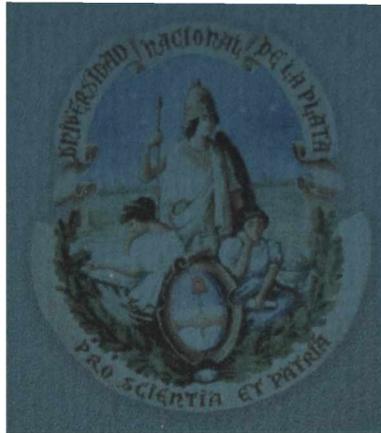


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas**



Tesis de Doctorado

“Estudio ontogenético y ultraestructural de los laticíferos de *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*). Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex”

Adriana Amalia Cortadi

**Directora: Dra. Nora Silvia Priolo
Co-Directora: Dra. Martha Ana Gattuso**

2001

*Pero yo os digo que la vida es oscuridad cuando no hay
impulso.*

Y todo impulso es ciego cuando no hay conocimiento.

Y todo saber es inútil cuando no hay trabajo.

Y todo trabajo es vacío cuando no hay amor.

*Porque cuando trabajáis con amor estáis en armonía con
vosotros mismos, y con los otros, y con Dios.*

Khalil Gibran

*A mis padres
y
Skyliners*

Agradecimientos

A la Dra. Nora Silvia Priolo y a la Dra. Martha Ana Gattuso no sólo por el apoyo incondicional brindado durante la realización de éste trabajo sino también porque gracias al impulso creador y la firmeza en los emprendimientos que las caracterizan me dieron la fuerza motivadora para lograr el buen fin de esta gestión.

A todos los integrantes del LIPROVE que me recibieron siempre con las mejores muestras de buena voluntad y me hicieron sentir, con su afecto y cordialidad, que las distancias geográficas no existen.

A los curadores de los herbarios por la gentileza en el préstamo del material solicitado.

A María Cecilia Arribére, Marisa Bettioli, Sandra Vairo Cavalli y Paula Conforti por las determinaciones realizadas.

A la Dra. Susana Gattuso por sus oportunas sugerencias.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario que me brindaron su apoyo y colaboración.

A todos y cada uno de los que de una u otra forma me ayudaron a lo largo de este tiempo de trabajo.

Este Trabajo de Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Arribére, Ma. C.; Priolo, N.; Cortadi, A.; Bettiol, M. & N. Caffini.
“ISOLATION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A NEW PROTEASE FROM THE LATEX OF FRUITS OF *MORRENIA BRACHYSTEPHANA* GRISEB. (*ASCLEPIADACEAE*)”.
Acta Farmacéutica Bonaerense **15** (3): 169-176, (1996).
Buenos Aires - Argentina.
2. Arribére, Ma. C.; Cortadi, A.; Gattuso, M.; Bettiol, M.; Priolo, N. & N. Caffini.
“COMPARISON OF ASCLEPIADACEAE LATEX PROTEASES AND CHARACTERIZATION OF *MORRENIA BRACHYSTEPHANA* GRISEB. CYSTEINE PEPTIDASES”.
Phytochemical Analysis **9**: 267-273, (1998).
Reino Unido.
3. Arribére, Ma. C.; Vairo Cavalli, S.; Cortadi, A.; Gattuso, M.; Priolo, N. & N. Caffini.
“PROTEOLYTIC ENZYMES FROM THE LATEX OF *MORRENIA ODORATA* (HOOK. ET ARN.) LINDLEY (*ASCLEPIADACEAE*)”.
Acta Horticulturae. Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants For Human Welfare Wocmap-2, **501**: 259-268, (1999).
Bélgica.
4. Cortadi, A.; Scandizzi, A.; Gattuso, S.; Priolo, N.; Caffini, N. y M. Gattuso.
“ESTUDIO MORFOANATÓMICO DE ESPECIES DE LOS GÉNEROS *ARAUJIA* Y *MORRENIA* (*ASCLEPIADACEAE*) UTILIZADOS EN MEDICINA POPULAR”.
Rojasiana **5** (1): 15-36, (1999).
Paraguay.
5. Vairo Cavalli, S.; Cortadi, A.; Arribére, Ma. C.; Conforti, P.; Caffini, N. & N. Priolo.
“COMPARISON OF TWO CYSTEINE ENDOPEPTIDASES FROM LATICES OF *MORRENIA BRACHYSTEPHANA* GRISEB. AND *MORRENIA ODORATA* (HOOK. ET ARN.) LINDLEY (*ASCLEPIADACEAE*)”.
Biological Chemistry **382**: 879-883, (2001).
Berlín.

Índice

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS BOTÁNICOS	1
1.1.1. Taxonomía	1
1.1.1.1. Descripción de la familia <i>Asclepiadaceae</i>	3
1.1.1.2. Descripción del género <i>Morrenia</i>	4
1.1.2. Etnobotánica	4
1.1.3. Anatomía	7
1.1.4. Laticíferos: ontogenia y ultraestructura	7
1.1.5. Látex: composición y funciones	8
1.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS	8
1.2.1. Enzimas proteolíticas: generalidades	8
1.2.1.1. Nomenclatura: proteasas-proteinasas-peptidasas	9
1.2.1.2. Interacción Enzima-Sustrato	10
1.2.1.3. Clasificación: mecanismos catalíticos	11
1.2.1.3.1. Peptidasas serínicas y treonínicas (EC 3.4.21)	11
1.2.1.3.2. Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)	14
1.2.1.3.3. Peptidasas aspárticas (EC 3.4.23)	16
1.2.1.3.4. Metalopeptidasas (EC 3.4.24)	18
1.2.1.3.5. Peptidasas de mecanismo desconocido (EC 3.4.99)	19
1.2.1.4. Inhibidores de peptidasas: mecanismos de acción	21
1.2.1.4.1. Inhibidores de peptidasas serínicas	21
1.2.1.4.2. Inhibidores de peptidasas cisteínicas	22
1.2.1.4.3. Inhibidores de peptidasas aspárticas	23
1.2.1.4.4. Inhibidores de metalopeptidasas	24
1.2.2. Peptidasas Vegetales	24
1.2.2.1. Proteólisis en las plantas	24
1.2.2.2. Cantidad de enzimas proteolíticas en los vegetales	25
1.2.2.3. Detección y localización enzimática <i>in situ</i>	26
1.2.2.4. Peptidasas de látex	27

1.2.2.4.1. Peptidasas de <i>Caricaceae</i>	28
1.2.2.4.2. Peptidasas de <i>Moraceae</i>	29
1.2.2.4.3. Peptidasas de <i>Euphorbiaceae</i>	29
1.2.2.4.4. Peptidasas de <i>Asteraceae</i>	30
1.2.2.4.5. Peptidasas de <i>Apocynaceae</i>	30
1.2.2.4.6. Peptidasas de <i>Asclepiadaceae</i>	31
1.2.2.4.6.1. Peptidasas del Género <i>Araujia</i>	31
1.2.2.4.6.2. Peptidasas del Género <i>Asclepias</i>	31
1.2.2.4.6.3. Peptidasas del Género <i>Calotropis</i>	32
1.2.2.4.6.4. Peptidasas del Género <i>Morrenia</i>	33
1.2.3. Importancia económica de las enzimas proteolíticas: usos y aplicaciones	33
2. OBJETIVOS	35
3. ALCANCES	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Material vegetal	37
4.1.1. Descripción exomorfológica de las especies estudiadas	37
4.1.2. Estudios anatómicos	41
4.1.2.1. Observación de epidermis con MEB	42
4.1.2.2. Observación de cristales de oxalato de calcio	43
4.1.2.3. Observación de laticíferos con MET	44
4.2. Detección y localización <i>in situ</i> de enzimas proteolíticas	45
4.2.1. Método del film-sustrato de Denker	45
4.2.2. Método del film-sustrato de Fratello	46
4.3. Obtención de extractos crudos conteniendo proteasas	47
4.4. Detección de proteasas <i>in vitro</i> : ensayos de actividad caseinolítica	47
4.5. Purificación preliminar mediante precipitación acetónica fraccionada	48
4.6. Purificación cromatográfica	49
4.6.1. Cromatografía de intercambio iónico	49

4.6.2. Cromatografía de exclusión molecular	50
4.7. Efecto activador de cisteína sobre la actividad caseinolítica	50
4.8. Acción de inhibidores sobre la actividad caseinolítica	50
4.9. Contenido proteico	51
4.10. Cantidad de hidratos de carbono	51
4.11. Variación de la actividad proteolítica con el pH	52
4.12. Estabilidad térmica	52
4.13. Variación de la actividad caseinolítica con la temperatura	52
4.14. Determinación de la actividad endoesterásica sobre sustratos sintéticos	53
4.14.1. Determinación de los parámetros K_m y k_{cat}	54
4.15. Estabilidad enzimática en solventes orgánicos	54
4.15.1. Estabilidad enzimática en sistemas monofásicos	54
4.15.2. Estabilidad enzimática en sistemas bifásicos	55
4.16. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)	55
4.16.1. Preparación de las muestras	55
4.16.2. Preparación de los geles	56
4.16.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida	57
4.16.4. Fijación y coloración	57
4.16.5. Estimación de las masas moleculares	58
4.17. Isoelectroenfoque	58
4.17.1. Preparación de las muestras	58
4.17.2. Formación de los geles	59
4.17.3. Desarrollo del isoelectroenfoque	60
4.17.4. Fijación y coloración	60
4.17.5. Estimación de los puntos isoeléctricos	61
4.18. Zimograma	61
4.18.1 Preparación de las placas agarosa-caseína	62
4.18.2. Incubación	62
4.18.3. Proceso de fijación y coloración	62
4.19. Determinación de la secuencia aminoacídica N-terminal	63

5.4.1.2. Purificación preliminar: fraccionamiento acetónico	95
5.4.1.3. Purificación cromatográfica: intercambio iónico	96
5.4.1.4. Esquema de purificación	98
5.4.1.5. Caracterización de morrenaína b I y morrenaína b II	99
5.4.1.5.1. Variación de la actividad caseinolítica con el pH	99
5.4.1.5.2. Estabilidad térmica	100
5.4.1.5.3. Efecto térmico	101
5.4.1.5.4. Masas moleculares relativas	103
5.4.1.5.5. Puntos isoeléctricos	104
5.4.1.5.6. Parámetros cinéticos de morrenaína b II: K_m y k_{cat}	105
5.4.1.5.7. Estabilidad de morrenaína b II en solventes orgánicos	105
5.4.1.5.7.1. Estabilidad de morrenaína b II en sistemas monofásicos	106
5.4.1.5.7.2. Estabilidad de morrenaína b II en sistemas bifásicos al 50%	106
5.4.1.5.8. Secuencia aminoacídica N-Terminal de morrenaína b II	107
5.5. <i>Morrenia odorata</i> (Hook. et Arn.) Lindley	109
5.5.1. Obtención del extracto crudo	109
5.5.1.1. Caracterización del extracto crudo	110
5.5.1.1.1. Acción de activadores e inhibidores	110
5.5.1.1.2. Variación de la actividad caseinolítica con el pH	111
5.5.1.1.3. Estabilidad térmica	111
5.5.1.1.4. Actividad endoesterásica sobre sustratos sintéticos	112
5.5.1.1.5. Isoelectroenfoque y zimograma: puntos isoeléctricos de las proteasas presentes	114
5.5.1.2. Purificación preliminar: fraccionamiento acetónico	114
5.5.1.3. Purificación cromatográfica: intercambio iónico	115
5.5.1.3.1. Purificación cromatográfica: exclusión molecular	116
5.5.1.4. Esquema de purificación	118
5.5.1.5. Caracterización de morrenaína o I y morrenaína o II	118
5.5.1.5.1. Variación de la actividad caseinolítica con el pH	118

5.5.1.5.2. Estabilidad térmica	119
5.5.1.5.3. Efecto térmico	121
5.5.1.5.4. Masas moleculares relativas	122
5.5.1.5.5. Puntos isoelectricos	123
5.5.1.5.6. Parámetros cinéticos de morrenaína o II: K_m y k_{cat}	123
5.5.1.5.7. Estabilidad de morrenaína o II en solventes orgánicos	124
5.5.1.5.7.1. Estabilidad de morrenaína o II en sistemas monofásicos	124
5.5.1.5.7.2. Estabilidad de morrenaína o II en sistemas bifásicos al 50%	125
5.5.1.5.8. Secuencia aminoacídica N-Terminal de morrenaína o II	126
6. DISCUSION Y CONCLUSIONES	128
7. REFERENCIAS	137
8. ABREVIATURAS	152

Introducción

1.1. ASPECTOS BOTÁNICOS

1.1.1. Taxonomía

Antiguamente la mayoría de las plantas productoras de látex eran agrupadas bajo el nombre de *Apocynum*, incluyéndose en este heterogéneo grupo muchas *Asclepiadaceae*, *Euphorbiaceae* y *Apocynaceae*.

En el año 1789 Jussieu hace un primer aporte para aclarar dicha situación y asigna el nombre *Apocynae* a las actuales *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*, quedando así la mayoría de los demás integrantes relegados a otras familias.

En 1811 fue Robert Brown quien diferenció las *Asclepiadaceae* bajo el nombre de *Asclepiadeae* y mantuvo el propuesto previamente por Jussieu sólo para las *Apocynaceae*.

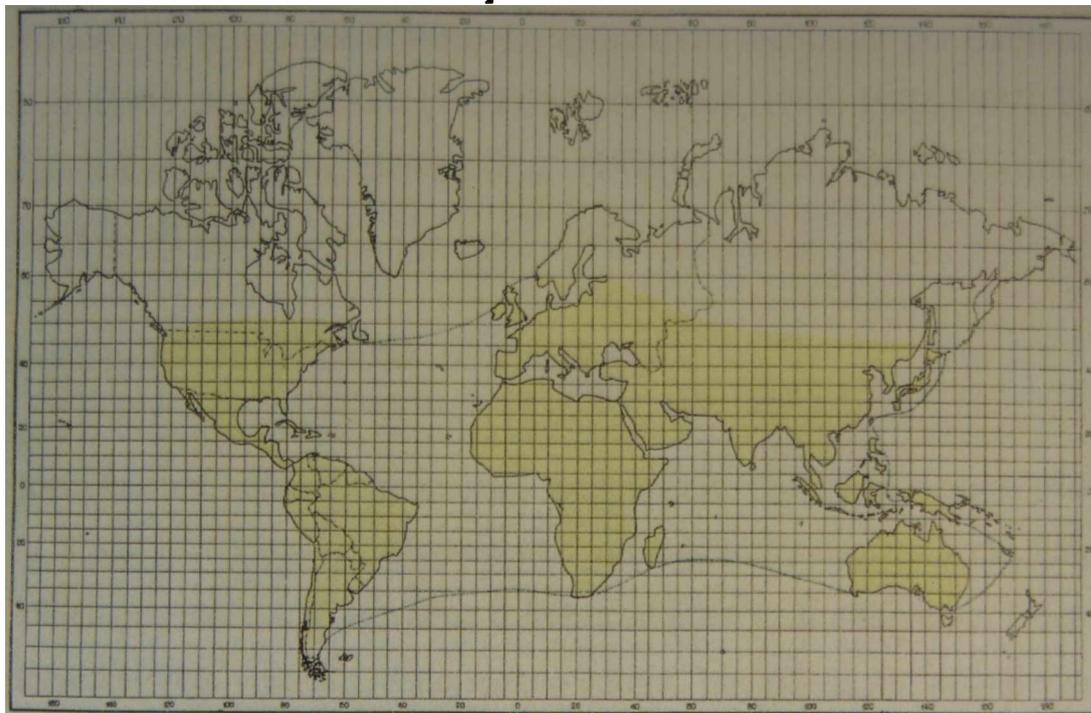
De esta manera quedaron determinados los límites de ambas familias tal como se las concibe actualmente. El nombre *Asclepiadaceae*, sin embargo, fue establecido algunos años después por Lindley (1847) y bajo este nombre se conoce actualmente a la familia creada por Robert Brown. Su nombre deriva de *Asclepias*, asignado a uno de los géneros pertenecientes a la familia y que procede de Ἄσκληπιός, Esculapio, Dios de la Medicina, en la mitología griega.

