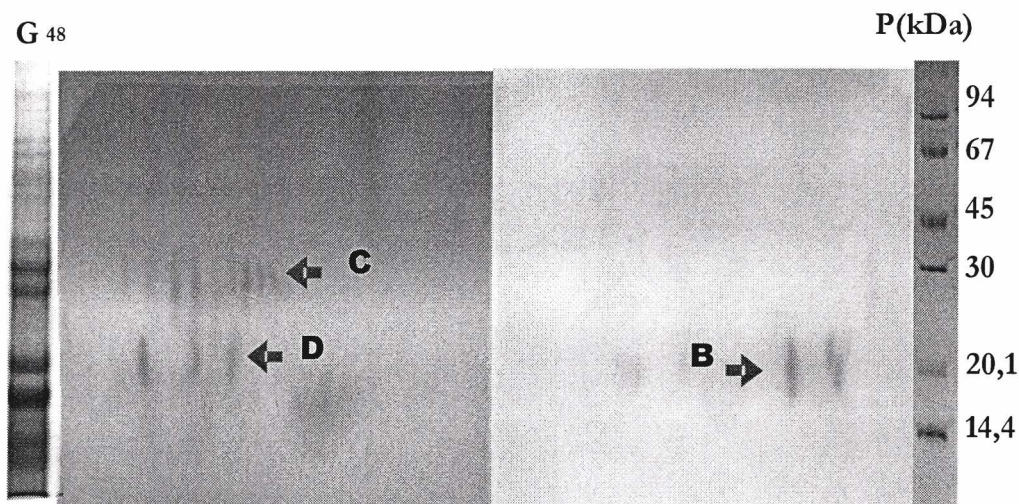


Figura 33 C Isoelectroenfoque de la fracción globulinas con 48 h realizada en condiciones desnaturalizantes con tratamiento reductor. A los costados de la figura se muestran los patrones de peso molecular (**P**) y el perfil electroforético de la fracción (**G₄₈**). Geles de acrilamida 12%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (patrones, fracción proteica e isoelectroenfoque).

Con el objeto de conocer las posibles modificaciones conformacionales de las distintas moléculas durante la movilización, se estudió el comportamiento de las fracciones proteicas a diferentes tiempos de imbibición mediante PAGE-nativo y cromatografía de exclusión molecular. En la **Figura 34 A** se muestran los resultados de PAGE-nativo.

Al igual que las electroforesis desnaturalizantes, los perfiles del PAGE-nativo de albúminas, globulinas y globulina-p mostraron cambios a partir de las 15 horas de imbibición.

Los perfiles de las albúminas de las semillas sin germinar presentaron, tal como fuera descrito en el Capítulo 1, una serie de bandas con diferente relación carga/masa. A partir de las 15 h se registró una disminución en la intensidad de las especies de baja movilidad y un incremento en la proporción de las de alta movilidad. A partir de las 24 horas de imbibición, sólo se hizo evidente la presencia de especies proteicas de alta movilidad electroforética que permanecieron hasta las 48 h.

La fracción globulina de semillas sin tratar (**Figura 34 A**, calle 0h, fracción globulinas) presentó un perfil electroforético con una banda mayoritaria que se correspondería con las moléculas hexaméricas de movilidad electroforética intermedia (indicada como 11S, en la figura) (Martínez y col., 1997) como así también algunas especies proteicas de baja movilidad. A partir de las 15 h, esta banda fue más móvil que la del control lo que indicaría la presencia de moléculas

de menor tamaño o mayor carga. Este cambio estaría relacionado con la degradación de algunos de sus polipéptidos como se observara en los análisis por SDS-PAGE. Asimismo, se presentaron especies de mayor movilidad electroforética, las cuales a medida que progresó el proceso, aumentaron su movilidad.

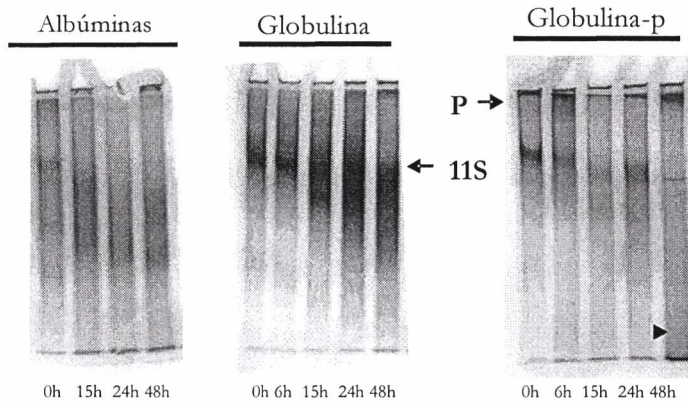
La fracción globulina-p de semillas sin germinar presentó un perfil electroforético similar al de la globulina, diferenciándose por la presencia de agregados que quedan retenidos en su mayor proporción en el punto de siembra (señalado como **P** en la figura). Al igual que la globulina, la banda más intensa se corresponde con las moléculas hexaméricas (Martínez y col. 1997).

Si bien los cambios en la movilidad electroforética de las especies proteicas mayoritarias de la globulina y globulina-p fueron muy similares entre sí, a partir de las 48 h se observaron especies de mayor movilidad electroforética en la globulina-p (indicado con una flecha llena en la Figura).

Se realizaron estudios inmunoquímicos de las diferentes fracciones proteicas en condiciones nativas, los que se presentan en la **Figura 34 B**. Los resultados obtenidos indicaron que las fracciones albúminas, globulina y globulina-p fueron reactivas frente al suero anti-Gp a lo largo de todo el proceso de germinación. A tiempos cortos de imbibición, todas las fracciones ensayadas presentaron reactividad en especies proteicas de baja movilidad electroforética como se mostrara en el Capítulo 1.

En la fracción albúminas, a partir de las 15 h (inicio de la post-germinación) las bandas de mayor movilidad, posibles productos de hidrólisis, mostraron reactividad con el antígeno. Esto nos hizo pensar en algunas alternativas posibles; una de ellas, sería que estas moléculas reactivas con movilidad electroforética intermedia puedan cumplir funciones de reserva de aminoácidos a lo largo de la germinación/post-germinación formando productos de hidrólisis también reactivos pero de mayor movilidad. La segunda, se originó a partir de la idea que las albúminas se encuentran conformadas por una gran cantidad de polipéptidos que se degradan a lo largo de la germinación/post-germinación. Algunos de ellos no cumplirían funciones de reserva pero podrían presentar superficies antigénicas reactivas al antisuero policlonal. Otra posibilidad sería que las globulinas puedan estar contaminando a las albúminas.

(a) PAGE-nativo



(b) Western blot (revelado con cloronaftol)

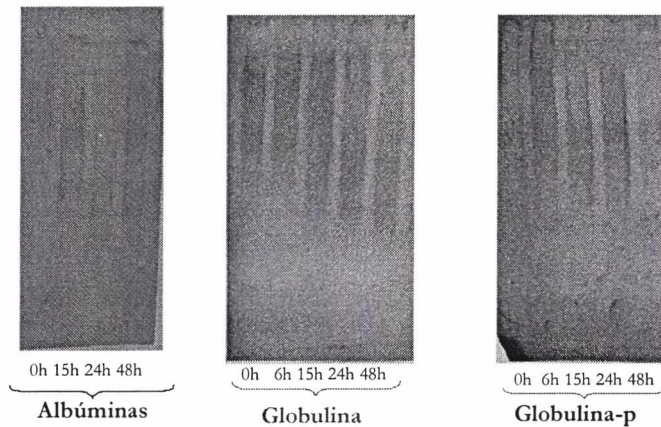


Figura 34: (a) PAGE-nativo de las fracciones proteicas de Amarantho obtenidas en diferentes estadios de germinación (0h, 15h, 24h y 48h de imbibición). **Tinción:** Coomassie Brilliant Blue. Geles de acrilamida: 7%. (b) Western blot (revelado por cloronaftol) a idénticos tiempos de imbibición que en la **Figura a** Geles de acrilamida 7%. Dilución de suero anti-gp: 1/500 (v/v) en Figura b.

En cuanto a las globulinas (globulina y globulina-p), ambas mantienen su reactividad hasta las 24 h. A partir de las 48 h la globulina-p es la que presenta menor reactividad en sus especies proteicas, mientras que la globulina mantiene su reactividad inmunoquímica. Los resultados obtenidos nos permitieron inferir que las moléculas hexaméricas de globulina y globulina-p mantienen su reactividad durante la germinación a pesar de los cambios de movilidad. Asimismo las especies de mayor movilidad presentes a partir de las 15 h, también se muestran reactivas al anticuerpo. Esta información estaría indicando que, a pesar de la degradación parcial de estas moléculas, las mismas no han perdido sus epítopes

conformacionales reactivos.

Continuando con los estudios de las moléculas no disociadas se analizaron las características de tamaño y forma de las moléculas pertenecientes a las distintas fracciones proteicas durante la germinación mediante cromatografía de exclusión molecular. Los cromatogramas obtenidos para cada una de las fracciones proteicas a los diferentes tiempos de imbibición se muestran en la **Figura 35**. Los ensayos con muestras obtenidas a tiempos intermedios entre 0 y 15 h de todas las fracciones proteicas no se realizaron, ya que los perfiles electroforéticos en condiciones nativas no presentaron diferencias con respecto al control.