La identificación de restos de polen y de microfósiles ha permitido remontar la historia geológica de las *Asclepiadaceae* al Oligoceno.

Se trata de una familia muy grande del orden Gentianales, que comprende 250 géneros y más de 2000 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de los cinco continentes, especialmente en África, con relativamente pocos géneros y especies en climas templados (Cronquist, 1968, 1981, 1988).

En nuestro país se las encuentra desde la frontera norte hasta el paralelo 50° en la Patagonia. Abundan especialmente en las zonas llanas y boscosas del norte, centro y litoral y un número reducido de especies llega a las altas montañas y a la Patagonia (Lám. I). Habitan 32 géneros, de los cuales dos (*Amblyopetalum* y *Hickenia*) son endémicos. El número de especies conocidas se eleva a 145, siendo los géneros mejor representados *Oxypetalum* con 31 especies, *Cynanchum* con 10 y *Morrenia* con 9 (Zuloaga, *et al.*, 1999).

Familia *Asclepiadaceae* en el mundo



Carta 1

El Género *Morrenia* en la República Argentina

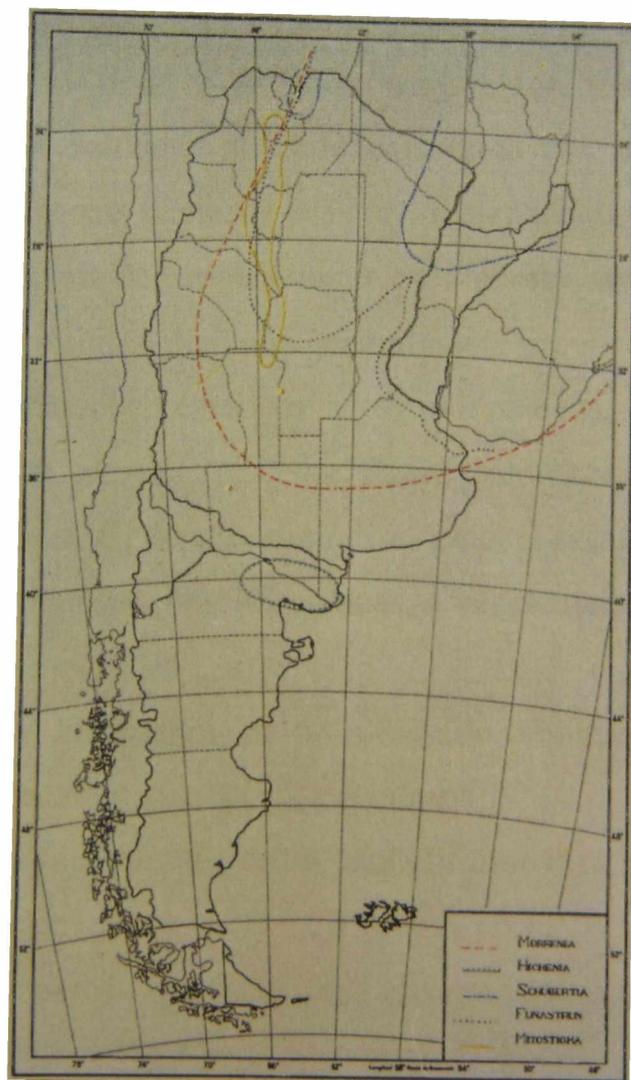


Lámina I

Carta 1

Los trabajos taxonómicos sobre *Asclepiadaceae* realizados por Baillon (1891), Malme (1909), Lillo (1919, 1921), Schulz (1937), Meyer (1944, 1950, 1970, 1977), Pontiroli (1983), Swarupanandan *et al.* (1996), Zuloaga *et al.* (1999) y Endress (2000) constituyen un valioso aporte al estudio de la familia.

1.1.1.1. Descripción de la Familia *Asclepiadaceae*

Flores hermafroditas, actinomorfas, pentámeras. Cáliz con lacinias partidas casi hasta la base. Corola gamopétala, campanulada, infundibuliforme, tubo de longitud variable. Lóbulos planos o retorcidos, valvados o imbricados en la prefloración. Dentro de la corola generalmente hay otro verticilo, denominado corona, que puede ser simple o doble, puede ser tubulosa o con lóbulos completamente independientes; puede estar insertado en el tubo de la corola, en la base del ginostegio o en ambas simultáneamente. El androceo y el gineceo están soldados en un solo cuerpo central denominado ginostegio, ocupando las paredes laterales los órganos masculinos y la base y la parte central los femeninos. Anteras biloculares, lateralmente dehiscentes, soldadas al estilo y estigma por la base y parte central. Polen agrupado en masas compactas llamadas polinias, sostenidas por caudículas y fijas por partes al retináculo. Ovario súpero, bicarpelar, un carpelo aborta casi siempre en la fructificación. Estilos 2, libres hasta el estigma. Estigma generalmente provisto en la parte superior de uno o varios apéndices estigmáticos, carnosos y membranáceos, de formas variadas. Óvulos numerosos, pluriseriados, en una placenta prominente. Folículos ovoideos o fusiformes, dehiscentes por sutura ventral, de superficie lisa, rugosa, escasa, alada o espinosa; glabros o pubescentes, raramente lanosos. Semillas planas, a veces marginadas, provistas de un vilano (pappus).

Plantas perennes, latescentes, de tallo erguido, voluble (dextrorso) o rastrero. Hojas simples, opuestas (raramente verticiladas), pecioladas.

Inflorescencia por lo común cimosa, umbeliforme o racemiforme, axilar, extraaxilar o terminal (Meyer, 1977).

Dentro de los géneros reportados para la familia *Asclepiadaceae* en nuestro país, se encuentra *Morrenia* Lindley.

1.1.1.2. Descripción del Género *Morrenia* Lindley

Cáliz 5-partido, con glándulas en la base interna de las lacinias; lacinias triangulares, glabras en la cara superior y finamente pubescentes en la inferior. Corola campanulado-rotácea; lóbulos triangular-alargados, generalmente glabros en la cara superior y pubescentes en la inferior. Corona tubulosa, inserta en la soldadura del ginostegio con la corola, con 5 lóbulos, muy anchos, a veces pubescentes-barbados en la base. Ginostegio sésil o brevemente estipitado. Anteras cuadrangulares o subtriangulares y en algunas especies se presentan las dos formas sobre una misma flor. Apéndice estigmático largo o breve, siempre partido en el ápice. Retináculo oblongo o romboidal. Caudículas descendentes. Polinias ovoideas, péndulas. Folículos ovoideos, gruesos, superficie lisa o rugosa, con surcos longitudinales o transversales, a veces con aspecto típicamente cerebroideo. Pericarpio grueso, 1-3 cm, con la parte central aerenquimática rica en laticíferos. Semillas planas, ovoideas u oblongas, vistas de frente; cada folículo posee de 60 a 120 semillas. Arbustos o subarbustos volubles, ramas 4-8 m de longitud. Hojas polimorfas, triangular-hastadas, lanceoladas-hastadas o lineal-hastadas, más raramente ovado-cordadas; siempre con pecíolo más o menos largo. Inflorescencias extraaxilares, umbeliformes. Pedicelos comúnmente más largos que el pedúnculo (Meyer, 1977).

La revisión taxonómica completa sobre el género en Argentina fue la realizada por Teodoro Meyer (1944, 1950, 1970, 1977), en la cual se reconocen 9 especies: *M. odorata* (Hook. et Arn.) Lindley; *M. brachystephana* Grisebach; *M. variegata* (Griseb.) T. Meyer; *M. Herzogii* Schlechter; *M. intermedia* T. Meyer; *M. Stormiana* (Morong) Malme; *M. grandiflora* Malme; *M. stuckertiana* (Kurtz ex Sturckert.) Malme y *M. Schulziana* T. Meyer.

Crecen en suelos pobres arenosos y salobres, generalmente en cercos y alambrados distantes entre sí, sin agruparse (Meyer, 1944).

1.1.2. Etnobotánica

El hombre ha utilizado, desde tiempos remotos, especies vegetales con fines medicinales. Nuestro país no escapa a ese interés. Sin embargo el conocimiento acerca de esos vegetales se ha obtenido y conservado quizás más mediante la cultura popular que por la

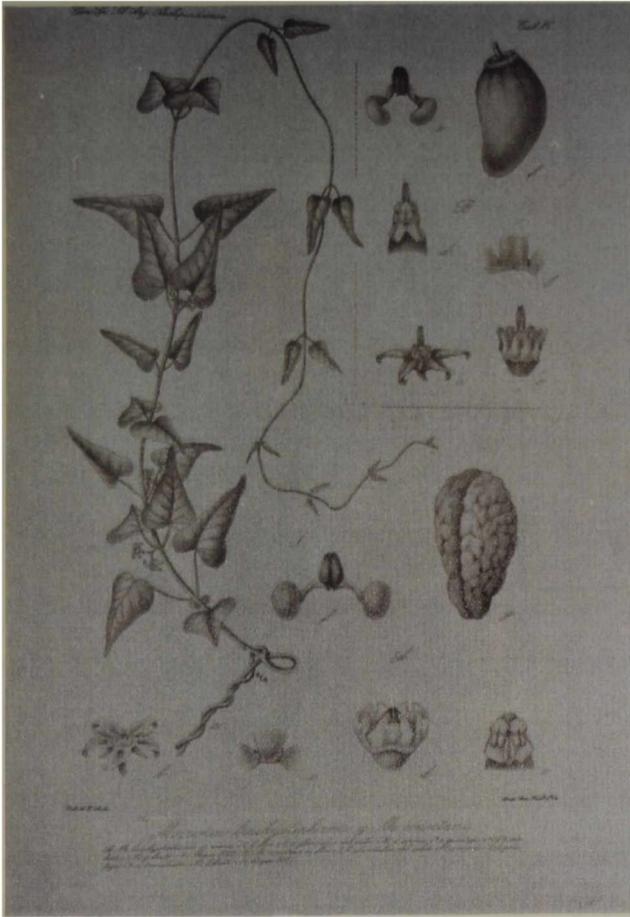
investigación de los especialistas. Estos han realizado trabajos sobre el tema en sus distintos aspectos, pero con altibajos en el transcurso del tiempo. Así, una obra de particular interés es la de Hieronymus (1882), en la cual se hace referencia a representantes de la familia *Asclepiadaceae*.

Existen obras posteriores significativas donde consta que varias *Asclepiadáceas* han sido utilizadas en medicina popular (Ragonese & Martínez Crovetto, 1947; Soraru & Bandoni, 1978; Toursarkissian, 1980; Martínez Crovetto, 1981; Lifchitz, 1985; Marzocca, 1997).

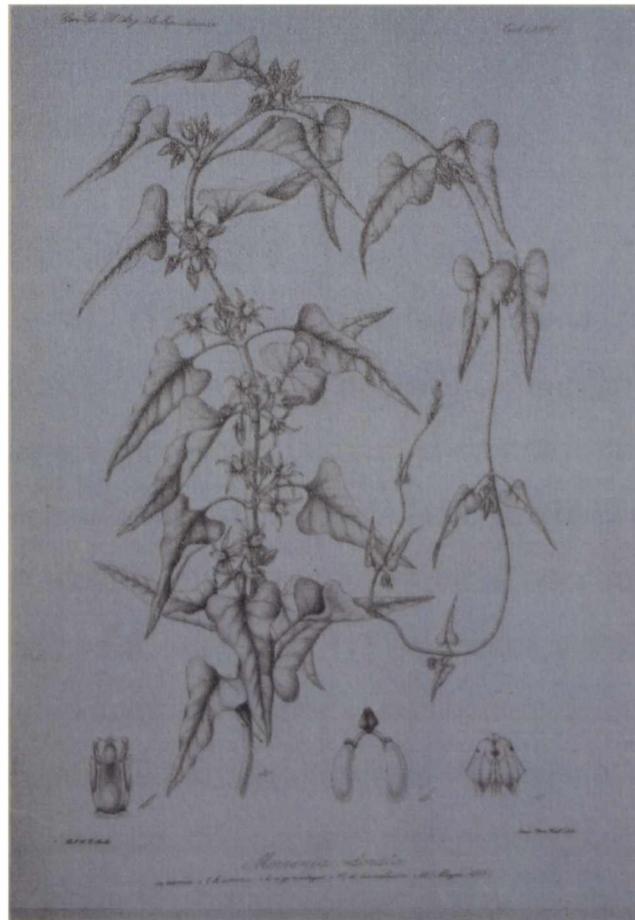
En nuestro país, el uso vernáculo del género *Morrenia*, está restringido a *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (Lám. II). Para *M. brachystephana* los nombres más difundidos en el habla popular son: **tasi**; **îsîpo'á**; **doca**; **taluí** en lengua toba (Martínez Crovetto, 1964) y para *M. odorata*: **tasi**; **tási**; **doca** en Corrientes e **îsîpo'á**, **dora** en la R.O. del Uruguay. Estudios etnográficos más recientes referidos a grupos indígenas en particular mencionan a *M. odorata* como: **soonók** en lengua vilela; **guaicurú rembiú**, **l(u)guarái** en toba; **'chaGarae** en pilagá; **ici' nhe** los Maká, (Arenas 1983) y con el nombre de **Kaaya** la conoce la tribu Lengua-Maskoy (Arenas 1981).

En medicina popular “el tasi” se ha preconizado como galactogogo y como tal se le ha inscripto en la 1ª edición de la Farmacopea Nacional Argentina (1898); habitualmente se emplean frutos, tallos y raíces al 15 o 20%. Se administra en decoción, extracto fluido, elixir, etc., (Domínguez, 1903, 1928; D'Alessandro, 1915).

El látex de *M. odorata* se emplea para extirpar verrugas y el de *M. brachystephana* sirve para coagular la leche. En las provincias de Salta, Tucumán y Santiago del Estero los frutos inmaduros son utilizados por los indígenas para elaborar dulces. Los frutos no maduros de *M. odorata* y *M. variegata* también son muy codiciados por los indígenas del Chaco, Formosa y Salta, quienes los comen crudos o asados (Meyer, 1977). Los Pilagá, indígenas que viven actualmente en el centro de la provincia de Formosa, consideran a los frutos de *M. odorata* asados al rescoldo un buen remedio para curar a los “empachados” (**ko'waGayk**), quedando esta especie incorporada en la farmacopea de origen natural que emplea este grupo humano (Filipov, 1997).



Morrenia brachystephana Griseb.



Morrenia odorata (Hook. et Arn.) Lindley

1.1.3. Anatomía

Los estudios anatómicos generales de la familia *Asclepiadaceae* fueron abordados por Solereder (1908) y Metcalfe & Chalk (1950), los que establecieron que por la cercana relación entre esta familia y las *Apocynaceae* las mismas presentan caracteres comunes, siendo los más destacados la presencia de laticíferos, tallos fotosintéticos con floema intraxilar, desarrollo superficial de súber y un anillo de fibras blandas dispuesto en forma discontinua.

Las características anatómicas de los frutos de las *Asclepiadaceae* fueron descritas por Roth (1977), quien menciona la formación placentaria interesante del folículo de *Asclepias sp.* donde el tejido constituyente se transforma, hacia la madurez, en un aerénquima con numerosos espacios intercelulares, mientras que el estudio morfológico y anatómico del fruto de *Araujia hortorum* fue abordado por Castro (1986).

Ogundipe (1993) cita caracteres anatómicos de tallos y hojas de *Calotropis procera* que permiten el reconocimiento de la especie al estado de droga cruda.

Las estructuras secretoras fueron analizadas por Fahn (1979) y Buvat (1989), quienes determinaron la presencia de laticíferos no articulados ramificados en los géneros *Asclepias*, *Ceropegia* y *Cryptostegia*, todos ellos pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae*.

1.1.4. Laticíferos: ontogenia y ultraestructura

Los trabajos que realizara Mahlberg (1959, 1961, 1963) en *Nerium oleander* (*Apocynaceae*) y junto a Wilson *et al.* (1976) en *Asclepias syriaca* (*Asclepiadaceae*) permitieron caracterizar a los laticíferos por su origen y desarrollo temprano, estableciendo que las células iniciales de los mismos son ya reconocibles en el embrión inmaduro y que su posterior crecimiento sugiere la existencia de un sistema enzimático pectolítico.

La ultraestructura fue descrita detalladamente tanto en embriones maduros como en plántulas de *Asclepias syriaca* por Wilson & Mahlberg (1978). Estos autores determinaron que los laticíferos en el embrión poseen numerosas vesículas con contenido electrodenso, pero falta la vacuola central. En la plántula se determina la presencia de vacuolas alargadas en los laticíferos, las que se originan por dilatación del retículo endoplasmático. El resto de las organelas presentan iguales características en los laticíferos del embrión y de la plántula.

1.1.5. Látex: composición y funciones

La función del látex en sí misma es desconocida (Esau, 1965; Buvat, 1989). La hipótesis acerca de sus funciones en el balance hídrico, conservación de nutrientes y transporte no han ganado credibilidad. También ha sido considerado una clase de producto de desecho por contener metabolitos secundarios. Sin embargo, en vista de la gran cantidad de proteínas presentes en algunos laticíferos, esto no parece razonable. Algunos laticíferos contienen metabolitos secundarios altamente tóxicos, tales como lectinas tóxicas o fuertes inhibidores de proteasas (Archer, 1976). La localización de laticíferos en las capas más externas de las cortezas de los árboles o en la cara externa del floema también sugiere una función defensiva del látex.

Dentro del látex, las proteasas pueden tener una función intrínseca. Una hipótesis sugiere que participan en la degradación de proteínas en etapas tempranas del desarrollo de los laticíferos de algunas especies, como por ejemplo en *Asclepias syriaca*, donde las proteasas localizadas en vacuolas autofágicas serían las encargadas de removilizar los aminoácidos de las proteínas. Cantidades relativamente pequeñas de proteasas pueden ser suficientes para esta función (Wilson *et al.*, 1976).

Otra función intrínseca podría ser la de promover la coagulación del látex, dado que si bien normalmente el mismo se conserva bajo una considerable presión de turgencia y fluye profusamente luego de un corte, en la mayoría de los casos coagula previniendo un posterior daño del laticífero (Boller, 1986; Moutim, *et al.*, 1999).

1.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

1.2.1. Enzimas proteolíticas: generalidades

Las enzimas que desempeñan el rol central en la degradación de las proteínas han sido conocidas tradicionalmente como “proteasas”, término equivalente al de “péptido-hidrolasas” y también al de “enzimas proteolíticas”. Estas enzimas están involucradas en una gran variedad de procesos fisiológicos y su modo de acción puede dividirse en dos categorías diferentes (Moreau & Choplin, 2000):

1. *proteólisis limitada*, en la cual una proteasa hidroliza sólo uno, o bien un número limitado de enlaces peptídicos de una determinada proteína inicialmente inactiva o precursora, provocando de este modo su transformación en una proteína biológicamente activa, (por ej. conversión de prohormonas en hormonas, conversión de zimógenos en enzimas activas).
2. *proteólisis ilimitada*, en la cual una proteína determinada es degradada a sus aminoácidos constituyentes. La degradación de las proteínas puede ser dependiente de la ubiquitina, polipéptido que se une selectivamente a la misma para constituir la forma conjugada ubiquitina-proteína, susceptible de ser rápidamente hidrolizada en los proteosomas o bien mediante la compartimentalización de proteasas en vacuolas. Cuando las proteínas son transferidas a estos compartimentos vacuolares sufren una rápida degradación (Vierstra, 1996).

Todas las plantas recambian proteínas en el curso de su desarrollo y por lo tanto contienen enzimas proteolíticas. Normalmente estas proteasas se encuentran presentes con actividades relativamente bajas y a menudo son de difícil detección. Sin embargo, algunas especies vegetales poseen proteasas sumamente activas en ciertos tejidos: en algunos látex obtenidos de plantas de diversas familias las enzimas proteolíticas constituyen más del 50% del total de proteínas y 10% o más del material fresco (Boller, 1986).

1.2.1.1. Nomenclatura: proteasas, proteinasas o peptidasas

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) en 1984 recomendó utilizar el término *peptidasa* para el grupo de hidrolasas de uniones peptídicas, asignándoles el código EC 3.4.

Las *peptidasas* a su vez comprenden dos grandes grupos de enzimas: las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las primeras cortan uniones peptídicas internas y las últimas remueven secuencialmente aminoácidos desde el N-terminal o C-terminal (Bergman & Ross, 1936). Los términos *proteasa* y *proteinasa*, ampliamente usados, son también empleados como sinónimos de *endopeptidasa*.

1.2.1.2. Interacción Enzima-Sustrato

En general, las proteasas se unen al sustrato apropiado a través de los denominados sitios activos que permiten luego catalizar la hidrólisis de la unión peptídica específica (Mc Donald, 1985). Según la nomenclatura introducida por Schechter & Berger (1967) y hoy utilizada ampliamente, la zona de unión del sitio activo puede subdividirse en subsitios o sitios específicos (S), cada uno de los cuales permite la ubicación de un residuo aminoacídico del sustrato o péptido (P). Los subsitios se ubican a ambos lados del sitio activo y a partir del mismo se numeran en forma correlativa, bien respecto en dirección al N-terminal (S_1 , S_2 , S_3 , etc.) o bien hacia el C-terminal (S'_1 , S'_2 , S'_3 , etc.). En cuanto al sustrato, los aminoácidos que interactúan con la proteasa son numerados (P_1 , P_2 , P_3 , etc.) en relación a los subsitios en los cuales se ubican respecto del N-terminal o (P'_1 , P'_2 , P'_3 , etc.) hacia el C-terminal, (Fig. 1).

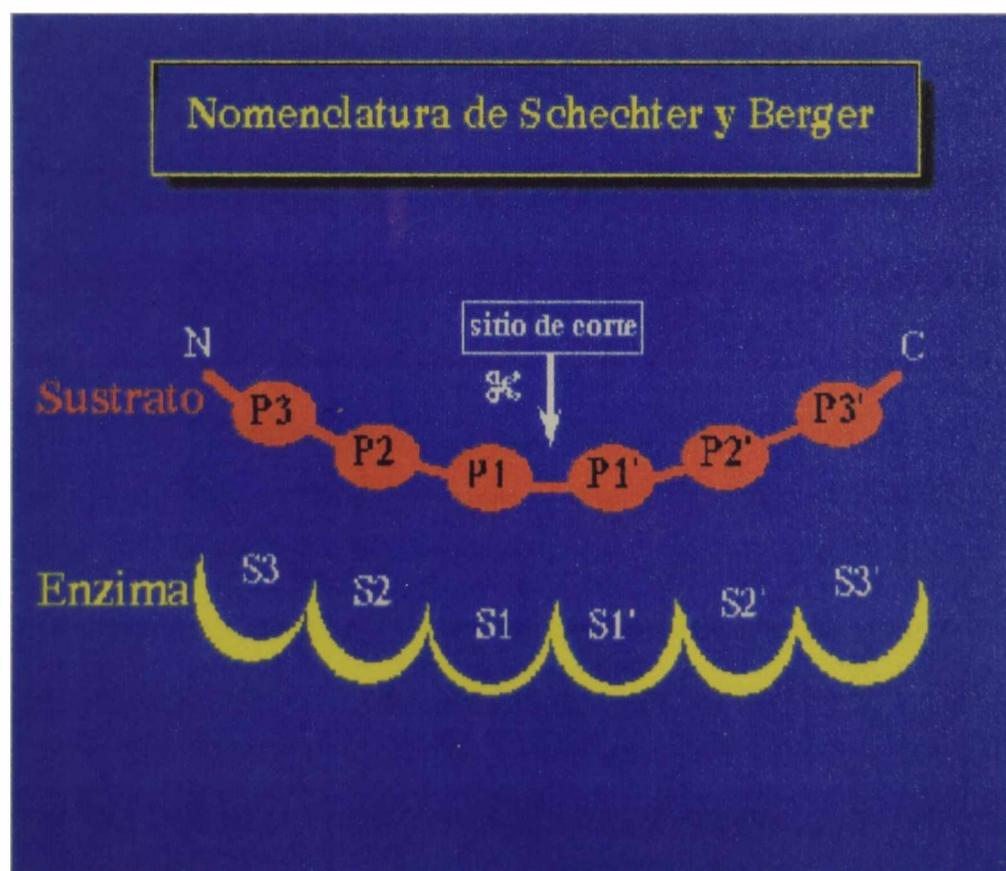


Figura 1. Interacción Enzima-Sustrato

1.2.1.3. Clasificación: mecanismos catalíticos

Las peptidasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a clasificarlas en base a las características de sus respectivos mecanismos catalíticos (Hartley, 1960). Dentro de cada clase de peptidasas se reconocen diferentes familias, siendo el término “familia” utilizado para describir un grupo de peptidasas en el que cada miembro muestra una relación evolutiva con al menos otro, ya sea a través de la secuencia completa o al menos en la parte de la secuencia responsable de la actividad catalítica (Rawlings & Barrett, 1993).

En la actualidad se reconocen cinco tipos de peptidasas (Barrett *et al.*, 1998), en las cuales serina, treonina, cisteína, aspártico o grupos metálicos juegan roles primarios en la catálisis. Las peptidasas serínicas, treonínicas y cisteínicas son catalíticamente muy diferentes de las aspárticas y metalopeptidasas, ya que en las primeras el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido, mientras que en las dos últimas es una molécula de agua la que actúa sobre el grupo carbonilo de la unión peptídica. Dado que se conocen unas pocas familias en las que el mecanismo catalítico depende de la treonina, en general a las peptidasas treonínicas, por conveniencia práctica, se las agrupa con las peptidasas serínicas.

1.2.1.3.1. Peptidasas serínicas y treonínicas (EC 3.4.21)

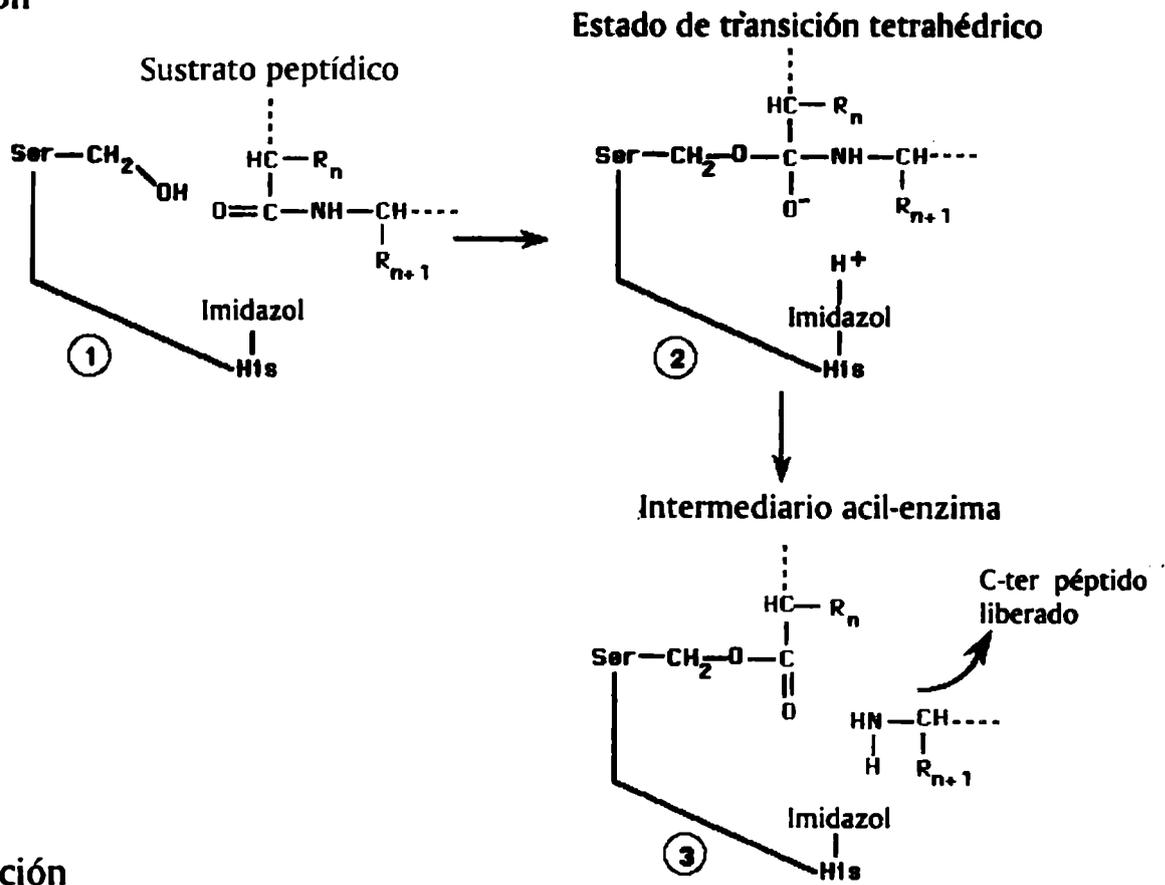
Esta clase comprende dos familias distintas: la familia de la quimotripsina, que incluye enzimas de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastasa), plantas y microorganismos y la familia de la subtilisina, que si bien en un principio se creyó constituida solamente por enzimas bacterianas tales como subtilisina, actualmente incluye enzimas provenientes de otros microorganismos, plantas y animales superiores. Si bien la estructura general 3D es diferente en las dos familias, ambas tienen la misma geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con el mismo mecanismo. Las proteinasas serínicas exhiben diferentes especificidades de sustrato, relacionadas a las sustituciones de aminoácidos en varios subsitios enzimáticos interactuando con los residuos de los sustratos. Algunas enzimas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato mientras otras tienen una especificidad restringida al residuo P₁ del sustrato.