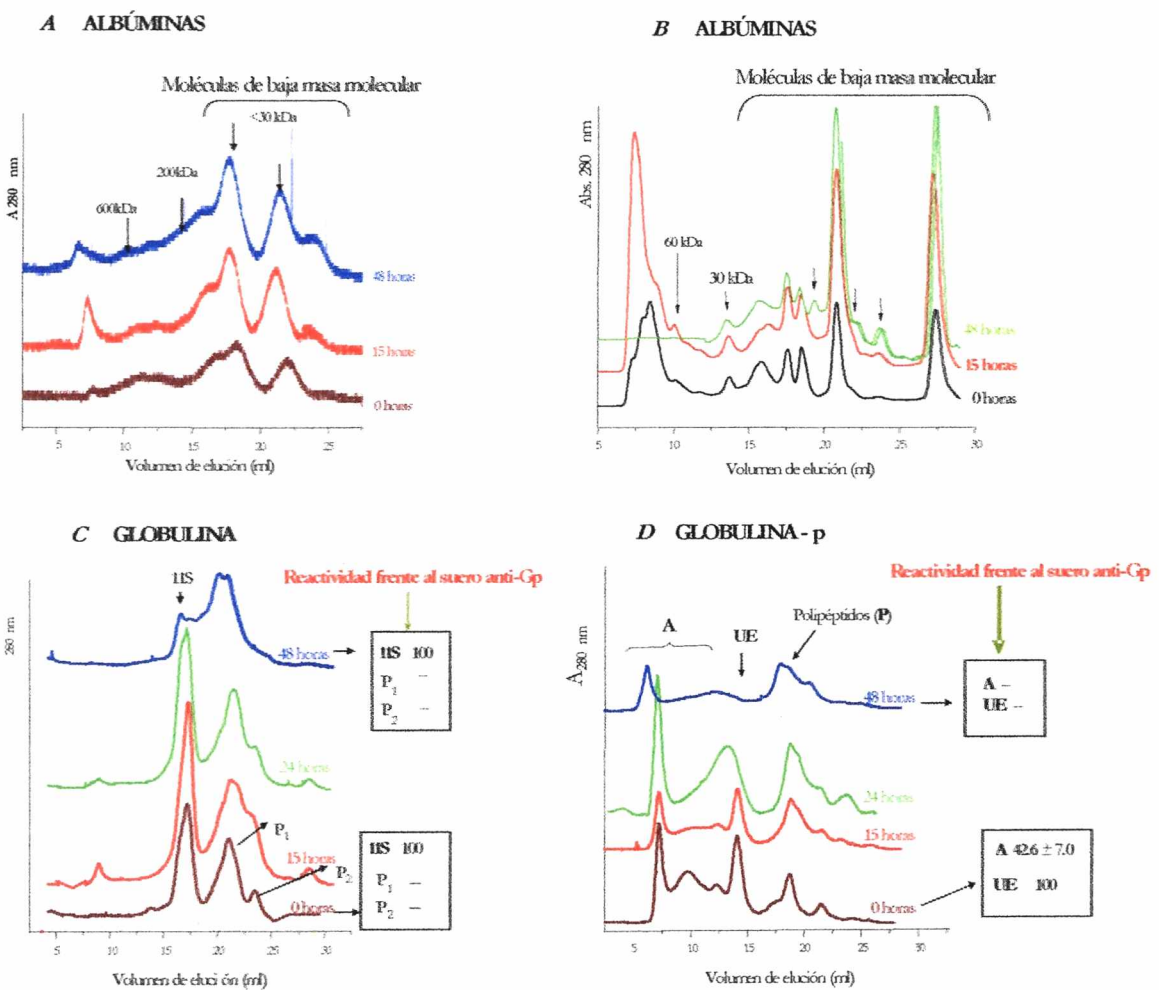


Figura 35: Cromatografía de exclusión molecular de las diferentes fracciones proteicas a diferentes tiempos de imbibición indicados en cada caso **A.** Albúminas (Superdex-75) **B.** Albúminas (Sephacryl S-300) y **C.** Globulina (Superose 6B) y **D.** Globulina-p (Sephacryl S-300). En los insertos de globulina y globulina-p se muestran los porcentajes de reactividad relativa medidos por ELISA de diferentes moléculas eluidas a 0h y 48h. Globulina 11S: moléculas hexaméricas y P₁ y P₂: moléculas diferentes de elevados volúmenes de elución. Globulina-p: A: agregados de alta masa molecular, UE: unidades estructurales y P: polipéptidos.

Al igual que lo mostrado en el Capítulo 1 los análisis de la fracción albúminas se realizaron utilizando dos tipos de relleno, con diferente rango de exclusión. Los perfiles cromatográficos de esta fracción (**Figura 35 A**) no presentaron grandes cambios a lo largo del proceso de imbibición hasta las 48 h. La modificación más importante fue la aparición de especies proteicas con volúmenes de elución elevados (**Figura 35 A**), señalados como moléculas de baja masa molecular).

Como ya se mostrara en el capítulo anterior, las moléculas de menor tamaño se analizaron utilizando el relleno Superdex-75. Los cromatogramas (**Figura 35 B**) mostraron la aparición de nuevas especies, probablemente productos de hidrólisis, recién a las 48 h (señalados con flechas llenas en la misma Figura) ya que a tiempos más cortos de imbibición no se evidenciaron cambios significativos.

El cromatograma de la fracción globulina sin germinar (**Figura 35 C**), presentó un pico mayoritario formado por las moléculas hexaméricas con una masa molecular aproximada de 280 kDa y por especies con volúmenes de exclusión más elevados (señalados como P_1 y P_2). Los perfiles cromatográficos de la globulina, mostraron una disminución en la proporción de las moléculas hexaméricas (11S) a las 48 h. Las especies con mayores volúmenes de elución (P_1 y P_2), mostraron un aumento con respecto a la fracción control entre las 15 h y las 24 h. A las 48 h, el perfil cromatográfico presentó cambios significativos con respecto a los perfiles mostrados en los estadios anteriores. Sobre esta misma fracción proteica se realizaron análisis inmunoquímicos utilizando el antisuero policlonal de conejo. Se ensayaron muestras provenientes de los picos denominados 11S, P_1 y P_2 de las fracciones control y 48 h. Los resultados obtenidos en este ensayo (mostrados en el inserto de la **Figura 35 C**) nos permitieron inferir que el pico denominado 11S mantuvo su reactividad inmunoquímica a lo largo de todo el tiempo del ensayo mientras que las moléculas P_1 y P_2 no presentaron en ninguna instancia reactividad frente al antisuero. Los perfiles cromatográficos de la fracción globulina-p a diferentes estadios de imbibición se presentan en la **Figura 35 D**. El control sin germinar mostró una zona de elución de agregados (**A**) con una masa molecular mayor a los 600 kDa y un volumen de elución próximo a los 7 ml. La siguiente zona del cromatograma corresponde a la elución de las moléculas hexaméricas ó unidades estructurales (**UE**) con una masa molecular aproximada de 280 kDa y un volumen de elución alrededor de los 15 ml. La elución de los polipéptidos (**P**) se encuentra en la última zona del cromatograma (luego de la elución de las unidades estructurales) con una masa molecular aproximada a 56 kDa. Los cambios que se producen en la globulina-p como

consecuencia de la movilización comienzan a partir de las 15 h, donde puede observarse un aumento en la proporción de moléculas eluidas a volúmenes elevados con respecto a la fracción control. A las 24 h, se produjo un aumento de los agregados de baja masa molecular, junto con un aumento de los agregados de alta masa molecular que eluyen en el volumen muerto. Este aumento podría explicarse considerando que los agregados de alta masa molecular provienen de la desagregación y solubilización de agregados insolubles. El análisis inmunoquímico realizado sobre los agregados y las moléculas unitarias UE (**Figura 35 D**) de la globulina-p revelaron que las UE son las especies proteicas con la máxima reactividad de la fracción sin germinar. A las 48 h, tanto las UE como los agregados perdieron su reactividad, lo que sugiere que, luego de este tiempo, las moléculas de globulina-p han sufrido modificaciones que ocasionaron la pérdida de sus epítopes reactivos. Estos resultados difieren con los obtenidos en los PAGE-nativo, las diferencias encontradas podrían deberse a la menor cantidad de proteína eluida presente en las cromatografías; lo que se vería reflejado en la ausencia de reactividad frente al anticuerpo.

Proteínas internas y externas a los cuerpos proteicos.

Para estudiar los cambios morfológicos que sufren los cuerpos proteicos a lo largo de la germinación, se realizaron microscopías ópticas de cortes de semillas a diferentes tiempos de imbibición. Los tiempos estudiados fueron los siguientes: un control sin germinar, otro al culminar el período de germinación (15 h) y el último durante la post-germinación (48 h). Las fotos obtenidas se muestran en la **Figura 36**. La preparación control (**Figura 36; 0h; foto 1**), mostró la disposición de los cuerpos proteicos en la célula vegetal como vacuolas teñidas densamente en color violeta con una distribución uniforme en las diferentes capas celulares. En algunas vacuolas se hace evidente la presencia de una región refringente que podría ser el globoide de fitina. En las preparaciones con mayores tiempos de imbibición (ya sea a 15 h o 48 h), se pudo observar el aumento en el tamaño de dichas vacuolas en algunas capas celulares (**Figura 36; 15 h fotos 2 y 3**), propio del inicio de la etapa de degradación, como fuera descrito en la Introducción. Asimismo a las 48 h (**Figura 36, 48 h; fotos: 4 y 5**) se puso de manifiesto la disminución en la intensidad de la coloración de las vacuolas de reserva en varias capas celulares (indicado en la foto 5). En este estadio se hizo mucho más significativo el volcado al citoplasma del contenido de las vacuolas, hecho que se puso de manifiesto al compararlo con el estadio previo de 15 h.

Conociendo el comportamiento inmunoquímico de las fracciones proteicas con diferente grado de imbibición se analizó la reactividad inmunoquímica de las fracciones ubicadas en el citoplasma (**SNC**) y en el interior de los cuerpos proteicos (**CPC**) a lo largo de la germinación. El ensayo se realizó en condiciones desnaturalizantes y los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 37**. La movilización en los cuerpos proteicos se inició a las 15 h, donde se pudo observar la disminución del p56 respecto al control (**Figura 37, CPC calle 15 h**). La mayor tasa de movilización se registró a las 48 h siendo lo más evidente en dicho perfil la disminución del p56 (**Figura 37, calle 48 h, CPC**).

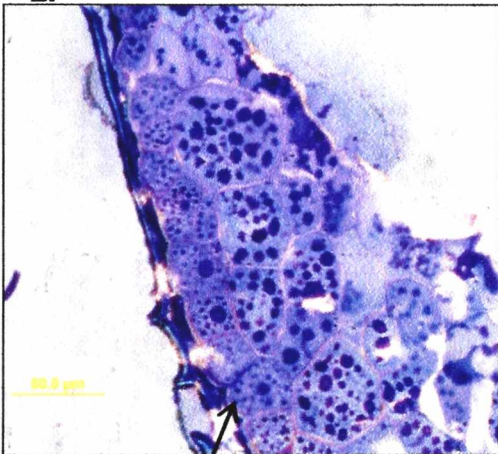
Los resultados obtenidos por western blot, mostraron una pérdida de reactividad inmunoquímica del p56 en los cuerpos proteicos a las 48 h. Las proteínas externas a los cuerpos proteicos comenzaron a degradarse a las 15 h, en este caso, al igual que para las albúminas, los primeros polipéptidos en movilizarse fueron los de alta masa molecular.

1. 0 horas de imbibición



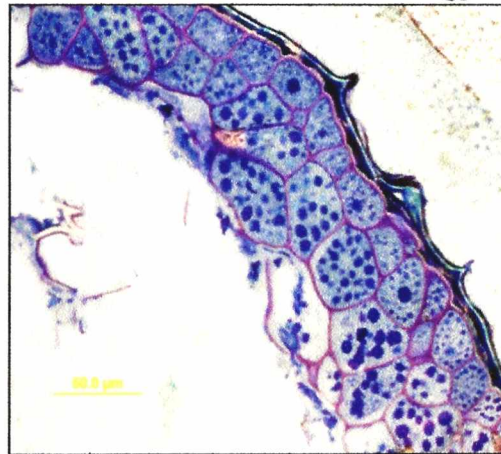
20 μm

2. 15 horas de imbibición (inicio de la post-germinación) 3.