En el proceso catalítico son esenciales tres residuos que forman la tríada catalítica, His-57, Asp-102 y Ser-195 (la numeración dada a cada aminoácido corresponde al sistema de numeración del quimotripsinógeno). La primera etapa en la catálisis es la formación de un intermedio acil-enzima entre el sustrato y el aminoácido serina. La formación de este intermedio covalente procede a través de un estado intermedio de transición tetraédrico cargado negativamente y luego el enlace peptídico es cortado. Durante la segunda etapa o deacilación, el intermedio acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua para liberar el péptido y para restaurar el hidroxilo serínico de la enzima. La deacilación involucra también la formación de un estado de transición tetraédrico intermedio, que se produce a través de la reacción inversa a la vía de acilación. Una molécula de agua es el nucleófilo atacante en lugar del residuo serina. La histidina provee una base general y acepta el grupo –OH de la serina reactiva (Moreau & Choplin, 2000), (Fig. 2).

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

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

Acilación



Deacilación

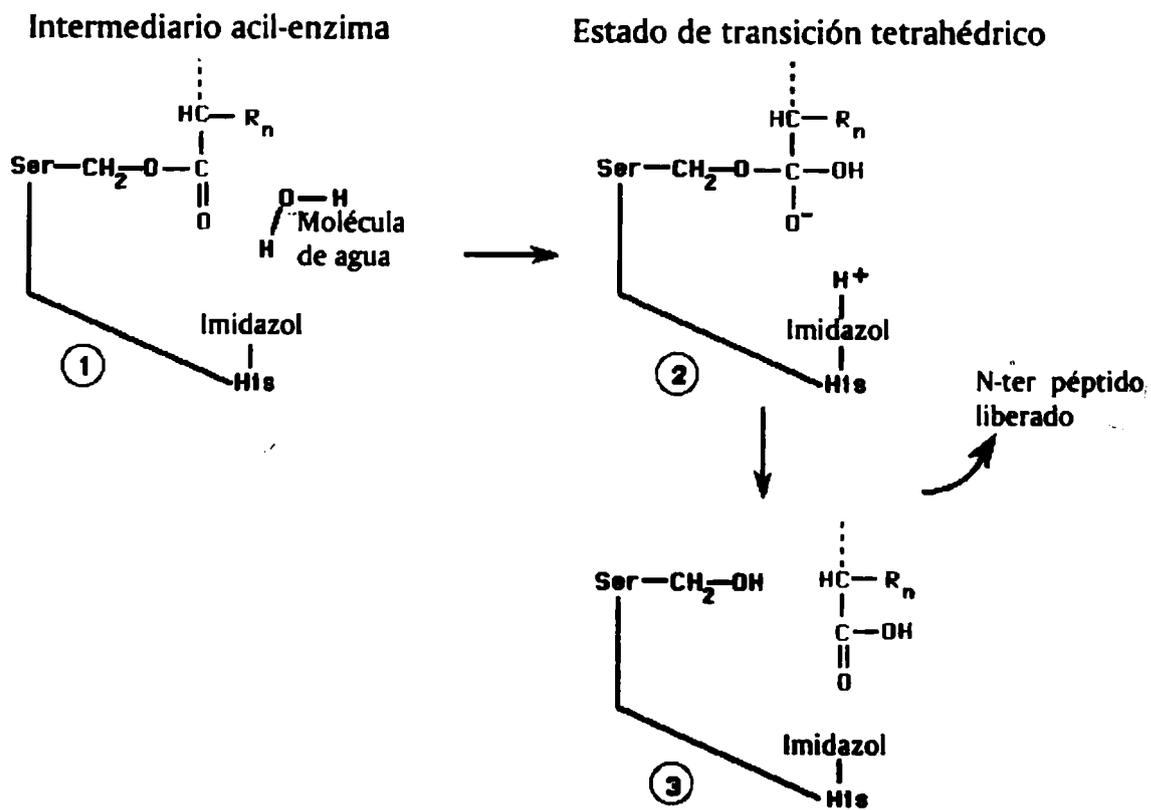


Figura 2. Mecanismo catalítico de las proteinasas serínicas.

1.2.1.3.2. Peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22)

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

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cys-25 y la His-159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Ser-195 y de la His-57, respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo -OH, sino un ión tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la His-159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua (Moreau & Choplin, 2000).

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó “tiolproteinasas” (Hartley 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término “tiolproteinasas” por el de “proteinasas cisteínicas” (NC-IUBMB, 1984), (Fig. 3).

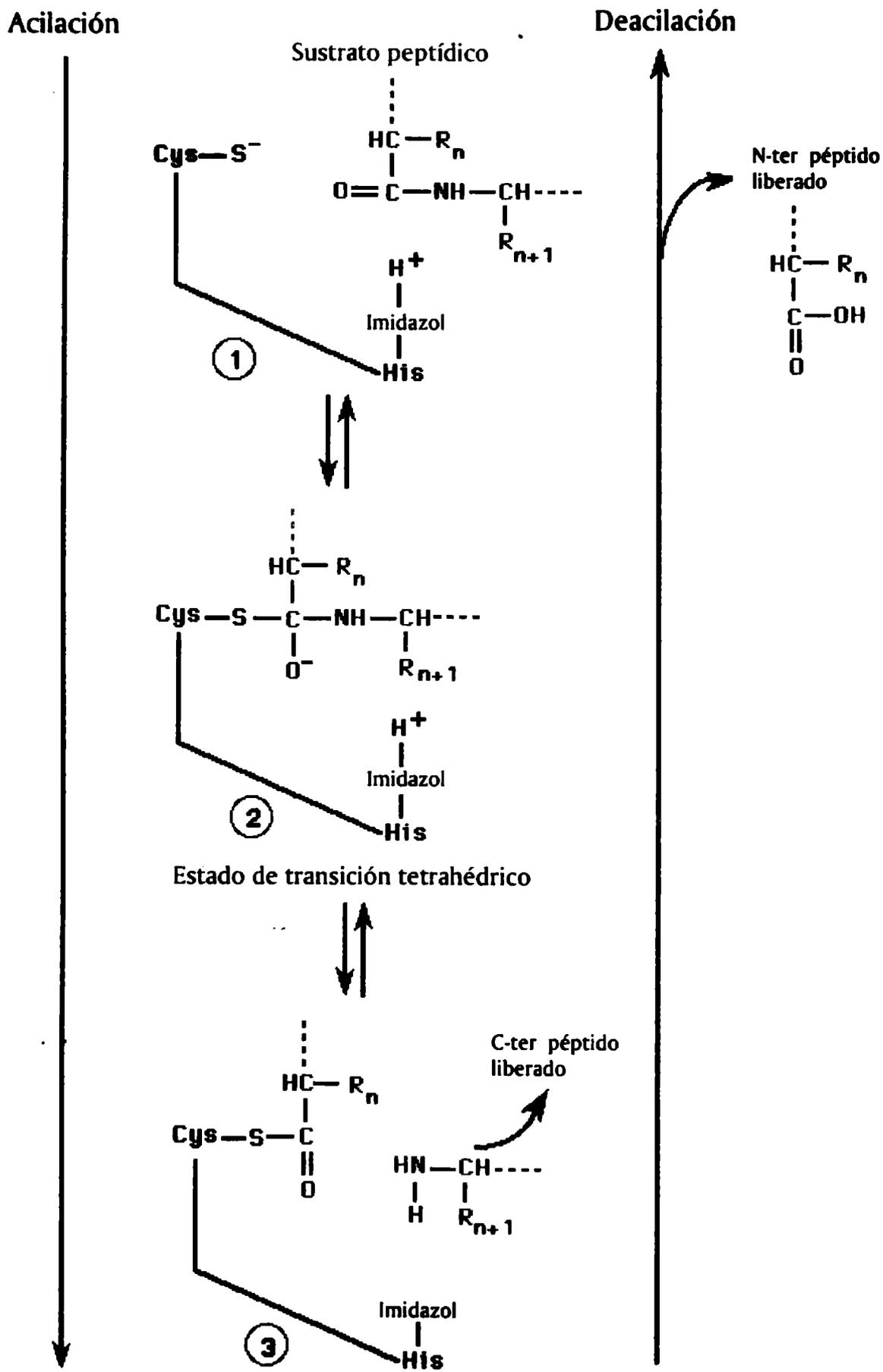


Figura 3. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.

1.2.1.3.3. Peptidasas aspárticas (EC 3.4.23)

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

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

En contraste con las proteasas serínicas y cisteínicas, la catálisis de las aspárticas no involucra enlaces covalentes intermedios, aunque existe un intermedio tetraédrico. El ataque nucleofílico se realiza por la transferencia simultánea de dos protones: uno desde una molécula de agua a la díada de dos grupos carboxilos y un segundo desde la díada al oxígeno del grupo carbonilo del sustrato con la consecuente rotura del enlace peptídico. Esta catálisis general ácido-base permite la formación de un intermedio tetraédrico no covalente (Moreau & Choplin, 2000), (Fig. 4).

Las proteasas aspárticas vegetales conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar fitepsina aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Oryza* y *Vigna*, (Kervinen, 1998), además de ciprosina obtenida a partir de *Centaurea calcitrapa* y de *Cynara cardunculus* (Cordeiro *et al.*, 1998) y cardosina A (Pires 1998a) y cardosina B (Pires, 1998b) aisladas de *Cynara cardunculus*.

Estas enzimas pueden ser monoméricas o heterodiméricas, conteniendo dos péptidos procesados a partir del mismo precursor proteico. Las proteinasas aspárticas de los vegetales son generalmente secretadas o bien destinadas al compartimento vacuolar.

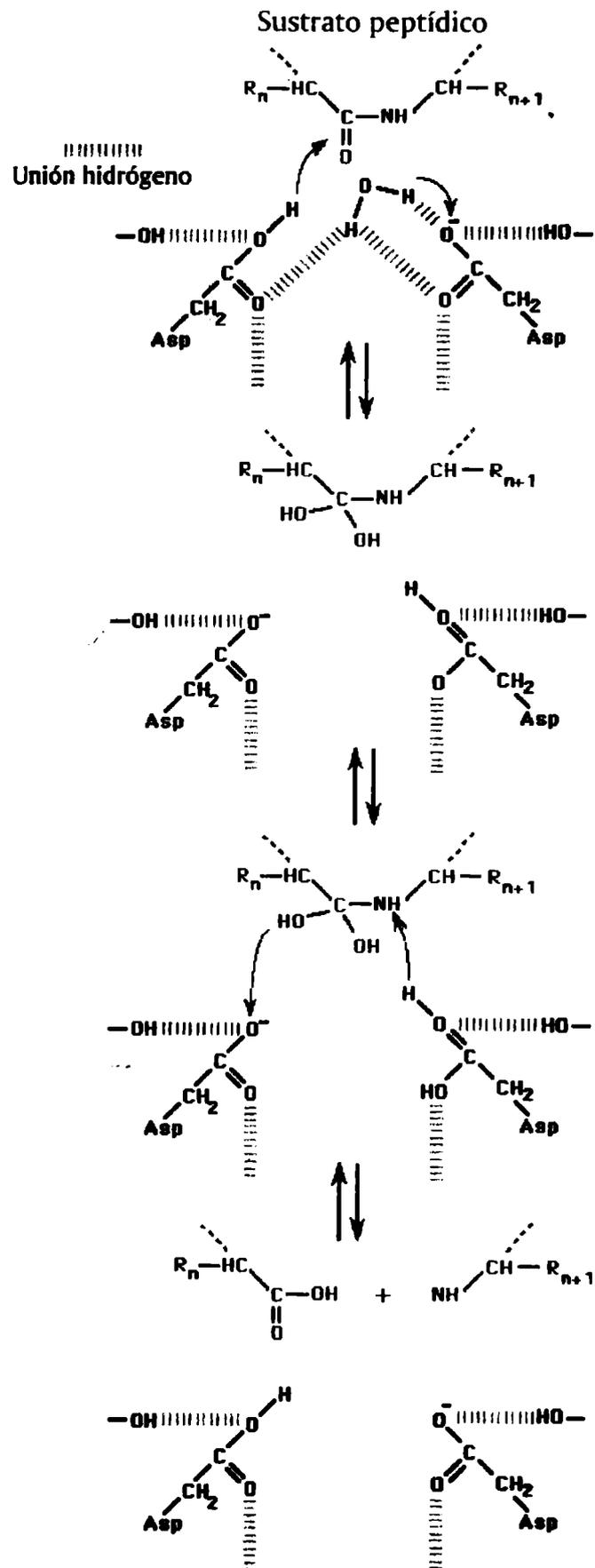


Figura 4. Mecanismo catalítico de las proteinasas aspárticas.

La secuencia primaria de algunas de estas enzimas ha sido determinada y son homólogas con las de origen animal y microbiano; sin embargo, las proteinasas aspárticas vegetales tienen una región muy específica (“inserto específico vegetal”) que no se encuentra en animales, microorganismos o proteinasas virales. Si bien la función de esta región no ha sido aún elucidada se ha propuesto una función en el procesamiento o degradación de proteínas, aunque se requerirían más estudios para confirmar su función *in vivo*. Recientes resultados sugieren posibles roles en la muerte celular programada (apoptosis) y en la resistencia a los patógenos (Mutlu & Gal, 1999).

1.2.1.3.4. Metalopeptidasas (EC 3.4.24)

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

Estas proteinasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En varias metaloproteasas se requiere solamente un ión cinc, pero en algunas son dos los iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso requieren dos iones metálicos, aunque hay familias dependientes de cinc en las que también dos iones son cocatalíticos. En las proteinasas con iones metálicos cocatalíticos solamente 5 residuos aminoacídicos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metaloproteinasas con un ión metálico catalítico pueden ser exo o endopeptidasas. Los ligandos conocidos son histidina, glutamina, aspártico o lisina.

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

cinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico. Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos histidinas para el cinc mientras el tercer ligando es tanto ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasas) o una histidina (astacina). Otras familias exhiben un modo diferente de unión al átomo de cinc. El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermedio tetraédrico no covalente luego de atacar una molécula de agua al cinc unido sobre el grupo carbonilo del enlace escindible. Este intermedio es posteriormente descompuesto por transferencia del protón del ácido glutámico al grupo saliente (Moreau & Choplin, 2000), (Fig. 5).

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

1.2.1.3.5. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido (EC 3.4.99)

Existe un número de peptidasas para las cuales el mecanismo catalítico no se ha elucidado. Aquellas sobre las cuales se conoce la secuencia de aminoácidos se han denominado con la letra “U” (peptidasas Unclassified) sin considerar el mecanismo catalítico y se les asigna además un número arbitrario, por ejemplo la Familia U28 que contiene a la dipeptidasa E de *Escherichia coli* (Barrett *et al.*, 1998).

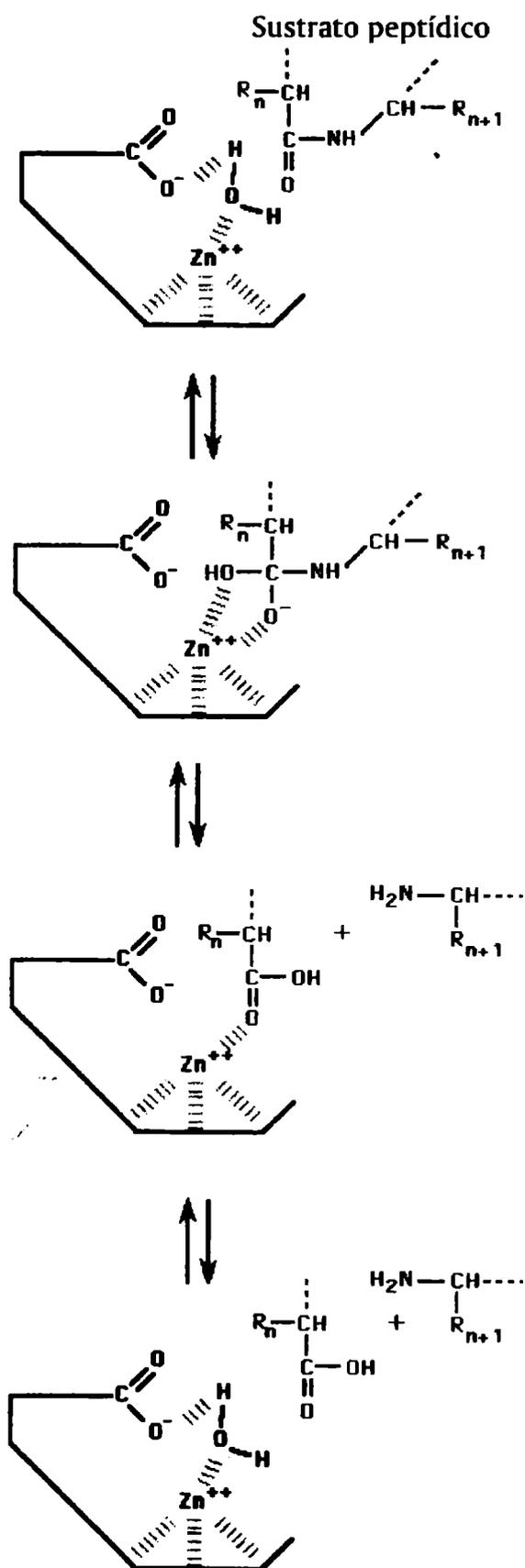


Figura 5. Mecanismo catalítico de las metaloproteinasas.

1.2.1.4. Inhibidores de peptidasas: mecanismos de acción

En principio, todo compuesto que disminuye la velocidad de hidrólisis de un sustrato determinado es un inhibidor enzimático. Sin embargo, compuestos quelantes que remueven por ejemplo iones calcio y cinc de una peptidasa metal-dependiente, al igual que agentes desnaturalizantes como urea que cambian la conformación de las proteínas, son más bien considerados inactivadores que inhibidores enzimáticos. Los inhibidores de peptidasas son definidos como aquellos que actúan directamente sobre el sitio activo, por ej. combinándose entre los sitios catalíticos de la enzima y los sitios de unión del sustrato formando un complejo fuerte y estable (Salvesen & Nagase, 1989).

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

1.2.1.4.1. Inhibidores de peptidasas serínicas

El diisopropilfluorofosfato (DFP), uno de los inhibidores de peptidasas más ampliamente utilizado, es un miembro de los compuestos organofosforados que inactiva irreversiblemente a las peptidasas serínicas mediante fosforilación de la serina activa del sitio catalítico. Es considerado el inhibidor más útil para poder identificar esta clase de peptidasas, dado que manifiesta escasa o nula acción sobre otros tipos de endopeptidasas (Salvesen & Nagase, 1989).

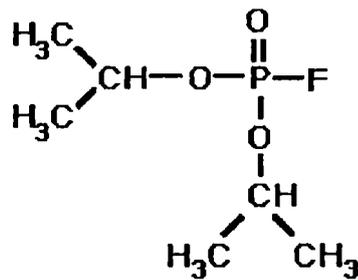


Figura 6. Diisopropilfluorofosfato (DFP)

1.2.1.4.2. Inhibidores de peptidasas cisteínicas

Las cisteinilpeptidasas contienen un grupo tiol altamente reactivo por lo que generalmente manifiestan su actividad en condiciones reductoras y en presencia de agentes quelantes, ya que los iones metálicos pueden inhibirlas. Precisamente este tipo de proteasas pueden identificarse mediante el agregado de reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilos tales como iodoacetato, cloruro mercúrico o mercuribenzoato, aunque no son aconsejables de emplear en las condiciones usuales de ensayo dado que reaccionan también con compuestos tiólicos de bajo peso molecular, por ej. con cisteína que normalmente se adiciona al medio como activador. El inhibidor aconsejable para esta clase de peptidasas es el denominado E 64: *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidin)butano, que forma un enlace tioéter irreversible con el tiol de la cisteína activa. Se ha demostrado que el E-64 inhibe todas las peptidasas cisteínicas ensayadas y que no afecta a las demás peptidasas. Además se caracteriza por actuar en relación equimolecularar (1:1 enzima/inhibidor) permitiendo de este modo la titulación del sitio activo (Barrett *et al.*, 1982).

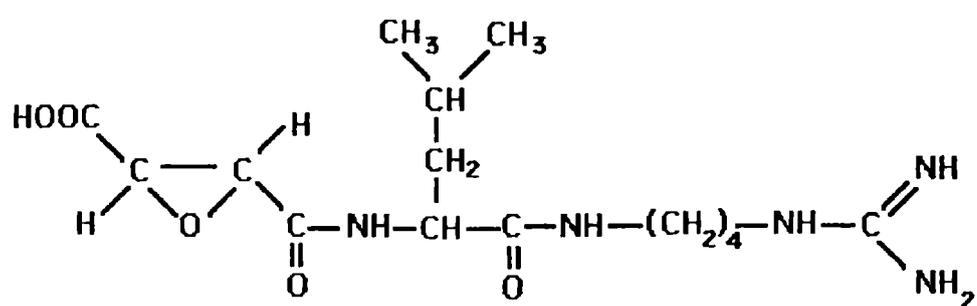


Figura 7. E-64: *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidin)butano.

1.2.1.4.3. Inhibidores de peptidasas aspárticas

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

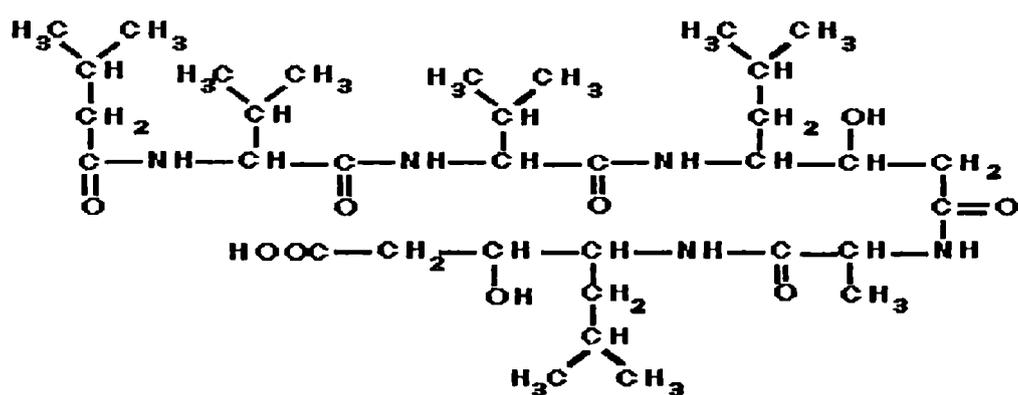


Figura 8. Pepstatina A: Isovaleril-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA, donde AHMHA es: (3S, 4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metil-heptanoico.

1.2.1.4.4. Inhibidores de metalopeptidasas

Las metalopeptidasas muestran máxima actividad a pH cercano a 7,0 y pueden ser inhibidas por acción de agentes quelantes como el EDTA o la 1,10-fenantrolina que bloquean los átomos metálicos esenciales para la catálisis (Dunn, 1989).

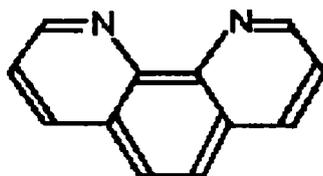


Figura 9. 1,10-fenantrolina

1.2.2. Peptidasas vegetales

1.2.2.1. Proteólisis en las plantas

La proteólisis es esencial en muchos aspectos de la fisiología y desarrollo de los vegetales. Las proteasas normalmente están involucradas en el catabolismo proteico (el recambio de las proteínas existentes y su reemplazo por otras nuevas constituye la clave para la adaptación al medio ambiente), en la regulación de varios procesos, particularmente en la germinación de semillas (las proteínas de reserva son movilizadas para la construcción de las proteínas que requiere la plántula), en la formación de órganos reproductores y en la senescencia de algunos órganos como las hojas (en este proceso las proteínas se degradan y sus aminoácidos son transportados y almacenados en aquellos lugares donde se sintetizan nuevas proteínas). Aunque las proteasas usualmente están de este modo vinculadas al metabolismo primario de la planta, en la movilización de las reservas y en el recambio proteico, existen evidencias de que algunas proteasas cumplen otras funciones, por ejemplo actúan en interacción con otros organismos. Obviamente, las proteasas de plantas insectívoras actúan de este modo. Estas proteasas con un pH óptimo de acción ácido, son capaces de digerir las proteínas de una presa capturada y obtener de esta forma nutrientes para su mantenimiento (Boller, 1986).

En definitiva, la proteólisis es responsable del mantenimiento celular y de la respuesta al estrés mediante la remoción de proteínas anormales y/o mal plegadas, aporta los aminoácidos necesarios para fabricar nuevas proteínas, ayuda en la maduración de zimógenos y hormonas peptídicas mediante escisiones limitadas y controla el metabolismo, la homeostasis y el desarrollo, disminuyendo la abundancia de enzimas claves y proteínas regulatorias, así como la muerte celular programada de ciertas células y órganos de la planta (Vierstra, 1996).

1.2.2.2. Cantidad de enzimas proteolíticas en los vegetales

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

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

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

Las proteasas presentes en el látex de algunas especies representan más del 50% del total de las proteínas. La principal proteinasa del látex de frutos de papaya, papaína (EC 3.4.22.2), se encuentra en una concentración tal que excede en dos veces la cantidad necesaria para el recambio de las proteínas del fruto (Glazer & Smith, 1971). También ficina (EC 3.4.22.4), presente en el látex de higos, se encuentra en cantidades abundantes. Asimismo, tanto en partes vegetativas como en frutos de varias especies pertenecientes a la familia *Bromeliaceae* se observan grandes cantidades de enzimas proteolíticas. A estas proteasas también se las llamó “proteínas prescindibles” (Adams & Rinne, 1981). Es además interesante

destacar que las proteasas cisteínicas presentes en cantidades elevadas en familias vegetales no relacionadas muestran un alto grado de similitud con respecto a sus características bioquímicas (estabilidad, pH óptimo, temperatura óptima), a su especificidad y aún a sus estructuras primaria y secundaria. Estas proteasas son a menudo consideradas prototipos de peptidasas cisteínicas vegetales. Sin embargo, esto no es necesariamente cierto. Las peptidasas cisteínicas que han evolucionado para realizar funciones primarias, por ej. para la movilización de proteínas de reserva en las semillas, pueden ser diferentes. Una proteinasa cisteínica de *Vigna* involucrada en la ruptura de la principal proteína de reserva de la semilla ha sido purificada a partir de semillas germinadas. Esta enzima presenta una masa molecular de 23 kDa, como la papaína, pero difiere considerablemente en su especificidad. Más aún, la proteasa de *Vigna* es mucho más sensible que papaína a elevadas temperaturas y tiene una marcada tendencia a fragmentarse por procesos autolíticos. La peptidasa cisteínica que hidroliza la proteína de reserva endógena durante la germinación del maíz, aunque sólo ha sido caracterizada parcialmente, parece diferir en varios aspectos de aquellas proteasas que se encuentran en cantidades elevadas. La sorprendente similitud bioquímica de las proteasas cisteínicas altamente abundantes no indicaría un ancestro común, como se ha sugerido, sino más bien una convergencia evolutiva como resultado de una función defensiva común. En efecto, es de esperar que aquellas proteasas que se acumulan para propósitos defensivos presenten una elevada estabilidad, una amplia especificidad de sustrato y la falta de una tendencia autolítica. Estas propiedades, características indispensables para la acción de estas enzimas, las distingue de otras proteinasas, como por ejemplo las que actúan en el proceso de germinación (Boller, 1986).

1.2.2.3. Detección y localización enzimática *in situ*

La histoquímica enzimática permite evidenciar la presencia de enzimas específicas en el sitio donde éstas se localizan, dentro de las células intactas. Esto es posible a través del uso de sustratos naturales o artificiales capaces de penetrar en el tejido y reaccionar con la enzima de interés. De este modo, el tejido vegetal fresco conteniendo la enzima se prepara para la histoquímica enzimática mediante fijación por congelamiento y posteriormente se incuba en una solución del sustrato específico para la clase de enzima considerada. Después de la

reacción enzimática, el producto de reacción formado puede localizarse dentro de las células y tejidos intactos mediante microscopía óptica, de fluorescencia o electrónica de transmisión. Para las peptidasas en particular se proponen como métodos de localización enzimática *in situ* los de “film sustrato” de Denker y de Fratello (Bhalla *et al.*, 1986).

1.2.2.4. Peptidasas de látex

Muchas plantas, especialmente de climas tropicales y subtropicales, exudan un látex rico en enzimas digestivas. Entre las enzimas proteolíticas más abundantes en látex figuran las proteasas cisteínicas y serínicas. Por otra parte, las proteasas aspárticas no aparecen en la lista de las proteasas altamente abundantes en los vegetales.

Varias peptidasas cisteínicas muy activas fueron aisladas a partir de látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y de ciertas especies de higos (*Moraceae*), siendo las más intensamente estudiadas con relación al mecanismo de catálisis y a la estructura. Estas proteasas son producidas comercialmente en gran escala y utilizadas en una variedad de aplicaciones industriales (Kimmel & Smith, 1957; Glazer & Smith, 1971).

Si bien pareciera que la presencia de elevada actividad proteolítica es típica en todas las plantas con látex, o al menos en muchas familias, ello no es una regla general: por ejemplo, *Hoya carnososa* (*Asclepiadaceae*) no presenta actividad proteolítica medible, al igual que *Acanthera spectabilis* y *Vinca minor* (*Apocynaceae*). Es un caso a tener en cuenta el de la familia *Moraceae*, donde Robbins & Lamson (1934) encontraron que de 16 especies estudiadas del género *Ficus*, 7 de ellas no manifestaban actividad proteolítica considerable. Un aspecto interesante es que la actividad específica (unidades por mg de proteína) fue casi idéntica para 16 variedades diferentes de *Ficus carica*, aunque el contenido de proteínas varía marcadamente. También fue constante la actividad específica para especies del género *Ficus* cosechadas en distintos lugares y en distintas épocas del año. Estos datos indicarían que la actividad específica es característica de cada especie pero no necesariamente del género (Williams *et al.*, 1968).