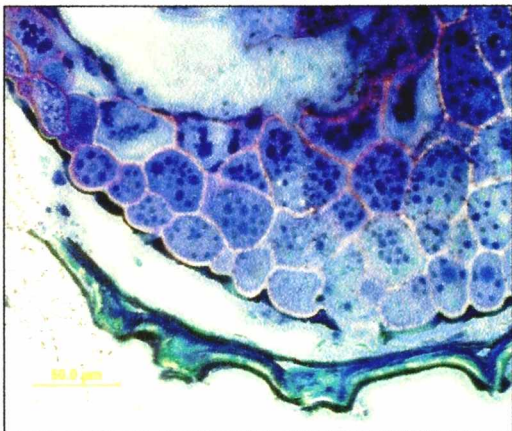
50 μm

Cuerpo proteico de menor tamaño

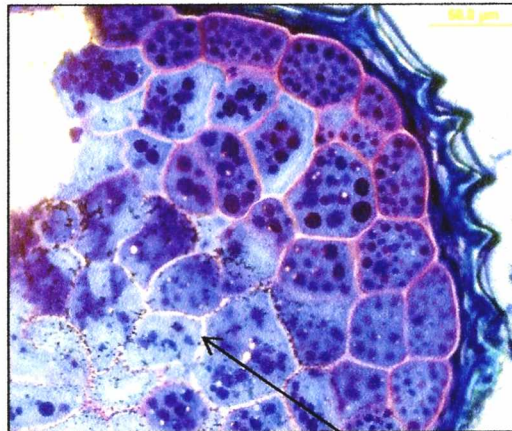


50 μm

4. 48 horas de imbibición (post-germinación) 5.



50 μm



50 μm

Célula con mayor grado de hidrólisis de sus cuerpos proteicos.

Figura 36: Microscopía óptica de semillas a diferentes tiempos de imbibición. 0h: (sin germinar) foto 1: escala 20 μm ; Inicio de la post-germinación (15 horas de imbibición) fotos 2 y 3: escala 50 μm y Post-germinación: (48 horas de imbibición) fotos 4 y 5: escala 50 μm .

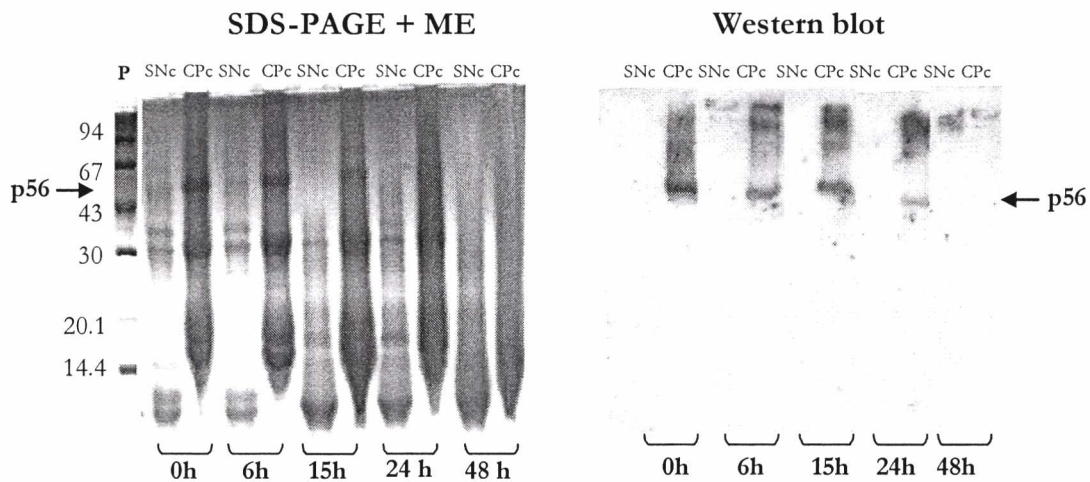


Figura 37: SDS-PAGE con tratamiento reductor y western blot de las fracciones proteicas externas (SNc) e internas (CPc) a los cuerpos proteicos a lo largo de la germinación. Tiempos de imbibición: 0h: sin germinar, 6h, 15h, 24h y 48h. Dilución de suero anti-gp: 1/1000 v/v. Los patrones de peso molecular (P) se ubican en el margen izquierdo de la figura.

El western blot de la fracción SNc, no presentó reactividad a ningún tiempo de imbibición. La tenue reactividad en la fracción SNc que puede observarse en los puntos de siembra en algunos estadios de imbibición podría deberse a una contaminación de naturaleza globulínica proveniente de la ruptura de algunos cuerpos proteicos durante la preparación de dichos extractos como consecuencia de una mayor fragilidad de los mismos durante la germinación. Es importante señalar que la degradación de las proteínas internas a los cuerpos proteicos a partir de las 15 h, no es tan evidente como en las fracciones globulínicas (globulina, globulina-p y glutelinas) extraídas de la harina. Esta diferencia podría deberse a la metodología de extracción utilizada en cada caso. Los extractos de cuerpos proteicos utilizados en este ensayo están conformados por una mezcla de todos los componentes globulínicos (globulina, globulina-p y glutelinas) por consiguiente teniendo en cuenta que la fracción glutelinas es más tardíamente degradada su presencia enmascararía la degradación de las otras fracciones.

Se realizaron electroforesis en condiciones nativas de las fracciones proteicas extraídas de los cuerpos proteicos y de las proteínas externas a los mismos provenientes de semillas sometidas a imbibición durante distintos tiempos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 38**.

Como ya fuera descrito, las proteínas citoplasmáticas (SNC) presentaron perfiles electroforéticos similares a los de la fracción albúminas. Los resultados obtenidos mediante PAGE-nativo mostraron que las proteínas externas tienen un comportamiento similar al de

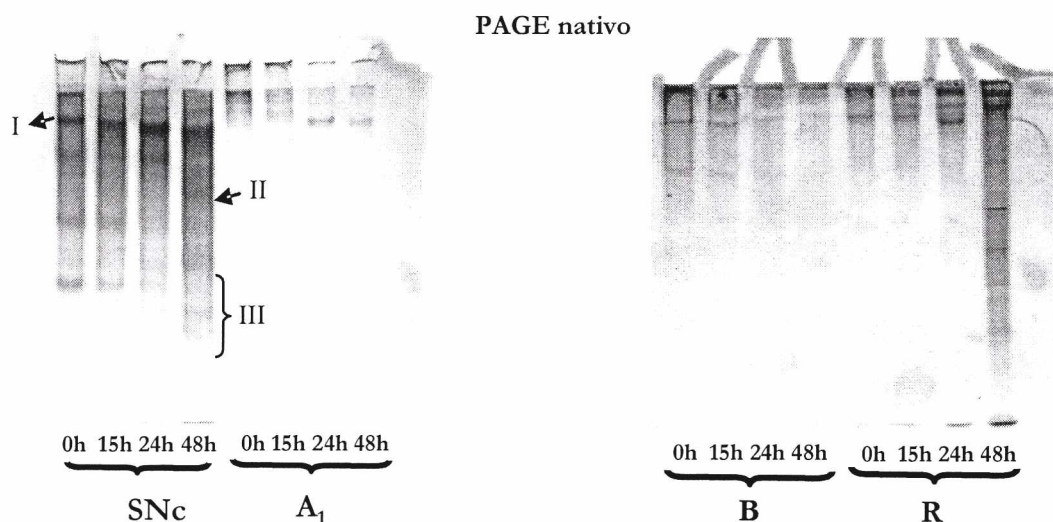


Figura 38: PAGE-nativo de sobrenadante y fracciones extraídas a partir de cuerpos proteicos a diferentes tiempos de imbibición. **0h.** 0 horas de imbibición, **15h.** 15 horas de imbibición, **24h.** 24 horas de imbibición y **48h.** 48 horas de imbibición. **SNC:** sobrenadante de cuerpos proteicos, **A₁:** extracción con agua, **B:** extracción con buffer salino y **R:** insoluble de fracciones. Geles de acrilamida 10%. **Tinciones:** Coomassie Brilliant Blue (**SNC** y **A₁**) Tinción con plata (**B** y **R**).

las albúminas durante la germinación. Es así que se puede observar en la **Figura 38** (fracción **SNC**) que a partir de las 15 h se produce un cambio en la movilidad de las proteínas cercanas al punto de siembra que forman la banda **I** (señalada con fecha llena en la figura). En paralelo se registra un aumento y aparición de especies proteicas de alta movilidad (**III**, señalada con una llave en la figura) a partir de las 24 h y una banda intensa de movilidad intermedia (**II**) a las 48 h. Estas proteínas podrían corresponder a productos de hidrólisis o a moléculas sintetizadas *de novo*. En la fracción extraída con agua de los cuerpos proteicos control (**A₁** calle 0 h), se evidenció la presencia de especies proteicas de baja movilidad electroforética asemejándose al perfil obtenido para las globulinas en el PAGE-nativo. Esta fracción a partir de las 15 h, mostró un aumento en la movilidad de la banda más importante, probablemente como consecuencia de la degradación. No se evidenció la aparición de productos de alta movilidad electroforética a lo largo de la imbibición. La fracción extraída con buffer salino (**B**) no mostró modificaciones detectables, esto podría deberse a la baja concentración proteica de la muestra o a la falta de alteración de las

mismas durante el período ensayado. Los perfiles electroforéticos pertenecientes al insoluble (**R**) de las fracciones proteicas del control sin germinar no presentaron cambios hasta las 24 h. La presencia de especies proteicas de movilidad intermedia a elevada nos sugirió que estas últimas podrían provenir de la degradación de globulinas comportándose como remanentes con diferente grado de agregación. Los resultados obtenidos sugieren que las fracciones que sufren mayores cambios serían las proteínas citoplasmáticas y la fracción extraída con agua de los cuerpos proteicos no ocurriendo lo mismo para la fracción que fuera extraída con buffer con mayor fuerza iónica.

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS INVOLUCRADAS EN LA MOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE LA GERMINACIÓN.

Como se mencionara en la introducción, las enzimas intervinientes en el proceso de germinación son sintetizadas y almacenadas en compartimentos vacuolares específicos, la mayor parte como precursores inmaduros que requieren de un procesamiento posterior para volverse activos. La germinación, es quien induce la expresión y el procesamiento de estas proteasas en sus formas activas para desempeñar diferentes funciones (Rojo y col. 2003). Tal como fuera descrito, las proteasas cisteínicas junto con las legumainas son las responsables mayoritarias de la degradación de las proteínas de reserva durante la germinación. Posteriormente, durante la post-germinación estas proteínas ya modificadas servirían de sustrato para proteasas sintetizadas *de novo* (Schlereth y col. 2000; Müntz y col. 1998). Con el objeto de determinar la ubicación de las proteasas en las semillas de amaranto y el momento del proceso de germinación en el que aumentan su actividad, se realizaron análisis de actividad proteásica en las fracciones interna y externa a los cuerpos proteicos. Para ello se utilizó el mismo protocolo descrito en la sección anterior, de manera de asegurar que la actividad proteásica encontrada se correspondiera con la actividad citoplasmática (**SNc**) y la del interior de los cuerpos proteicos (**CPC**). Se realizaron ensayos adicionales de determinación de actividad enzimática donde se utilizaron proteínas citoplasmáticas clarificadas por ultracentrifugación (**SNs**). La actividad proteolítica fue detectada mediante zimogramas (ver Materiales y Métodos). Es importante señalar que las cantidades de proteína sembradas de los sobrenadantes (**SNc** o **SNs** de acuerdo al extracto de partida utilizado) y de los cuerpos proteicos (**CPC**) no fueron equivalentes, por esta razón los resultados de estos análisis nos dan sólo una idea cualitativa de la presencia de proteasas en las fracciones estudiadas.

y de los cuerpos proteicos (CPc) no fueron equivalentes, por esta razón los resultados de estos análisis nos dan sólo una idea cualitativa de la presencia de proteasas en las fracciones estudiadas.

En la **Figura 39A** se muestran los zimogramas realizados a pHs entre 3,3 y 6,0 de las proteínas de CPc y de SNc provenientes de semillas sin germinar.

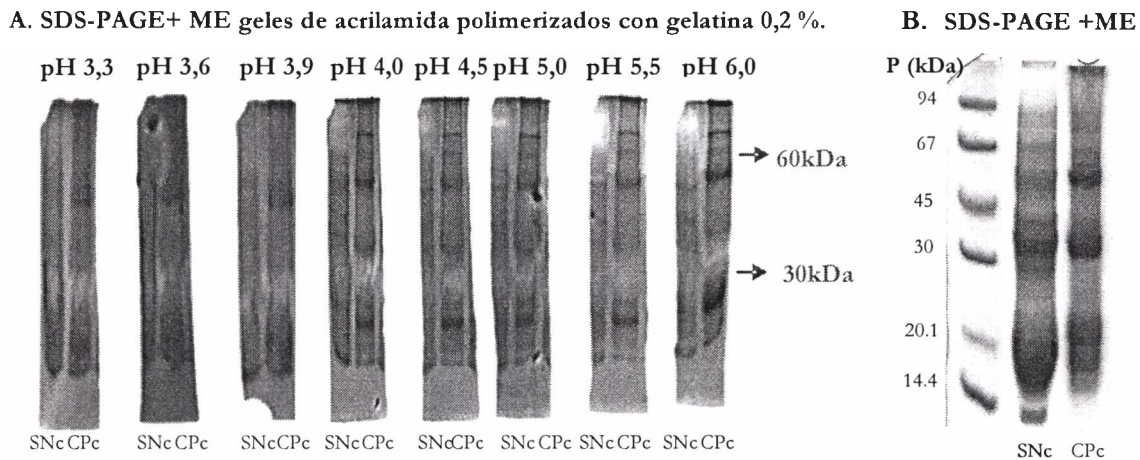


Figura 39: **A.** Zimogramas de proteínas externas a cuerpos proteicos (SNc) e internas (CPc) a diferentes pHs. **B.** SDS-PAGE con tratamiento reductor de las mismas fracciones. Geles de acrilamida: 12%.

En la **Figura 39 B**, se adjuntaron los perfiles obtenidos de las proteínas internas y externas a los cuerpos proteicos en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se puede observar actividad proteolítica en ambas fracciones estudiadas, actividad ubicada en un polipéptido de aproximadamente 30 kDa. La actividad proteásica de este polipéptido fue mucho más evidente en las proteínas del interior de los cuerpos proteicos (CPc) que las del exterior (SNc) y se encuentra presente en todo el rango de pHs estudiados aunque se hace más intensa a los pHs 4,0 y 6,0. Los perfiles de las proteínas del compartimento exterior de los cuerpos proteicos presentaron también, un polipéptido activo a pHs 5,0 y 6,0 con una masa molecular superior a los 60 kDa.

Posteriormente, se estudió el comportamiento de las proteasas correspondientes al interior de los cuerpos proteicos y al citoplasma a lo largo de la germinación. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante dos experiencias independientes a pH 4,0 y 5,5 (**Figura 40**) y a pH 5,5 y 8,0 (**Figura 41**) utilizando las mismas preparaciones proteicas.

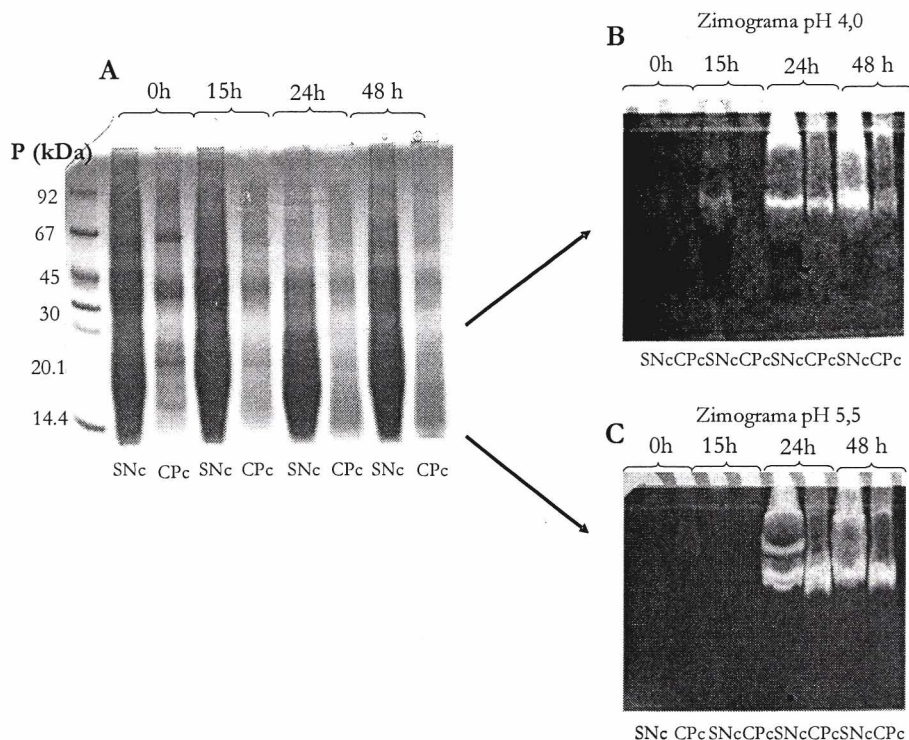


Figura 40: A. SDS-PAGE con tratamiento reductor de las fracciones proteicas del interior (**CPe**) y exterior de cuerpos proteicos (**SNe**) a diferentes tiempos de imbibición. B. Zimograma a pH 4,0 de las fracciones proteicas del interior y exterior de cuerpos proteicos a diferentes tiempos de imbibición. C. Zimograma a pH 5,5 de las fracciones proteicas del interior y exterior de cuerpos proteicos a diferentes tiempos de imbibición. En la parte superior de los geles se indican los tiempos de imbibición.

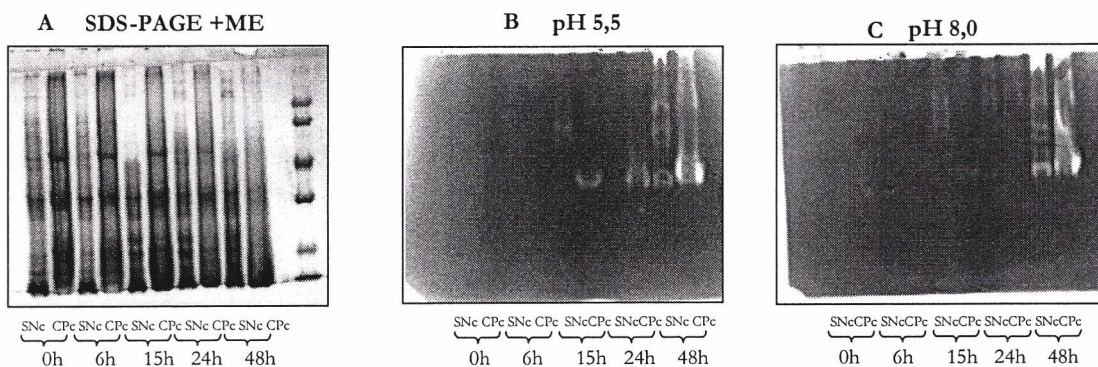


Figura 41: A. SDS-PAGE+ME. Proteínas externas (**SNe**) e internas (**CPe**) a los cuerpos proteicos a diferentes tiempos de imbibición 0h (control), 6h, 15h, 24h y 48h. Zimogramas de las mismas fracciones a los mismos tiempos de imbibición. B. a pH 5,5 y C. a pH 8,0.

Si comparamos los resultados de estas experiencias con los de las fracciones sin germinar (**Figura 39**) se puede observar que los mismos no son coincidentes en cuanto a que en las **Figuras 40 y 41**, no se observa la presencia de proteasas en semillas sin germinar. Es probable que esta diferencia se deba a la existencia de variables experimentales que se desconocen y, por lo tanto, no se han podido controlar. Teniendo en cuenta estas diferencias se pueden sacar algunas conclusiones. En la **Figura 40** se puede observar que a las 15 h se hace evidente la presencia de actividad proteásica a pH 4,0 solo en la fracción citoplasmática. La ausencia de actividad en los cuerpos proteicos a este tiempo (**Figura 40 C, CPc** calle: 15h) pudo deberse a la baja cantidad de proteínas que contenía esta fracción. Por esta razón, no hubo evidencia suficiente que nos permitiera descartar la presencia de proteasas en el interior de los cuerpos proteicos. La actividad proteolítica fue más acentuada a partir de las 24 h, coincidente con la etapa de post-germinación. A pH 4,0 tanto el **SNc** como los **CPc** presentaron un péptido activo con una masa molecular aproximada de 30 kDa y otros péptidos activos con baja movilidad electroforética. A pH 5,5 los resultados obtenidos fueron similares a los de pH 4,0 a excepción de la presencia de bandas adicionales con movilidad electroforética intermedia en la fracción citoplasmática (**Figura 40 C, SNc** calle: 24 h). En la experiencia mostrada en la **Figura 41** la actividad enzimática detectada fue inferior a las experiencias anteriores, probablemente debido a la variabilidad mencionada o a la cantidad de proteína presente. De todas formas, cuando se compara la actividad proteásica a pHs 5,5 y 8,0 (**Figura 41**) se puede observar que la banda de 30 kDa se hace más evidente a pH 5,5 que a pH 8,0. Se pudo observar también que la proteasa de 30 kDa, presente en el interior de los cuerpos proteicos se muestra activa a 15 y 24 h mientras que en las condiciones estudiadas no se pudo detectar actividad de proteasas de mayor tamaño. Estos resultados sugieren que a los tiempos de imbibición estudiados las proteasas de menor movilidad son menos activas que las de 30 kDa.

Se realizaron zimogramas de las proteínas citoplasmáticas purificadas por ultracentrifugación a diferentes tiempos de imbibición utilizando las mismas condiciones de pH (5,5 y 8,0) descritas para los ensayos anteriores. La finalidad de estos ensayos radicó en la necesidad de asegurarse que las proteasas detectadas en la fracción citoplasmática no provenían de la contaminación por cuerpos proteicos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 42**.