Además, la especificidad de las proteinasas cisteínicas de *Carica*, *Ficus* y *Asclepias* son muy similares en su acción sobre la cadena B de la insulina (Lynn, 1983). Este comportamiento puede obedecer, como se mencionó anteriormente, a una evolución convergente de las proteasas de látex (Boller, 1986).

1.2.2.4.1. Peptidasas de *Caricaceae*

A partir del látex de frutos de *Carica papaya* L. (*Caricaceae*) Brocklehurst & Salih (1983) aislaron al menos 4 proteasas cisteínicas mayoritarias con propiedades enzimáticas similares, aunque diferenciables por sus actividades relativas sobre diferentes sustratos (Glazer & Smith, 1971), por su reactividad frente a reactivos sulfhidrúlicos (Baines & Brocklehurst, 1982) y por su basicidad (Brocklehurst & Salih, 1983).

El menor constituyente del látex de papaya, papaína, pudo ser fácilmente cristalizada (Robinson, 1975) y muy bien caracterizada desde un punto de vista bioquímico y biofísico (Kimmel & Smith, 1957; Amon, 1970; Glazer & Smith, 1971; Syu *et al.*, 1983). Se le determinó la secuencia de aminoácidos (Hussain & Lowe, 1970) y la estructura cristalina (Kamphuis *et al.*, 1984). Además se analizó muy bien su mecanismo de acción enzimática (Brocklehurst *et al.*, 1981). Según los trabajos de Cohen *et al.* (1986) se logró clonar y secuenciar el ADN que codifica a la papaína, el que posteriormente se pudo expresar en *Escherichia coli* (Cohen *et al.*, 1990) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Vernet *et al.*, 1993).

Dado que la mayoría de los trabajos se llevaron a cabo con látex de papaya seco, disponible comercialmente, más que con látex fresco, es difícil establecer el significado de las diferentes variantes enzimáticas descritas. Ellas pueden estar presentes en una planta individual, representar enzimas de diferentes variedades de papaya o surgir artificialmente durante el procesamiento del látex (Khan & Polgár, 1983). La secuencia N-terminal de las 4 proteasas mayoritarias fue comparada y mostró gran homología, indicando una familia de genes íntimamente relacionados (Lynn & Yaguchi, 1979).

Con posterioridad fueron aisladas y purificadas a homogeneidad, a partir del látex de *Carica papaya*, otras tres tiolproteinasas: quimopapaína, papaya proteinasa IV y proteinasa III (Dekeyser *et al.*, 1994).

El látex de *Carica candamarcensis* resulta también similarmente rico en proteasas (Walreavens *et al.*, 1993; Jaziri, *et al.*, 1994). Del mismo se aislaron, purificaron y caracterizaron tres fracciones proteolíticamente activas: CC-I, CC-II y CC-III. La fracción menos básica y más activa, CC-I, fue posteriormente separada en dos componentes (CC-Ia y CC-Ib) los que presentan un 65,8% y un 66,5%, respectivamente, de residuos aminoacídicos en común con papaína (Walreavens *et al.*, 1999).

1.2.2.4.2. Peptidasas de *Moraceae*

Desde hace años es bien conocido que el látex de especies del género *Ficus* (*Moraceae*) presenta notoria actividad proteolítica. El nombre de ficina fue utilizado por Robbins a partir de 1930 para denominar al polvo blanco purificado obtenido a partir de algunos miembros del género. En 1992 la IUBMB recomendó utilizar el nombre de ficaina para referirse al componente proteolítico mayoritario del látex de *Ficus glabrata* (Barrett *et al.*, 1998).

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

A partir de *Ficus elastica* se logró aislar una proteasa denominada ficina E que, sorprendentemente, se caracteriza por ser una peptidasa serínica con una masa molecular de 50 kDa, pH óptimo de 6,0 y punto isoeléctrico ácido (Lynn & Clevette-Radford, 1985), en tanto que de *Ficus pumila* se aisló una proteasa cisteínica termoestable (ficaina p I) de 28,6 kDa de masa molecular, pH óptimo alcalino y pI superior a 9,3 (Perelló *et al.*, 2000).

Dentro de la misma familia se estudió el látex de *Maclura pomifera* (López *et al.*, 1993; López, 1995) del que también se logró aislar y caracterizar una peptidasa (glicoproteína) del tipo de las serínicas, de masa molecular 65 kDa, pH óptimo alcalino, que se inhibe completamente frente a diisopropilfluorofosfato y cuya especificidad respecto de sustratos sintéticos y de la cadena B de la insulina es similar a cucumisina, proteinasa de *Cucumis melo* (*Cucurbitaceae*). Estos datos juntamente con la secuencia N-terminal sugieren que esta proteasa pertenecería a la familia de las subtilisinas (Rudenskaya *et al.*, 1995).

1.2.2.4.3. Peptidasas de *Euphorbiaceae*

Si bien la familia *Euphorbiaceae* se caracteriza por producir látex con importante

actividad proteolítica, es de hacer notar que son escasos los estudios acerca del aislamiento y caracterización de las proteasas presentes. Dentro del género *Euphorbia*, las especies más estudiadas fueron: *E. lathyris*, *E. pulcherrima* y *E. cyparissias* de las que se obtuvieron: euforbaina l, euforbaina p y euforbainas y₁₋₃, respectivamente, todas ellas proteasas de tipo serínicas de elevado peso molecular (Lynn & Clevette-Radford, 1988). Más recientemente, a partir del látex de *Euphorbia supina* también se obtuvo una proteasa serínica con una masa molecular de 80 kDa, amplia especificidad de sustrato, pH óptimo 8,0 sobre caseína y una secuencia aminoacídica N-terminal muy similar a cucumisina, proteasa aislada de *Cucumis melo* (Arima *et al.*, 2000). Dentro del género *Hevea* la única especie estudiada es *Hevea brasiliensis*, de cuyo látex se aislaron tres proteasas serínicas: hevaína a, hevaína b y hevaína l (Lynn & Clevette-Radford, 1986).

1.2.2.4.4. Peptidasas de *Asteraceae*

A partir del látex de raíces de *Taraxacum officinale* (*Asteraceae*), en el año 1998 Rudenskaya *et al.* lograron aislar y caracterizar una proteinasa serínica a la que denominaron taraxalisina. La misma presenta un pH óptimo de 8,0 frente a un sustrato peptídico sintético específico para proteinasas serínicas, una masa molecular de 67 kDa y un pI de 4,5. En lo que respecta a especificidad de sustrato y secuencia N-terminal manifiesta características similares a cucumisina y maclurisina.

1.2.2.4.5. Peptidasas de *Apocynaceae*

En el látex de *Tabernamontana grandiflora* se detectó la presencia de una proteinasa cisteínica altamente activa, denominada tabernamontanaina (Jaffé, 1943).

Una proteasa cisteínica llamada ervatamina fue aislada y caracterizada a partir del látex de *Ervatamia coronaria*. La misma se caracteriza por ser altamente estable, presentar una masa molecular de 25 kDa, un pH óptimo de 7,5-8,0 y una temperatura de acción óptima de 50°C. La secuencia aminoacídica N-terminal mostró considerable similitud con papaína y bromelaína (Sundd *et al.*, 1998). Más recientemente, se aislaron, purificaron y cristalizaron dos tiol proteasas denominadas ervatamina B y ervatamina C (Chakrabarti *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2000).

1.2.2.4.6. Peptidasas de *Asclepiadaceae*

Si bien la familia *Asclepiadaceae* R. Br. está constituida por 250 géneros y casi 2.000 especies que se caracterizan por desarrollar laticíferos, solamente han sido estudiadas las proteasas contenidas en el látex de algunas especies pertenecientes a cuatro géneros: *Araujia*, *Asclepias*, *Calotropis* y *Morrenia*.

1.2.2.4.6.1. Peptidasas del Género *Araujia*

Una peptidasa cisteínica fue aislada y caracterizada a partir del látex de frutos de *Araujia hortorum* Fournier: araujiaina hI. La misma presenta una masa molecular de 25,5 kDa determinada por espectrometría de masas (EM), un pI mayor a 9,3 y al igual que calotropina I y II obtenidas de *Calotropis procera* presenta el residuo N-terminal bloqueado. En consecuencia, se le determinó la secuencia de un péptido interno obtenido por tratamiento con proteasa V8 revelando una elevada homología con otras proteasas cisteínicas de origen vegetal (Priolo *et al.*, 2000).

Más recientemente se purificaron dos nuevas proteasas: araujiaina hII y araujiaina hIII, con masas moleculares de 23,7 y 23,5 kDa, respectivamente. El pI de araujiaina hII es de 8,9 en tanto que el de araujiaina hIII es superior a 9,3. La secuencia N-terminal de ambas mostró un elevado grado de homología con papaína (Obregón *et al.*, 2001).

1.2.2.4.6.2. Peptidasas del Género *Asclepias*

La presencia de enzimas proteolíticas en el látex de *Asclepiadaceae* fue reportada por primera vez en *Asclepias speciosa* por Winnick *et al.* (1940) quienes lograron aislar una proteinasa sulfhidrónica a la que denominaron asclepaína (EC 3.4.22.7). A partir del látex de *Asclepias mexicana*, Greenberg & Winnick (1940) aislaron asclepaína m, una enzima de iguales características, con máxima actividad a pH 6,5-8,5 frente a hemoglobina desnaturalizada y a pH 7,0-7,5 con ovoalbúmina como sustrato.

El nombre de asclepaína fue también utilizado para describir las proteasas aisladas de *Asclepias syriaca* (Brockbank & Lynn, 1979). La enzima de *Asclepias glaucescens* fue

denominada asclepaína g para distinguirla de las otras asclepaínas relacionadas (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991).

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

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

Luego Barragán *et al.* (1985) y Tablero *et al.* (1991) han estudiado las distintas formas moleculares de proteasas presentes en el látex de *Asclepias glaucescens*, que no difieren significativamente de las presentes en las anteriores especies; si bien el pI varía de 3,6 a 9,2, las proteasas más abundantes, cuyo pI es superior a 9,0 tiene un peso molecular de 23 kDa y su estructura secundaria es muy similar a la de papaína.

1.2.2.4.6.3. Peptidasas del Género *Calotropis*

Del látex de *Calotropis gigantea* se aislaron inicialmente dos cisteinilproteasas a las

que Abraham & Joshi (1979a, 1979b) denominaron calotropaina-FI y calotropaina-FII; son glicoproteínas de peso molecular (23-27 kDa), que muestran dos valores óptimos de pH sobre hemoglobina (4,3 y 8,1) y composición aminoacídica similar.

Un estudio posterior llevado a cabo por Pal & Sinha (1980) reveló la existencia de dos proteinasas adicionales, calotropina DI y DII, que pudieron cristalizarse y que poseen un único máximo de actividad frente a azoalbúmina (pH 7,5-8,0); su peso molecular está dentro del mismo rango (24 kDa), pero su composición aminoacídica difiere cuantitativamente de las anteriores.

Por otra parte, se encontró que tanto calotropina DI como calotropina DII presentan el residuo N-terminal bloqueado (Sengupta *et al.*, 1984).

1.2.2.4.6.4. Peptidasas del Género *Morrenia*

Los únicas referencias sobre este género corresponden a los estudios relacionados con el presente trabajo de tesis doctoral. Del látex de frutos de *Morrenia brachystephana* Griseb. se reportó la purificación y caracterización de una proteasa sulfhidrúlica de Mr 22,1 kDa y pl mayor que 9,3 (Arribére *et al.*, 1996). A partir de látex de parte vegetativa aérea de *Morrenia brachystephana* Griseb. (Arribére *et al.*, 1998, Vairo Cavalli, *et al.*, 2001) y de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (Arribére *et al.*, 1999, Vairo Cavalli, *et al.*, 2001) también se lograron aislar proteasas cisteínicas.

1.2.3. Importancia económica de las enzimas proteolíticas: usos y aplicaciones

Las enzimas proteolíticas, al igual que la mayoría de los productos naturales, han sido utilizadas durante mucho tiempo en forma empírica, especialmente en materia de alimentación y salud. Un buen ejemplo lo constituye el empleo del jugo de mamón (*Carica papaya*) con el que los habitantes de muchas regiones de Centro y Sudamérica hacen más tiernas las carnes que consumen. Las proteasas contenidas en dicho jugo provocan la hidrólisis parcial de las proteínas del tejido conectivo (colágeno y elastina) y en menor grado las de las mismas fibras musculares (López, 1995). Del mismo modo, el látex de algunas especies del género *Ficus* era tradicionalmente utilizado en el tratamiento de ciertas

parasitosis intestinales (Caffini *et al.*, 1989, López *et al.*, 1994; de Amorín *et al.*, 1999). Ya en 1930 Robbins estableció la relación de causalidad entre el efecto antihelmíntico observado y la presencia de actividad proteolítica en el látex de *Ficus laurifolia*.

Con el tiempo las aplicaciones de las enzimas proteolíticas fueron incrementándose y hoy son múltiples los procesos industriales en que se utilizan, por ejemplo, en la tiernización de carnes, en la elaboración de cerveza, en la producción de quesos, en la industria de la panificación, en la obtención de proteínas modificadas para su uso en alimentación humana y animal, en la manufactura de cueros y polvos detergentes, así como en el procesado de fibras textiles y tratamiento de efluentes industriales, además de su utilización en la industria farmacéutica (López, 1995).

También estas enzimas hoy son utilizadas en química bioorgánica en medios no convencionales para la síntesis de pequeños péptidos bioactivos o de péptidos empleados en nutrición (Klibanov, 1986). Este último aspecto ha llamado la atención en los últimos años, dado que tradicionalmente la catálisis enzimática fue concebida como un proceso viable sólo en fase acuosa. Sin embargo, recientes investigaciones han descartado esta idea, demostrándose concluyentemente que las enzimas pueden ser activas en solventes orgánicos. El interés por desarrollar procesos enzimáticos en fase orgánica ha crecido notablemente en las últimas décadas, por cuanto representan una interesante alternativa a procesos de síntesis química convencionales. La biocatálisis en fase orgánica no sólo permite la expresión de la funcionalidad de las enzimas sino que exhibe ventajas relevantes respecto de la biocatálisis en fase acuosa, tales como cambios en el equilibrio de la reacción, como consecuencia de la alteración del coeficiente de partición de sustratos y productos entre las fases de interés, pudiendo favorecer la reacción de síntesis y evitar la hidrólisis de péptidos, ésteres, amidas, etc., facilidad de recuperación de los productos y del biocatalizador, aumento de la termoestabilidad del biocatalizador y aumento de la estereoespecificidad en la resolución de mezclas racémicas (Cesti *et al.*, 1986).

Actualmente, en términos económicos, las enzimas proteolíticas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial. La mayor parte de estas enzimas provienen de fuentes microbianas, pero varias proteínas vegetales tales como papaína, bromelina y ficina siguen siendo preferidas en un gran número de procesos (Mantell *et al.*, 1985; Uhlig, 1998).

Objetivos

Son numerosos los estudios etnobotánicos que hacen referencia al uso de especies pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae* R.Br. en medicina popular. El látex de estas especies es empleado en el Norte y Centro de Argentina con aplicaciones que hacen presumir la presencia de proteasas en el mismo.

En base a estos conocimientos previos se ha planteado una estrategia experimental destinada a conocer los caracteres morfoanatómicos, la ontogenia de las estructuras secretoras de látex, la localización *in situ* de las enzimas proteolíticas que pudieran contener y finalmente lograr el aislamiento, purificación y caracterización de las mismas.