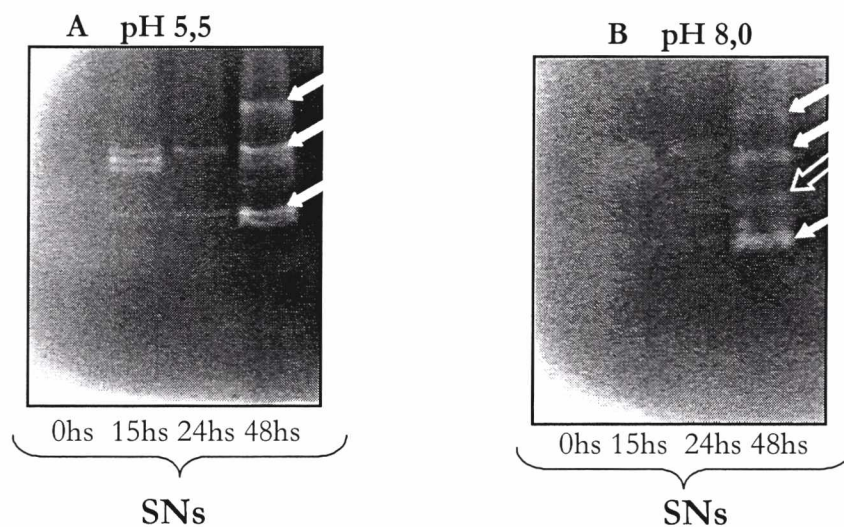


Figura 42: Zimogramas realizados a diferentes tiempos de germinación de las proteínas citoplasmáticas con mayor grado de purificación (SNs) **A.** pH 5,5 y **B.** pH 8,0.

La actividad proteolítica de esta fracción se detectó a partir de las 15h a ambos pHs. A pH 5,5; tanto a las 15h como a las 24h aparecen dos polipéptidos activos (indicados en la figura con flechas llenas blancas), el de menor movilidad electroforética presenta una mayor actividad el de mayor movilidad correspondería al de 30 kDa por comparación con otros geles. A las 48 h, la intensidad en la actividad enzimática se ve aumentada, produciéndose además la aparición de un tercer polipéptido de actividad equivalente pero con menor movilidad electroforética. A diferencia del zimograma realizado a pH 5,5 a todos los tiempos de hidrólisis analizados a pH alcalino, la intensidad enzimática se vio disminuida. En estas condiciones no se evidencia la actividad proteolítica de mayor movilidad a las 15 y 24h. A las 48h están presentes las tres bandas de actividad detectadas a pH 5,5 y una cuarta de movilidad intermedia (indicada con una flecha hueca). Estos resultados sugieren que en la fracción de proteínas externas purificadas la presencia, en muy baja proporción, de la proteasa de 30 kDa podría provenir de vestigios de contaminantes de cuerpos proteicos. Su presencia a tiempos más largos de imbibición se podría explicar como proveniente de una mayor ruptura de cuerpos proteicos (**Figura 36**) o bien a su síntesis de novo.

Se analizaron las proteasas presentes en las fracciones provenientes del tratamiento de los cuerpos proteicos con distintos solventes. Esta experiencia se llevó a cabo, con la finalidad de

obtener información que nos permita hacer inferencias sobre la ubicación de las proteasas en el interior de los cuerpos proteicos.

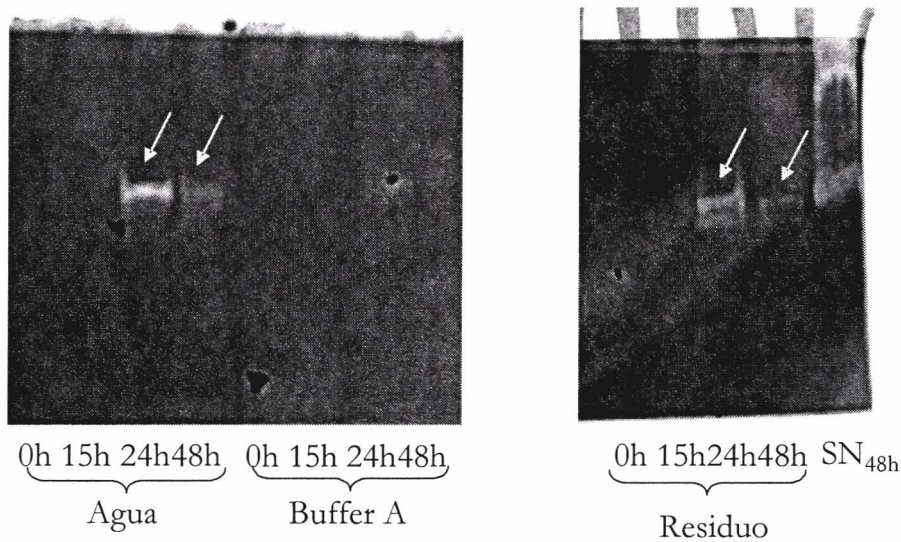


Figura 43 Zimograma realizado a pH 5.5 de las fracciones proteicas extraídas en forma secuencial a partir de una preparación de cuerpos proteicos. (Agua, Buffer A: extracción con buffer salino NaCl 0,4 M pH 7.5, Residuo: fracción insoluble y. SN_{48h}: proteínas externas a los cuerpos proteicos con 48 horas de imbibición.

Los resultados obtenidos (**Figura 43**) muestran la presencia de la proteasa de 30 kDa a partir de las 24 h, tanto en la fracción extraída con agua como en el residuo (**Figura 43; Agua y Residuo**). No podría asegurarse la ausencia de actividad proteásica en la fracción extraída con buffer A, dado que la baja cantidad de proteína sembrada podría ser la causante de su falta de detección. Asimismo, la disminución de actividad a las 48 h podría atribuirse a la razón mencionada anteriormente. Este ensayo, nos sugiere que dicha proteasa tendría diferentes localizaciones en el interior del cuerpo proteico, tanto acompañando a las proteínas solubles a baja fuerza iónica como a aquellas que presentan mayor agregación.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados hasta aquí han mostrado que los cambios sufridos por las distintas proteínas de amaranto se producen durante las etapas tempranas de su movilización. De

acuerdo a lo observado las proteínas comienzan a degradarse alrededor de las 15 h, correspondiendo al inicio de la etapa de post-germinación, que involucra a lo descrito como Fase III en la Introducción. Se podría inferir por lo tanto que el aporte de aminoácidos para el crecimiento de la plántula durante la post-germinación, provendría de las albúminas, globulinas y globulina-p en primera instancia, mientras que las glutelinas serían degradadas más tardíamente. Es de destacar la importante proporción de proteínas que son degradadas en la fracción albúminas, lo que nos llevó a pensar que la albúmina serviría de reservorio inicial de aminoácidos, siendo sus especies de menor movilidad electroforética las que más rápidamente se movilizan. En principio, las proteínas pertenecientes a esta fracción comprenderían aquellas con funciones diferentes a la de almacenamiento y no se esperaría una temprana degradación tan significativa. Así por ejemplo, durante la germinación de *Vicia sativa*, Schlereth y col (2000), informaron que la fracción albúminas sufre modificaciones solamente en algunos polipéptidos pertenecientes a la familia de las lectinas, sin presentar una movilización tan importante como en el amaranto. Se ha propuesto que las lectinas podrían presentar una función parcial de reserva sobre todo por su abundancia en semillas. Sin embargo, debe hacerse mención que algunas lectinas se encuentran involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas contra plagas (Peumans y col 1999). Las albúminas de amaranto degradadas durante la germinación no se correspondieron con las lectinas descritas hasta el momento (Segura-Nieto y col 1994) pero no puede descartarse que alguna de estas proteínas no sean especies que, por alguna razón, hayan adquirido la función de almacenamiento. Correlacionado con esta propuesta, se encuentran los resultados inmunoquímicos presentados en el Capítulo 1, que han mostrado a ciertas especies proteicas -de menor movilidad electroforética- pertenecientes a la fracción albúminas, exhibiendo epitopes conformacionales reactivos al suero anti-Gp.

Si bien la globulina y la globulina-p presentaron perfiles de movilización similares, especialmente en las electroforesis desnaturizantes, los resultados de la cromatografía de exclusión molecular y las electroforesis en condiciones no desnaturizantes, mostraron que la globulina-p presenta cambios conformacionales mayores que las globulinas a las 24 y 48 h. Este comportamiento resulta curioso ya que, de acuerdo a resultados de nuestro laboratorio (A. Quiroga, comunicación personal), la globulina-p es una fracción de moléculas de globulina 11S que presenta un mayor grado de agregación. Se podría esperar que estas moléculas agregadas presenten mayor estabilidad conformacional frente al ataque hidrolítico durante la germinación. Por otro lado, una diferencia destacable entre globulina 11S y globulina-p, es que esta última

presenta una mayor proporción del polipéptido de 56 kDa (p56) (Martínez y col., 1997; Castellani y col 2000) siendo este uno de los polipéptidos más tempranamente degradados durante la germinación. Esta diferencia explicaría por qué las moléculas de globulina-p, sufrirían cambios conformacionales ante la hidrólisis del p56, mientras que las moléculas de globulina 11S, más ricas en los polipéptidos A-SS-B se mantendrían estructuradas a pesar de que el polipéptido A de 30 kDa haya sido parcialmente degradado.

Como discutiéramos anteriormente el p56 sería transformado en péptidos de alrededor de 30 y 20 kDa como resultado de su hidrólisis. Esta inferencia está en concordancia con lo expuesto por Müntz y col (2002), quienes postularon que, tanto en el desarrollo como en la germinación, la semilla toma ventaja de la doble función de las legumainas. Estas enzimas, proteasas de procesamiento vacuolar VPE en desarrollo y VsPB₂ durante la germinación, presentarían especificidad de corte similar. De acuerdo a los resultados obtenidos durante el proceso de germinación se estaría confirmando que el p56, se comporta como un polipéptido no procesado que contendría en su secuencia el sitio de corte para esta proteasa. Estas características y su ubicación en la arquitectura molecular, lo harían susceptible a la acción de las proteasas (legumainas y otras proteasas) quienes actúan durante los primeros estadios de la movilización de las proteínas de reserva. Posteriormente, durante la etapa de post-germinación esta proteína modificada sería el sustrato adecuado para el accionar de las demás proteasas.

La degradación más tardía de la fracción glutelinas, estaría relacionada con su alto grado de agregación. A pesar de que estas proteínas poseen una muy alta proporción del polipéptido p56, lo que las haría más vulnerables a la hidrólisis, es probable que dicho polipéptido se encuentre menos accesible a la acción de las proteasas.

La degradación de las proteínas de almacenamiento se llevaría a cabo mayoritariamente por una proteasa de alrededor de 30 kDa localizada mayoritariamente en el interior de los cuerpos proteicos (Schlereth y col., 2000). Dicha proteasa estaría distribuida en diferentes zonas del cuerpo proteico de forma tal que tendría acceso tanto a las globulina 7 y 11S, con menor grado de agregación, como a la globulina-p y glutelinas que se encuentran agregadas en mayor proporción. En la degradación de las proteínas de reserva estarían también involucradas proteasas de mayor masa molecular.

Las proteasas detectadas en el espacio citoplasmático estarían involucradas en la degradación de las proteínas de este compartimento. Estas proteasas cuyos pesos moleculares fueron superiores a 67 kDa presentaron actividad tanto a pH 5,0 como 8,0 lo cual nos permite

suponer que serían activas en el compartimento citoplasmático. Dado que estas proteasas también fueron detectadas en los cuerpos proteicos ellas estarían involucradas en la degradación de proteínas presentes en ambos compartimentos. La presencia a tiempos más largos de imbibición de una proteasa de movilidad intermedia propia del citoplasma nos sugiere que la misma podría desempeñar una función específica en el proceso de germinación. Schlereth y col (2000) encontraron que habría una familia de proteasas con una masa molecular mayor a los 70 kDa solo en el embrión de *Vicia sativa*. En el caso del amaranto y de acuerdo con los resultados encontrados, se podría proponer que las proteasas de menor movilidad electroforética podrían ser de origen embrionario.

Se detectó también la presencia en el citoplasma de la proteasa de 30 kDa, propia de los cuerpos proteicos, dado que su actividad fue menor en los sobrenadantes purificados no puede descartarse que no se trate de una contaminación proveniente de los cuerpos proteicos.

Tanto en el citoplasma como en los cuerpos proteicos, el incremento de actividad proteolítica es paralelo a la degradación observada en las distintas fracciones proteicas. Los resultados presentados muestran una coincidencia en tiempo y espacio entre la degradación de las proteínas y la presencia de las proteasas.

CONCLUSIONES GENERALES

Con el objetivo de aportar al conocimiento del proceso de germinación en el amaranto, en este trabajo hemos estudiado:

- La ubicación y la relación estructural entre las diferentes proteínas de amaranto.
- La movilización de dichas proteínas durante el proceso de germinación.

Las proteínas de almacenamiento de amaranto presentaron diferencias superficiales importantes con las de algunos cereales y Dicotiledóneas. Por otro lado las globulinas de amaranto mostraron mayor homología de superficie con globulinas de quinoa (de menor divergencia evolutiva con el amaranto) y en menor proporción con las proteínas de avena y girasol. Estos resultados no fueron concidentes a los presentados por Marcone y col. (1998), quienes habían sugerido la existencia de un mayor grado de homología entre las superficies moleculares de Mono y Dicotiledóneas.

En coincidencia con los resultados obtenidos por Konishi y col. (1991), hemos comprobado que las globulinas de amaranto se encuentran alojadas en el interior de los cuerpos proteicos. Las globulinas 7 y 11S se alojarían más superficialmente, y la globulina-p presentaría una ubicación más interna. Entre las proteínas de almacenamiento se ha caracterizado una globulina de bajo peso molecular, insoluble en soluciones de baja fuerza iónica.

Se observó que las proteínas pertenecientes a la fracción albúminas se encuentran ubicadas en el espacio citoplasmático. Parte de estas proteínas compartieron epítopes conformacionales con las proteínas de almacenamiento. Estos resultados nos sugirieron que ellas podrían presentar funciones de almacenamiento, propuesta avalada por la existencia de lectinas en otras especies con probable función de almacenamiento (Peumans y col. 1999). Sin embargo las lectinas descritas hasta el presente en amaranto (Segura-Nieto y col., 1994), no se correspondieron por su tamaño con las mencionadas previamente.

Proteínas de la fracción albúmina, globulinas (globulina 7 y 11S) y globulina-p comenzaron a degradarse al inicio de la post-germinación, mientras que las glutelinas serían utilizadas más tardíamente. No se pudo observar la movilización de la globulina de bajo peso molecular, por lo cual se desconoce el estadio en el cual podría ser utilizada.

En coincidencia con resultados obtenidos en *Vicia sativa* (Schlereth y col. 2000) y en *Beta vulgaris* L. (Job y col. 1997) el polipéptido más resistente a la movilización fue el de 20 kDa (B). En el amaranto los polipéptidos primeramente movilizados fueron, además del de 30 kDa, el

polipéptido no procesado que denominamos p56. Los primeros productos de hidrólisis de este último polipéptido correspondieron a polipéptidos de 30 y 20 kDa. Esto sería consecuencia de la mayor exposición del sitio de procesamiento del p56, luego de la imbibición que lo haría más proclive al ataque de las legumainas. El polipéptido de 30 kDa (A) proveniente del p56 sería posteriormente degradado a productos de menor tamaño. La naturaleza de los productos de hidrólisis formados de características ácidas está de acuerdo a los resultados hallados por Schlereth y col. (2000), quienes demostraron la liberación de aminoácidos ácidos durante la germinación temprana de *Vicia sativa*.

El mecanismo de degradación proteica en el amaranto fue coincidente con el modelo propuesto por Shutov y col. (1987). De este modo las proteínas de amaranto siguieron durante su movilización una degradación tipo zipper. Tanto la globulina 11S como la globulina-p presentaron la ruptura de polipéptidos de alta masa molecular generando péptidos de menor tamaño. Las moléculas parcialmente hidrolizadas mantuvieron su tamaño inicial, incrementando su carga superficial negativa. Las responsables de estas modificaciones serían las proteasas de masas moleculares de 30 y superior a 60 kDa encontradas tanto en cuerpos proteicos como en el compartimento citoplasmático. Estas proteasas presentes en las semillas sin germinar se encontrarían distribuidas en forma ubícua en el interior de los cuerpos proteicos. Las mismas aumentaron su actividad a partir de las 15 h de imbibición, coincidente con el comienzo de la degradación de las proteínas. Estas características nos permiten suponer que coexisten un conjunto de familias de proteasas que actuarían en forma secuencial durante la germinación acorde a lo descrito por Müntz y col. (2002), las cuales proporcionan el sustrato adecuado para la intervención de otras familias de proteasas. La proteasa encontrada en el espacio citoplasmático a tiempos largos de imbibición podría pertenecer a estas últimas familias responsables de la degradación de los péptidos generados en estadios anteriores.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los estudios realizados nos han permitido describir las características generales de la movilización de proteínas durante los primeros estadios de la germinación en el amaranto. A partir de los conocimientos obtenidos se ha planteado la necesidad de su profundización así como la de resolver nuevos interrogantes detallados a continuación:

- Completar la caracterización de las proteasas presentes en las semillas de amaranto durante la germinación, mediante su aislamiento y estudio del mecanismo de acción.
- Completar la información sobre las diferentes rutas de degradación, transporte dentro de la célula de las distintas fracciones proteicas y los cambios estructurales de los cuerpos proteicos. Para tal fin se combinaría la utilización de técnicas inmunoquímicas y de microscopía (inmunolocalización).
- Continuar con el análisis del proceso de germinación a tiempos más largos a efectos de conocer las etapas posteriores de degradación de los productos de hidrólisis generados en etapas tempranas y la posible presencia de otras proteasas.
- Profundizar el conocimiento de las proteínas citoplasmáticas que nos permitan identificar las posibles funciones biológicas de las mismas. Caracterizar las proteínas involucradas en el proceso de germinación. En ambos casos se utilizarán las técnicas empleadas en los estudios de proteómica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, H. y Sahib M. K. Distribution of lysine in different legumes and some species of amaranth seeds. *J. Food Sci. Technol.* (1976); 13:16-20.
- Abugoch, L. E ; Martínez E.N. y Añón, M. C. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *J. Agric. Food Chem.* (2003); 51:4060-4065.
- Adachi, M; Kanamori, J; Masuda, T; Yagasaki, K; Kitamura, K, ; Mikami, B y Utsumi S. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *PNAS.* (2003); vol 100 n°72:7395-7400.
- Ayoride, F. O.; Olongude, M. O.; Nana, E. Y.; Bernard, B. N. Afolabi O. A.; Oke, O. L. y Shepard R. L. Determination of fatty acid composition of *Amaranthus* species. *Am. Oil Soc.* (1989); 66:1812-1814.
- Barba de la Rosa, A. P.; Herrera -Estrella A. y Utsumi, S. y Paredes-López O. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J. Plant Physiol.* (1996); 149:527-532.
- Barba de la Rosa. A. P.; Herrera-Estrella, A.; Utsumi, S. y Paredes-López, O. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and aminoacid composition of Amaranth proteins. *J. Agric. Food Chem.* (1992 a); 40: 931-936.
- Barba de la Rosa, A. P. ; Paredes-López, O. y Gueguen J. Characterization of Amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *J. Agric. Food Chem.* (1992 b); 40:937-940.
- Becker, R. Amaranth oil: composition, processing and nutritional qualities. *En Amaranth: Biology, Chemistry and Tecnology.* Boca Raton, Florida CRC Press. Paredes-Lopez, O. (1994):133-141.
- Bertoni, M. H.; Gómez, R. G.; Cattaneo, P. y Covas G. Estudios sobre la semilla de especies americanas de *Amaranthus*- II. Harinas de extracción de *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. mantegazzianus* . *An. Asoc. Quím. Argent.* (1984); 72:597-605.
- Bethke, P. C.; Swanson, S. J.; Hillmer, S. y Jones R. L. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage protein. *Annals of Botany.* (1998); 82:399-412.
- Betschart, A. A.; Irving, D. W.; Shepherd, A. D. y Saunders R. M. *Amaranthus cruentus*: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components and the effects of temperature on nutritional quality. *J. Food Sci.* (1981); 46:1181-1187.
- Bewley, J. D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* (1997); 9:1055-1066.
- Bewley, J.D. y Black, M. Seeds: Physiology of development and germination. New York. Plenum Press. (1994)

- Blum, H.; Beier, H. y Gross, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. (1987) 8: 93-97.
- Bradford, K. J.; Downie, A. B.; Gee, O. H.; Alvarado, V., and Yang, H. y Dahal P. Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol.* (2003); 132:1560-1576.
- Bradford, KJ. En libro "Seed production and quality" Ed. KJ Bradford. *Capítulo 13 "Germination: Imbibition, Activation and Reserve Mobilization"*. (2004):85-94.
- Bressani, R. Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth, Biology, Chemistry and Technology* Ed. Paredes-López, O. Boca Ratón. Florida: CRC Press. (1994):185-206.
- Bressani, R. y García Vela L. A. Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* (1990); 38:1205-1209.
- Bressani, R.; Gonzalez, J. M.; Zuniga, J.; Breuner, M. y Elias L. G. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of Amaranth grain representing four species. *J. Sci. Food Agric.* (1987); 38:347-356.
- Carbonero, P y García-Olmedo F. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 26 "A Multigene Family of Trypsin/ Alpha-Amylase Inhibitors From Cereals"*. (1999):617-633.
- Casey, R. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 29 "Lipoxygenases"*. (1999):685-708.
- Casey, R. ; Domoney, C. y Ellis T. H. N. Legume storage proteins and their genes. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* (1986); 3:1-95.
- Castellani, O. F. Tesis doctoral. Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto. *Universidad Nacional De La Plata, Argentina.* (2000):156-164.
- Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón M. C. Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *J. Agric. Food Chem.* (2000); 48:5624-5629.
- Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón M. C. Role of disulfide bonds upon the structural stability of an Amaranth globulin. *J. Agric. Food Chem.* (1999); 47:3001-3008.
- Castellani, O. F. ; Martínez, E. N y Añón M. C. Structural modifications of an Amaranth globulin induced by pH and NaCl. *J. Agric. Food Chem.* (1998); 46:4846-4853.
- Chakraborty, S.; Chakraborty, N. y Datta A. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *PNAS.* (2000); 97 n° 7:3724-3729.
- Chen, S y Paredes-López O. Isolation and characterization of the 11S globulin from Amaranth seeds. *J. Food Biochem.* (1997); 21:53-65.