En función de lo expuesto se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- realizar estudios anatómicos generales en las especies del género *Morrenia* que crecen en la Provincia de Santa Fe: *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.
- efectuar estudios ontogenéticos y ultraestructurales de laticíferos.
- localizar y detectar mediante técnicas histoquímicas las fitoproteasas presentes en el látex de las partes vegetativas aéreas de las especies estudiadas.
- aislar, purificar y caracterizar las preparaciones enzimáticas obtenidas.

Alcances

- brindar un aporte al conocimiento de la flora autóctona argentina.
- ofrecer la información básica necesaria sobre las peptidasas aisladas, a fin de evaluar la posibilidad de que puedan ser eventualmente aprovechadas en la industria farmacéutica y/o alimentaria, en reemplazo de aquellas empleadas en la actualidad y que son objeto de importación.

Materiales
y
Métodos

4.1. Material Vegetal

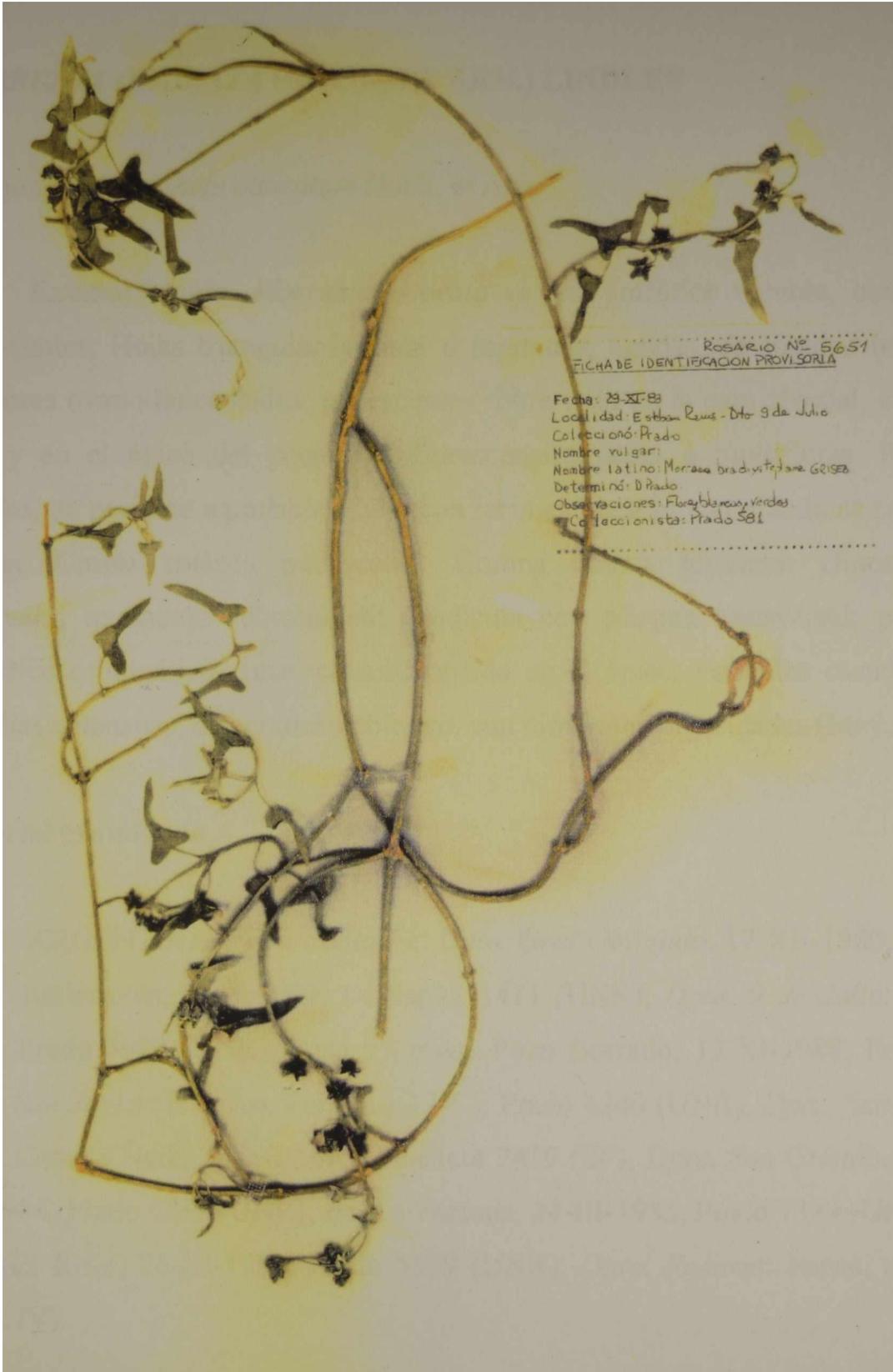
4.1.1. Descripción exomorfológica de las especies estudiadas

MORRENIA BRACHYSTEPHANA GRISEB.

Exomorfoloía. *Morrenia brachystephana*. Voluble, con ramas de 3-4 m. Hojas ovado-oblongas o subtriangulares, hastadas, truncadas o brevemente cordadas, pubescentes. Inflorescencias umbeliformes, paucifloras. Flores pediceladas, pequeñas, blanco-verdosas. Cáliz de lacinias lanceoladas, finamente pubescentes en ambas caras. Corola subrotácea. Corona blanca tubulosa-campanulada. Ginostegio sésil. Anteras con membrana apical suborbicular; retináculo subovoide; caudículas subhorizontal, arqueada; polinios anchos. Apéndice estigmático cortísimo, formado por dos botoncitos subcónicos. Folículos ovoides de superficie rugoso-verrugosa, con aspecto cerebroide. Semillas subovoides, verrugosas con espermopapo (Meyer *et al.*, 1979).

Material examinado

ARGENTINA. *Prov. Santa Fe: Dpto. Gral. Obligado: Río Nah Tulipague, 10-I-1937, Ragonese (s/n) (SF); Tacuarembó, 10-XI-1983, Pire 5045 (UNR); Dpto. 9 de Julio: Eleodoro Ramos, 29-XI-1983, Prado 5651 (UNR); Dpto. San Cristóbal: Estancia "La Fortuna", 27-XII-1983, D'Angelo 700 (SF); Dpto. San Martín: canaleta central San Antonio, 21-III-1985, Vegetti 335 (SF), Sastre, 22-III-1985, Vegetti 351 (SF); Dpto. Iriondo: Ea. Los Aromos Correa, 28-I-1983, Lewis 4360 (UNR); Dpto. Rosario: Rosario, 26-IX-1986, Franceschi 8152 (UNR); Funes, 23-II-1997, Cortadi 1271 (UNR) y material en cultivo (Lám. III).*



***Morrenia brachystephana* Griseb.**

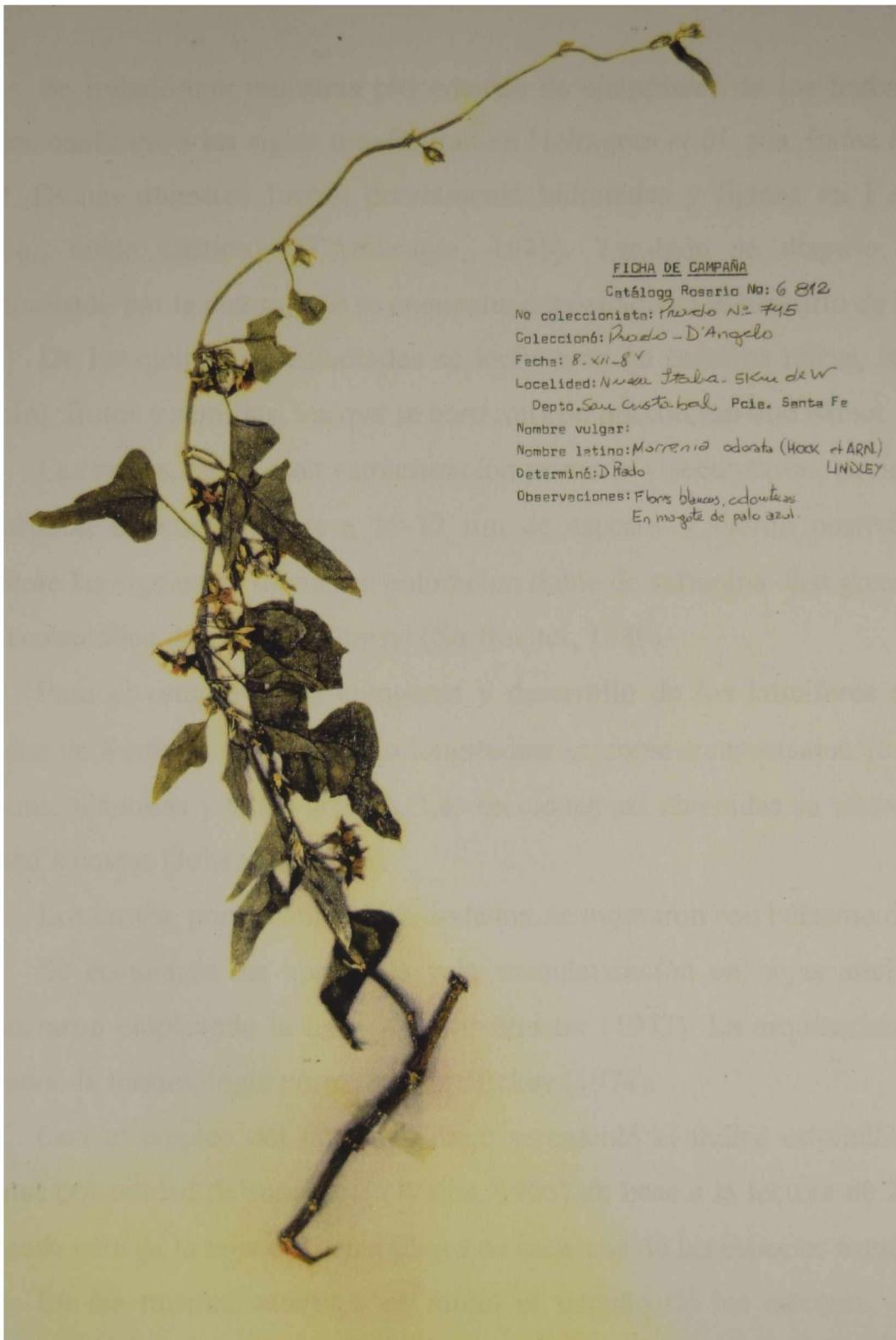
MORRENIA ODORATA (HOOK. ET ARN.) LINDLEY

Sinónimo: *Cynanchum odoratum* Hook. et Arn.

Exomorfología. *Morrenia odorata* es una sufrútice voluble, con ramas finamente pubescentes. Hojas triangular-hastada o sagitadas, agudas, de lóbulos basales obtusos, las inferiores ovado-lanceoladas, pubescentes sobre todo en la cara abaxial, con glándulas en la base y en el ápice del pecíolo. Inflorescencias pauci o multifloras. Flores pediceladas, grandes, de perfume agradable. Cáliz con lacinias lineares con glándulas en la base de la cara interna. Corola rotácea pubescente. Corona blanca tubulosa. Ginostegio brevemente estipitado; retináculo subrómico; caudícula con pliegue transversal; polinios elipsoides. Apéndice estigmático corto, cónico, partido en el ápice. Folículos ovoides, grandes, lisos. Semillas aplanadas, de contorno oblongo, con diminutas rugosidades (Meyer *et al.*, 1979).

Material examinado

ARGENTINA. *Prov. Santa Fe: Dpto. Gral Obligado: 17-XII-1980, Pire 2947 (UNR); Villa Guillermina, 17-X-1997, Di Sapio, 1411 (UNR); Dpto. 9 de Julio: Logroño, 14-XII-1982, Prado 3989 (UNR); Ruta 95 cruce Pozo Borrado, 15-XI-1988, Pensiero 3429 (SF); Dpto. San Javier: R11 Ao. Toba, 14-12-82, Prado 4240 (UNR); Dpto. San Justo: 5 Km al O. Ñare- Cañada Ñare, 28-XII-1985, Pensiero 2419 (SF); Dpto. San Cristóbal: Nueva Italia, 8-XII-1984, Prado 6812 (UNR); Ea. La Fortuna, 24-III-1985, Prado 7329 (UNR); R 38 (20 Km. al O. El Rifle) 26-XI-1983, Prado 5599 (UNR); Dpto. Rosario: Funes, material en cultivo (Lám. IV).*



***Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley**

4.1.2. Estudios anatómicos

Se trabajó con muestras procedentes de ejemplares de los herbarios de SF y UNR, citados conforme a las siglas que figuran en Holmgren *et al.* eds. *Index Herbariorum*, 8ª ed., 1990. Dichas muestras fueron previamente hidratadas y fijadas en F.A.A. (formaldehído, alcohol, ácido acético) (D'Ambrogio, 1986). También se dispuso de material fresco coleccionado por la autora, que se encuentra depositado en el herbario de la UNR.

De los ejemplares estudiados se incluyeron en parafina raíces, tallos, hojas (limbo y pecíolo), frutos y semillas, los que se cortaron con micrótopo tipo Minot.

Las raíces, tallos -con estructuración primaria y secundaria-, pecíolos, limbos y frutos se cortaron transversalmente a 10-12 μm de espesor y fueron posteriormente coloreados mediante las siguientes tinciones: coloración doble de safranina-fast green (Strittmater, 1979) y metacromática de violeta de cresyl (Strittmater, 1980).

Para el estudio de la ontogenia y desarrollo de los laticíferos se emplearon cortes seriados de 8 μm de espesor, tanto longitudinales como transversales de semillas inmaduras, maduras, plántulas y tallos adultos. Las secciones así obtenidas se tiñeron con hematoxilina Harried's eosina (Johansen, 1940).

Los cortes, previamente deshidratados, se montaron con bálsamo de Canadá.

Se estudiaron las epidermis y la vascularización en hojas adultas, para lo cual se diafanizaron empleando la técnica de Strittmater (1973). La arquitectura foliar se describió siguiendo la terminología propuesta por Hickey (1974).

Con el empleo del tubo de dibujo se calculó el índice estomático y la densidad de estomas por unidad de superficie (Wallis, 1965) en base a la lectura de 20 campos efectuada para cada cara de la hoja en 5 ejemplares de cada una de las especies estudiadas.

En las mismas muestras se midió el tamaño de los estomas, en el presente caso representado por la longitud de las células oclusivas (Willmer, 1986), y se estableció el índice de empalizada según el método propuesto por Wallis (1968).

La densidad del indumento se determinó en 20 campos de 0,01 mm^2 . Los resultados se expresan en términos de media \pm 1 desvío estándar.

Los tallos fueron disociados empleando la técnica de Boodle (1916). El material obtenido fue coloreado con safranina diluida y montado con gelatina-glicerina.

Se midió la longitud y el diámetro medio de los elementos celulares del xilema correspondientes a 5 individuos de cada especie estudiada y posteriormente se calcularon los valores promedio y los máximos y mínimos absolutos para cada especie.

Las mediciones se realizaron con microscopio óptico provisto de un ocular calibrado.