- Coates, J. B.; Medeiros, J. S.; Thanh, V. H. y Nielsen N. C. Characterization of the subunits of β conglycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985); 243:184-194.
- Coimbra, S. y Salema R. *Amaranthus hypochondriacus*: seed structure and localization of seed reserves. *Annals of Botany.* (1994); 74:373-379.
- Crouch, M. L.; Tanbarger, K. M.; Simon, A. E. y Feri R. c DNA clones from *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *J Mol. Appl. Genet.* (1983); 2:273-283.
- Cuming, A. C. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 32 "LEA Proteins"*. (1999):753-780.
- Derbyshire, E.; Wright, D. J. y Boulter D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry.* (1976); 15:3-24.
- Domoney, C. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 27 "Inhibitors of Legume Seeds"*. (1999):635-655.
- Duarte-Correa, A.; Jokl, L. y Carlsson R. Aminoacid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and its fractions. *Arch. Latinam.Nutr.* (1986); 26:466-476.
- Ericson, M. L.; Rödin, J.; Leuman, M.; Glimelius, K.; Josefsson, L. G. y Rask L. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *JBC.* (1986); 261 n° 31 iss. 5:14576-14581.
- Fukushima, D. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev.Intl.* (1991); 7 n° 3:353-381.
- Galili, G. y Herman E. M. Protein bodies: storage vacuoles in seeds. *Adv. Bot. Res.* (1997); 25:113-140.
- Gallardo, K.; Job, C.; Groot, S. P. C.; Puype, M.; Demol, H.; Vandekerckhove, J. y Job D. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin- deficient seeds. *Plant Physiol.* (2002); 129:823-837.
- García-Olmedo, F. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 30 "Thionins"*. (1999):709-726.
- Gorinstein, S. y Moshe R. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their aminoacid composition. *J. Agric. Food Chem.* (1991); 39:851-854.
- Gorinstein, S.; Delgado-Licon, E.; Pawelzik, E.; Permady, H. H.; Weisz, M. y Trakhtenberg S. Characterization of soluble Amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, aminoacid analysis, circular dichroism and differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* (2001); 49:5595-5601.
- Gorinstein, S.; Zemser, M. y Paredes-López O. Structural stability of globulins. *J. Agric. Food Chem.*

- (1996 a); 44:100-105.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fliess, A.; Shnitman, I.; Parede-López, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi H. Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1998); 62 n° 10:1845-1851.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Rodrigues, W. A.; Martins, P. S.; Vello, N. A.; Tosello, G. A. y Paredes-López O. Physicochemical characterization of the structural stability of some pant globulins. *Food Chemistry.* (1996 b); 56:131-138.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Vasco-Méndez, N. L. y Paredes-López O. Denaturant-induced conformations of globulins. *J. Agric. Food Chem.* (1996 c); 44:93-99.
- Han -Ping He y Corke, H. Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. *J. Agric. Food Chem.* (2003); 51:7913-7920.
- Hara-Nishimura, I.; Shimada, T.; Hatano, K.; Takeuchi, Y. y Nishimura M. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *The Plant Cell.* (1998); 10:825-836.
- Hara-Nishimura, I.; Takeuchi, Y. y Nishimura M. Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *The Plant Cell.* (1993); 5:1651-1659.
- Harlow, E. y Lane, D. Antibody-antigen interactions. En: *Antibodies: A laboratory manual*. Plainview, New York (1988) 23-35.
- Harwalkar, V. R. y Ma C. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* (1987); 52:394-398.
- Hermann, E. M. y Larkins B. A. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell.* (1999); 11:601-614.
- Higgins, T. J. V.; Chandler, P. M.; Randall, P. J.; Spencer, D.; Beach, L. R.; Biagrove, R. J.; Kort, R. J. y Iglia A. S. Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulphur-rich protein in pea seeds. *JBC.* (1986); 261:11124-11130.
- Hopp, T.P. Protein surface analysis methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. *J. Immunol. Methods* (1986) 88:1-8.
- Inoue, K.; Motozaki, A.; Takeuchi, Y.; Nishimura, M. y Hara-Nishimura I. Molecular characterization of proteins in protein-body membrane that disappear most rapidly during transformation of protein bodies into vacuoles. *The Plant Journal.* (1995 a); 7 n° 2:235-243.
- Inoue, K.; Yuka Takeuchi, Michio Nishimura y Ikuko Hara Nishimura. Characterization of two integral membran proteins located in the protein bodies of pumpkin seeds. *Plant Mol. Biol.* (1995 b); 28:1089-1101.
- Job, C.; Kersulec, A.; Ravasio, L.; Chareyre, S.; Pepin, R. y Job D. The solubilization of the basic

- subunit of sugarbeet seed 11S globulin during priming and early germination. *Seed Sci. Res.* (1997); 7:225-243.
- Joshi, V; Gautam, P. L; Bhag Mal, Sharma G. D. y Kochhar S. "Managing Plant Genetic Diversity" © IPGRI Eds. JMM, Engels; V. Ramanatha Rao; AHD Brown y Jackson, MT. *Capítulo 33 "Conservation and Use of Underutilized Crops: an Indian Perspective"*. (2002):359-369.
- Kigel, J. Development and ecophysiology of Amaranths. En *Amaranth: Biology, Chemistry & Technology*. Ed. Paredes-López. CRC Press. Boca Raton FL. (1994):39-73.
- Konishi, Y.; Azumaya, J.; Horikawa, K. y Nakatani N. A pitfall in determining the globulin/ albumin ratio in the amaranth grains. *J. Nutr.Sci. Vitaminol.* (1992); 38:215-220.
- Konishi, Y.; Fumita, Y.; Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa H. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus L.* *Agric. Biol. Chem.* (1985); 49:1453-1459.
- Konishi, Y.; Horikawa, K.; Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani N. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agric. Biol. Chem.* (1991); 55 n° 11:2745-2750.
- Konishi, Y.; Nakamura, R.; Sugimoto, Y. y Fujimori K. Transmission electron microscopy of protein bodies in the *Amaranthus cruentus* seed embryo. *Biosci.Biotechnol. Biochem.* (1995); 59 n° 11:2140-2142.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (1970); 227:680-685.
- Lending , C. R. y Larkins B. A. Changes in the zein composition of protein bodies uring maize endosperm development. *The Plant Cell.* (1989); 1:1011-1023.
- Levanony, H.; Rubin, R.; Altschuler, Y. y Galili G. Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J.Cell Biol.* (1992); 119 n° 5:1117-1128.
- López, F.; Bousser, A.; Sissoëff, I.; Gaspar, M.; Lachaise, B.; Hoarau; J. y Mahé, A. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP₂ proteins. *Plant Cell Physiol.* (2003); 44 (12):1384-1395.
- Lott, J.N.A. Protein bodies in seeds. *Nordic Journal of Botany.* (1981) 1: 421-432.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *JBC.* (1951); 193:265-271.
- Lu, S.; Deng, P.; Liu, X.; Luo, J.; Han, R.; Gu, X.; Liang, S.; Wang, X.; Li, F.; Lozanov, V.; Patthy, A. y Pongor S. Solution structure of the major α - amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *JBC.* (1999); 274 n° 29:20473-20478.
- Marcone, M. F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S globulins. *Food Res.Intl.* (1999 a); 32:79-92.

- Marcone, M. F. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chemistry*. (1999 b); 65:533-542.
- Marcone, M. F.. First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth). *J. Agric. Food Chem.* (2000); 48:378-382.
- Marcone, M. F. y Yada R. Y. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agric. Biol.Chem.* (1991); 55 n° 9:2281-2289.
- Marcone, M. F. y Yada R. Y. Structural analysis of globulins isolated from genetically different Amaranth hybrid lines. *Food Chemistry*. (1998); 61 n° 3:319-326.
- Marcone, M. F. y Yada R. Y. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *J. Agric. Food Chem.* (1992); 40:385-389.
- Marcone, M. F; Kakuda, Y. y Yada R. Y. Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*. (1998); 63 n° 1:85-95.
- Marcone, M. F; Niekamp, F. K.; Le Maguer, M. y Yada R. Y. Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Food Chemistry*. (1994 a); 51:287-294.
- Martínez, E. N. Tesis doctoral. Caracterización de las proteínas de amaranto. *Universidad Nacional De La Plata*. (1997).
- Martínez, E. N y Añón M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* (1996); 44 n° 9:2523-2530.
- Martínez, E. N. ; Castellani, O. F. y Añón M. C. Common molecular features among Amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* (1997); 45:3832-3839.
- Miflin, B. J.; Field, J. M. y Shewry P. R. Cereal storage proteins and their effects on technological properties. *En Seed Proteins*. Daussant, J.; Mosse, J. y Vaughan, J. Eds. *London Academic Press*. (1983):255-319.
- Mora-Escobedo, R.; Paredes-López, O. & Gutiérrez-López G. F. Effect of germination on the rheological and functional properties of Amaranth seeds. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* (1991); 24:241-244.
- Mora-Escobedo, R. ;Paredes-López, O. y Odorica-Falomir C. Characterization of albumins and globulins from Amaranth. *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.* (1990); 23:484-487.
- Muench, D. G. y Okita T. W. The storage proteins of rice and oats. *En : Cellular and Molecular Biology Biology of Plant Seed Development*. (1997):289-330.
- Müntz, K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* (1998); 38:77-99.

- Müntz, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in deloping and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp.Botany*. (1996); 47 n° 298:605-622.
- Müntz, K. y Shutov A. D. Legumains and their functions in plants. *Trends in Plant Science*. (2002):1360-1385.
- Müntz, K.; Becker, C.; Pancke, J.; Schlereth, A.; Fischer, J.; Horstmann, C.; Kirkin, V.; Neubohn, B.; Senyuk, V. y Shutov A. Protein degradation and nitrogen supply during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa L.*). *J. Plant Physiol*. (1998); 152:683-691.
- Müntz, K.; Belozersky, M. A.; Dunaevsky, Y. E.; Schlereth, A. y Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp.Botany*. (2001); 52 n° 362:1741-1752.
- Nakamura, R.; Konishi, Y.; Kojima, A. y Nakatani N. Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (1998); 62 n° 6:1231-1233.
- Nielsen, N.; Bassüner, R y Beaman T. *The biochemistry and cell biology of embryo storage proteins*. En:Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. Ed. Larkins, B.A y Vasil, I.K.Netherlands. Kluwer Academic. (1997):151-220.
- Nielsen, N.; Jung, R.; Nam, Y.; Beaman, T.; Olivera, L. y Bassüner R. Synthesis and assembly of 11S globulins. *J. Plant Physiol*. (1995); 145:641-647.
- Ogawa, M.; Hanada, A.; Yamauchi, Y.; Kuwahara, A.; Kamiya, Y. y Yamaguchi S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* . (2003); 15:1591-1604.
- Osborne, T. En : The vegetable Proteins. 2da. edición Ed, Longmans y Green , Nueva York. (1924).
- Osuna- Castro, J. A.; Rascón-Cruz, Q.; Napier, J.; Fido, R. J.; Shewry, P. R. y Paredes-López O. Overexpression, purification, and invitro refolding of the 11 S globulin from Amaranth seed in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem*. (2000); 48:5249-5255.
- Paredes- López, O ; Mendoza , V y Mora R. Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. *Plant Foods Hum. Nutr*. (1993); 43:37-43.
- Pastorello, E. A.; Pompei, C.; Pravettoni, V.; Brenna, O.; Farioli, L.; Trambaioli, C. y Conti A. Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy*. (2001); 67:45-47.
- Petrucelli, S. y Añón, M.C. Relationship between the method of obtaintion and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydratation properties. *J. Agric. Food Chem*. (1994) 42: 2161-2169.
- Peumans, W. J. y van Damme E. J. M. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 28 "Seed Lectins"*. (1999):657-683.

- Phillipson, B. A.; Pimpl, P.; Pinto da Silva, L. L.; Crofts, A. J.; Taylor, J. P.; Movafeghi, A.; Robinson, D. G. y Denecke J. Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COP II dependent. *The Plant Cell*. (2001); 13:2005-2020.
- Plumb, G. W.; Lambert, N.; Mills, E. N. C.; Tatton, M. J.; D'Ursel, C. C. M.; Bogracheva, T. y Morgan M. R. A. Characterization of monoclonal antibodies against beta-conglycinin from soya bean (*Glycine max.*) and their use as probes for thermal denaturation. *J. Sci. Food Agric.* (1995); 67:511-520.
- Plumb, G. W.; Mills, E. N. C.; Tatton, M. J.; D'Ursel C.C.M.; Lambert, N. y Morgan M. R. A. Effect of thermal and proteolytic processing on glycinin, the 11S globulin of soy (*Glycine max.*): a study utilizing monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.* (1994); 42:834-840.
- Prakash, D. y Pal M. Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. *J. Sci. Food Agric.* (1991); 57:573-585.
- Prakash, D.; Joshi, B. D. y Pal M. Vitamin C in leaves and sees oil composition of the *Amaranthus* species. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* (1995); 46:47-51.
- Prego, I.; Maldonado, S. y Otegui M. S. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany.* (1998); 82:481-488.
- Ramírez-Medeles, M. del Carmen; Aguilar, M. B.; Miguel, R. N.; Bolaños-García, V. M; García-Hernández, E. y Soriano-García M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* (2003); 415:24-33.
- Robinson, D. G.; Oliviusson, P. y Hinz G. Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic.* (2005); 6:615-625.
- Rojo, E.; Zouhar, J.; Carter, C.; Kovaleva, V. y Raikhel N. V. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* (2003); 100 n° 12:7389-7394.
- Romero-Zepeda, H. y Paredes-López O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *J. Food Chem.* (1996); 19:329-339.
- Sathe S.K., Wolf W. J. Roux K. H. Teuber S. S. Venkatachalam M. y Sze-Tao K. W. C. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis L.*). *J. Agric. Food Chem.* (2002 a); 50:4333-4341.
- Sathe, S. K.; Hamaker, B. R.; Sze-Tao, K. W. C. y Venkatachalam M. Isolation, purification and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis L.*). *J. Agric. Food Chem.* (2002 b); 50:4906-4908.
- Saunders, R. y Becker R. Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology. Ed. Pomeranz, Y. St. Paul: American Association of Cereal Chemists.* (1984):357-397.
- Schlereth, A.; Becker, C.; Horstmann, C.; Tiedemann, J. y Müntz K. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination

- and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp.Botany*. (2000); 51 n° 349:1423-1433.
- Scilingo, A. A.; Molina-Ortiz, S. E.; Martínez, E. N y Añón M. C. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Res.Intl.* (2002); 35:855-862.
- Scilingo, A. A. y Añón, M. C. Calorimetric study of soybean protein isolates: effect of calcium and thermal treatments .. *J. Agric. Food Chem.* (1997); 39:193-202.
- Segura Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P. y Paredes-López O. Biochemistry of amaranth proteins. *Amaranth: Biology, Chemistry & Technology*. Ed. CRC Press. Boca Raton, FL. (1994):75-106.
- Segura-Nieto, M.; Vázquez- Sánchez, N.; Rubio-Velázquez, H.; Olguín-Martínez, L. E.; Rodríguez-Nester, C. E. y Herrera Estrella L. Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* (1992); 40:1553-1558.
- Senyuk, V. I.; Rotari, V.; Becker, C.; Zakharov, A.; Horstmann, C.; Müntz, K. y Vaintraub I. A. Does an asparaginyl-specific endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? *Eur. J. Biochem.* (1998); 258:546-558.
- Shewry, P. R. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R. *Capítulo 25 "Enzyme Inhibitors of Seeds: Types and Properties"*. (1999):587-615.
- Shewry, P. R. y Casey R. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R. y Casey, R. *Capítulo 1 "Seed Proteins"*. (1999 a):1-33.
- Shewry, P. R. y Halford N. G. Cereal seed storage proteins: structures, proteins and role in grain utilization. *J. Exp.Botany*. (2002 a); vol. 53 n° 370:947-948.
- Shewry, P. R y Pandya M. J. Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R. y Casey, R. *Capítulo 24 "The 2S Albumin Storage Proteins"*. (1999 b):563-586.
- Shewry, P. R.; Beaudoin, F.; Jenkins, J.; Griffiths-Jones, S. y Mills E. N. C. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem. Society*. (2002 b):906-911.
- Shewry, P. R.; Napier, J. A. y Tatham A. S. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *The Plant Cell*. (1995); 7:945-956.
- Shutov A.D., Baumlein H. Blattner F. R. y Müntz K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *J. Exp.Botany*. (2003); 388:1645-1654.
- Shutov, A. D. y Vaintraub I. A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*. (1987); 26 n° 6:1557-1566.
- Shutov, A. D.; Kakhovskaya, I. A.; Bastrygina, A. S.; Bulnaga, V. P.; Horstmann, C. y Müntz K. Limited proteolysis of β -conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (*Glycine max* (L) Merr). Structural and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* (1996); 241:221-228.

- Silva-Sánchez, C.; González-Castañeda, J.; De León-Rodríguez, A. y Barba de la Rosa A. P. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. *Plant Foods Hum. Nutr.* (2004); 59:169-174.
- Sinagawa-García, S. R.; Rascón-Cruz, Q.; Valdez- Ortiz, A.; Medina-Godoy, S.; Escobar-Gutiérrez, A. y Paredes-Lopez O. Safety assessment by in vitro digestibility and allergenicity of genetically modified maize with an amaranth 11S globulin. *J. Agric. Food Chem.* (2004); 52:2709-2714.
- Singhal, R. S. y Kulkarni P. R. Composition of the seeds of some *Amaranthus* species. *J. Sci. Food Agric.* (1988); 42:325-331.
- Stöger, E.; Parker, M.; Christou, P. y Casey R. Pea legumin overexpressed in wheat endosperm assembles into an ordered paracrystalline matrix. *Plant Physiol.* (2001); 125:1732-1742.
- Strzalka, K.; Hara- Nishimura, I. y Nishimura M. Changes in physical properties of vacuolar membrane during transformation of protein bodies into vacuoles in germinating pumpkin seeds. *Biochim.Biophys. Acta.* (1995); 1239:103-110.
- Tabe, L. M.; Higgins, C. M.; Mc Nabb, W. C. y Higgins T. J. V. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetika.* (1993); 90:181-200.
- Thanh, V. H. y Shibasaki K. Heterogeneity of β conglycinin. *Biochim.Biophys. Acta.* (1976); 439:326-338.
- Thanh, V. H. y Shibasaki K. Major proteins of soybean seeds. Reconstitution of β conglycinin from its subunits. *J. Agric. Food Chem.* (1978 a); 26:695-698.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* (1978 b); 26:692-695.
- Tiedemann, J.;Neubohn, B. y Müntz K. Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L). *Planta.* (2000); 211:1-12.
- Tiedemann, J. ; Neubohn, B. y Müntz K. Differential histological histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L). *Planta.* (2001); 212:728-738.
- Towbin, H. ; Stachein, T. y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* (1979); 76:4350-4354.
- Toyooka, K.; Okamoto, T. y Minamikawa T. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J.Cell Biol.* (2000); 148 n ° 3:453-463.
- Usha, R. y Singh M. Proteases of germinating winged-bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds: purification and characterization of an acidic protease. *Biochem. J.* (1996); 313:423-429.

- Utsumi, S.; Gidamis, A.B. Mikami, B.; Kito, M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* (1997) 233: 177-178.
- Valdes-Rodriguez, S.; Segura-Nieto, M.; Chagolla-Lopez, A.; Verver y Vargas-Cortina, A.; Martínez-Gallardo, N. y Blanco-Labra A. Purification, characterization and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*A. hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* (1993); 103:1407-1412.
- Valdez-Ortiz, A. Rascón Cruz Q.; Medina-Godoy, S.; Sinagawa-García, S. R.; Valverde-González, M. E. y Paredes-López O. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology.* (2005); 115:413-423.
- Vasco- Méndez, N. L. y Paredes-López O. Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *J. Food Chem.* (1995); 18:227-238.
- Voskoboinikova, N.E.; Dunaevsky, Y.A y Belozersky, M.A. Inhibitor of the metalloproteinase from buckwheat seeds. *Biokhimiya* (1990) 55: 839-847.
- Vitale, A. y Hinz G. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science.* (2005); 10 n ° 7:1380-1385.
- Woo, Y.-N.; Hu, D. W. N.; Larkins, B. A. y Jung R. Genomic analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *The Plant Cell.* (2001); 13:2297-2317.
- Yang, Yao-dong; Elamawi, R.; Bubeck, J.; Pepperkok, R.; Ritzenthaler, C. y Robinson D. G. Dynamics of COP II vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell.* (2005); 17:1513-1531.
- Zahkarov, A.; Carchilan, M.; Stepurina, T.; Rotari, V.; Wilson, K. y Vaintraub I. A. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max. (L.) merril*) seeds in the degradation of their storage proteins. *J. Exp. Botany.* (2004); 55 n° 406:2241-2249.
- Zhang Ningyan y Jones Berne L. Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Cereal Sci.* (1995); 21:145-153.