Los dibujos son originales y fueron realizados por la autora utilizando tubo de dibujo Optiphot en combinación con un microscopio Nikon Alphaphot. Las representaciones esquemáticas se realizaron según signos convencionales de Metcalfe & Chalk (1950). Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axiolab equipado con equipo fotográfico MC 80 con película Kodak Gold 100-6.

Los preparados definitivos obtenidos se hallan en la histoteca de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R.

4.1.2.1. Observación de epidermis con MEB

Para la observación con MEB de las epidermis adaxial y abaxial de la hoja se seleccionó una porción del tercio medio de la lámina que comprendiera el nervio medio.

El material fresco se fijó durante 2 horas en una solución de glutaraldehído al 4 % en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7,2 (Boyde *et al.*, 1977; O'Braien, 1981; D'Ambrogio, 1986).

A continuación se emplearon dos métodos de secado:

Para la observación y determinación de tipos de ceras epicuticulares se procedió a secar la muestra al aire; para ello se lava el material ya fijado con agua destilada y se procede a deshidratar con una serie de alcoholes de graduación ascendente hasta alcohol absoluto, sin emplear acetona. En este momento se adhiere la muestra con una cinta doble faz al portamuestras metálico y se coloca en un desecador con sílica gel durante toda la noche como mínimo.

Para la observación de los distintos tipos de pelos se procedió a secar la muestra según el método de punto crítico a los fines de evitar alteraciones que se producen en los tejidos debido a la fuerza desarrollada por la tensión superficial del líquido que se evapora.

El material fijado se lava con agua destilada y se deshidrata por pasaje a través de una serie de soluciones acuosas de acetona de graduación ascendente. Luego se

coloca el material en cápsulas BEEN y éstas se ubican en un recipiente metálico de cierre hermético que contiene acetona, la que es paulatinamente reemplazada por dióxido de carbono líquido. Esta operación se realiza a 10°C y 50 atmósferas de presión. A continuación se eleva lentamente la temperatura hasta alcanzar los 31°C y la presión se aumenta de 50 a 75 atmósferas; en este momento el CO₂ líquido pasa al estado gaseoso y la muestra se encuentra seca. En estas condiciones se pega la muestra con grafito coloidal o con cinta doble faz al portamuestras metálico (Cohen, 1977, 1979).

Las muestras secadas al aire o por el método del punto crítico se han de metalizar. Para ello primeramente se hace evaporar carbono en alto vacío (el carbono se aloja en lugares de la muestra donde el metal no puede penetrar), luego se realiza un baño metálico de oro empleando un evaporador marca Veeco que opera a 1500 Voltios y 70 mmHg en atmósfera de argón durante un tiempo de 10 minutos; la película metálica tendrá aproximadamente 20 nm de espesor (Mercer *et al.*, 1972; O'Braien *et al.*, 1981).

Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de barrido marca Jeol modelo 35-C. El instrumento operó con una tensión de aceleración de 15 Kv y se utilizó un sistema de detección de electrones secundarios (Ipohorski *et al.*, 1981) perteneciente al Centro Regional de Investigación y Desarrollo de Santa Fe (CONICET) y un microscopio Jeol JSM 35 CF del Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca (CONICET).

4.1.2.2. Observación de cristales de oxalato de calcio

Los cristales de oxalato de calcio se pusieron en evidencia con luz polarizada empleando un microscopio Zeiss Axiolab y el catión calcio se detectó por difracción con rayos X, SEM-EDAX (Ipohorski *et al.*, 1981).

Los datos cualitativos referidos a la determinación del catión que forma parte de los cristales presentes en los distintos parénquimas de las especies estudiadas se realizó en base a la espectroscopía dispersiva de energía EDAX.

El material en estudio se fijó en formol, ácido acético y alcohol de 96° (FAA). Luego se realizaron a mano alzada cortes longitudinales de pecíolo y cortes transversales de hoja.

Los cortes se deshidrataron en alcoholes de graduación ascendente, pasándolos por último a acetona, posteriormente se adhirieron por medio de una cinta doble faz al portamuestras metálico del microscopio de barrido y se colocaron en un desecador con sílica gel toda la noche. Una vez secas las muestras se procedió a metalizarlas de la misma manera que en el caso anterior.

El microscopio electrónico de barrido marca Jeol 35-C está equipado con un detector de rayos X dispersivo de Silicio/Litio que está acoplado a un analizador y computador EDAX.

La técnica de análisis de rayos X con microsonda de electrones (EPXMA) permite detectar aquellos elementos cuyo número atómico esté comprendido entre 11 (sodio) y 92 (uranio) (Ipohorski *et al.*, 1985; Van Steveninck *et al.*, 1991).

4.1.2.3. Observación de laticíferos con MET

Para la observación de los laticíferos por MET es necesario trabajar con material vivo cuidadosamente procesado (Hall & Hawes, 1991). El material en estudio debe ser fijado lo más rápido posible. En caso que sea necesario trasladar el material, el mismo se coloca en cámaras húmedas con aire, teniendo la precaución de sellar el extremo del corte originado en el momento de la recolección, con el objeto de evitar la pérdida de la presión del laticífero y el depósito de artificios post-mortem (Roland *et al.*, 1991). El material a fijar se corta bajo la lupa inmerso en el reactivo fijador, las piezas se someten a una primera fijación, para ello se emplea glutaraldehído al 4% en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7,4 durante una hora a temperatura ambiente. Luego se lava durante 20 minutos en solución de sacarosa al 10% en buffer fosfatos 0,1 M. A continuación se realiza una post-fijación empleando una solución de OsO₄ al 1,5 % en buffer fosfatos 0,1M pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava con agua destilada y se continúa con una deshidratación en acetona de concentración ascendente y finalmente el material se incluye en resinas Spurr (Union Carbide International Co.). Los tacos se tallan en forma de pirámide truncada con una superficie de corte de 100 µm. de largo, que incluye el material a cortar. Se obtienen secciones finas y ultrafinas, éstas últimas de 60 nm de grosor, con un ultramicrotomo provisto con cuchilla de diamante. Los cortes finos se colorean con violeta de cresyl (Strittmater 1980). Las secciones ultrafinas se colocan sobre la cara opaca de grillas de cobre de 200 mesh. A continuación se realiza una

“doble” coloración, empleando en primer término una solución acuosa de acetato de uranilo al 2,5% durante 20 minutos, seguida por la coloración con la solución de Reynolds o solución de citrato de plomo, durante 4-5 minutos; en este paso se debe evitar la contaminación con CO₂ atmosférico y a continuación se lava con agua destilada (Mercer *et al.*, 1972; O’Braien *et al.*, 1981; D’Ambrogio, 1986; Roland *et al.*, 1991). Se escurren, se secan las grillas y se procede a la observación, usando en este caso un MET marca Philips EM 201 de la facultad de Bioingeniería de Universidad Nacional de Entre Ríos y un MET Jeol – JSM - 100C X II del Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca (CONICET).

4.2. Detección y localización *in situ* de enzimas proteolíticas

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

Otro procedimiento sugerido para la localización de actividad proteolítica se basa en la incubación de secciones fijadas, cortadas por congelación, sobre un film fotográfico color procesado no expuesto, donde las capas de gelatina coloreadas son progresiva y secuencialmente digeridas por las proteasas presentes en la sección de tejido. Después de terminada la reacción, la preparación es montada sobre un portaobjetos y observada con microscopio óptico (Adams & Tuquan, 1961).

4.2.1. Método del film-sustrato de Denker

Denker (1974) desarrolló un procedimiento que emplea como sustrato gelatina sin teñir, debido a que los colorantes usados en estos procedimientos podrían actuar como potenciales inhibidores de las enzimas proteolíticas.

Para realizar la determinación de proteasas en cortes longitudinales de tallo se procedió del siguiente modo:

- Se cubrió un portaobjetos con una solución de gelatina al 5% llevada a 50°C. La misma se dejó solidificar a temperatura ambiente y se guardó en cámara húmeda a 4°C durante una noche.
- Se trató durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla de alcohol 50° y formol al 40%, se lavó con agua destilada durante 20 minutos y se secó al aire.
- Se hidrató el gel con NH₄OH al 7% a temperatura ambiente y se secó con aire.
- Se ubicó la sección realizada con criostato Microm Zeiss HM 500 a -20°C sobre la capa de gelatina y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 4 horas como mínimo. Se detuvo la reacción por inmersión del portaobjetos en una solución de formaldehído al 4%.
- Se enjuagó con agua desionizada durante 25 min.
- Se tiñó con azul de toluidina al 0,5% en buffer borato pH 10,0 a 4°C durante 30 minutos, se enjuagó, deshidrató y clarificó. Luego se montó en medio sintético (canadax, Biopur) y se observó con microscopio óptico.
- Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axyolab provisto de un equipo fotográfico MC 80 con película Kodak Gold 100-6.

4.2.2. Método del film-sustrato de Fratello

Es un método en el cual las secciones de tejido se disponen sobre una película color procesada, no expuesta, que presenta tres capas de gelatina superpuestas, coloreadas, que impregnan una matriz de nitrocelulosa. La capa más externa es amarilla y de un espesor aproximado de 5,5 µm, la central es magenta de 4,5 µm y la más interna es azul y tiene alrededor de 6 µm de espesor.

Cuando la sección de tejido es colocada sobre la emulsión del film, las capas coloreadas son progresiva y secuencialmente digeridas.

Este método es muy sensible porque las capas de gelatina son más finas que en un film monocromático; de esta manera, puede hacerse una apreciación preliminar de la intensidad de la actividad proteolítica en los distintos tejidos, lográndose una semicuantificación de la actividad enzimática (Fratello, 1968).

Para demostrar la presencia de proteasas por este método se hicieron secciones transversales de tallo de 10 µm de grosor con un criostato Microm Zeiss HM 500 a -20°C y se

procedió de la siguiente manera:

- Se humedeció la película color de diapositivas (Kodak 5045 EB 100) con buffer fosfatos 0,1 M pH 6,5 con EDTA y cisteína 5mM hasta que la gelatina se hidrató.
- Se colocaron las secciones de corte directamente sobre la cara procesada no expuesta del film.
- Se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 20 minutos.
- El film se dejó secar y se montó sobre un portaobjeto.
- Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axyolab provisto de un equipo fotográfico MC 80 con película Kodak Gold 100-6.

4.3. Obtención de extractos crudos conteniendo proteasas

Mediante incisiones transversales de tallos y pecíolos se provoca la exudación de un látex semifluido, de color blanco, que se recoge inmediatamente sobre buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo EDTA y cisteína, ambos en concentración 5 mM. La adición de EDTA al medio es necesaria a fin de impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968). Por su parte la cisteína permite mantener el medio reductor. Con el objeto de minimizar procesos de autodigestión y a los efectos de evitar la desnaturalización proteica, la temperatura se mantuvo a 4°C, mediante baño de hielo-agua, durante el proceso de obtención de las muestras.

La dispersión resultante (9% de látex v/v) se diluyó 1:5 en el mismo buffer de recolección y posteriormente se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga refrigerada Hermle Z 323 K, rotor 22078 V02. Esta etapa tiene como finalidad eliminar restos vegetales y otros materiales insolubles como gomas, que generalmente forman parte del látex. El sobrenadante, conteniendo las proteínas solubles, se denomina “extracto crudo” y se conserva congelado (-20°C) o bien liofilizado hasta el momento de ser procesado.

4.4. Detección de proteasas *in vitro*: ensayos de actividad caseinolítica

La actividad proteolítica se ensayó sobre caseína tipo Hammarsten (Research

Organics, Cleveland, OH, USA) como sustrato proteolítico. La preparación se realizó suspendiendo 1 g de caseína en 100 ml de solución buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) y calentando en un baño de agua a ebullición durante 20 minutos. La solución resultante se filtró en caliente por papel Whatman 3 MM, se llevó a volumen y se utilizó recién preparada. La mezcla de reacción consistió en 1,1 ml de solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 12 mM y 0,1 ml de solución de la preparación enzimática a ensayar. La reacción se llevó a cabo a 37°C y luego de 2 minutos se detuvo por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5%. Con posterioridad, cada tubo de ensayo se sometió a centrifugación a $3.000 \times g$ durante 20 minutos, midiéndose luego la absorbancia a 280 nm de los productos de hidrólisis en los sobrenadantes. En forma paralela se realizaron ensayos en blanco, agregando el ácido tricloroacético en primer término.

Para expresar los resultados se definió una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica, U_{cas}), que corresponde a la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al término de un minuto, en las condiciones de ensayo. Este es el criterio para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos (Sarath *et al.*, 1989). La actividad específica indica el número de U_{cas} por miligramo de proteínas totales.

4.5. Purificación preliminar mediante precipitación acetónica fraccionada

A efectos de eliminar impurezas solubles como carbohidratos y flavonoides y de concentrar los extractos crudos en proteínas, se realizó una purificación preliminar mediante el agregado sucesivo de diferentes volúmenes de acetona fría. La eliminación de flavonoides es de fundamental importancia para evitar que los mismos, en su forma oxidada, se unan irreversiblemente a las proteínas, inactivándolas (Loomis & Battaile, 1966).

Con tal fin, se partió de un volumen de extracto crudo al que se le adicionó un volumen de acetona fría (-20°C) gota a gota, con agitación suave y manteniendo la temperatura de la mezcla a 4°C en cámara fría, a efectos de reducir al mínimo procesos de autodigestión y desnaturalización. Luego de permitir la decantación del precipitado formado, durante 30 minutos a -20°C, se centrifugó a $11.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C. De este modo se obtuvo un primer precipitado (P_1) y un sobrenadante (S_1). Al

sobrenadante S_I se le adicionó un nuevo volumen de acetona de la manera anteriormente descrita, con lo que se produjo un nuevo precipitado (P_{II}) y otro sobrenadante (S_{II}), el que se trató con otro volumen de acetona en las mismas condiciones a fin de obtener, eventualmente, un tercer precipitado (P_{III}).

Los precipitados acetónicos así obtenidos (P_I , P_{II} , P_{III}) se sometieron a vacío hasta eliminar vestigios de acetona. Posteriormente cada uno de ellos se redisolvió en buffer cítrico fosfato 55mM (pH 6,4) y se les determinó el contenido proteico y de hidratos de carbono, así como la actividad caseinolítica. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas más aconsejables para proseguir con su caracterización y posterior purificación.

4.6. Purificación cromatográfica

4.6.1. Cromatografía de intercambio iónico

Las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas por precipitación acetónica fraccionada, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico a fin de lograr separar las proteínas activas presentes en las mismas.

Los precipitados acetónicos seleccionados por su mayor actividad específica se redisolvieron en buffer cítrico-fosfato de sodio 55 mM (pH 6,4) y se sembraron (10 ml de una solución conteniendo $52,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteínas totales) en una columna Pharmacia K15/30 (1,5 cm \times 30 cm) rellena con el intercambiador catiónico CM-Sepharose CL-6B Fast Flow (Pharmacia). Luego se lavó la columna con 60 ml de buffer de partida cítrico-fosfato. A continuación se inició la elución de las proteínas retenidas con un gradiente salino variable según la muestra cromatografiada, preparado en el buffer de partida.

La velocidad de flujo en todos los casos fue de $15 \text{ cm}^3\cdot\text{h}^{-1}$ y se recolectaron fracciones de 1,5 ml. Todos los procesos cromatográficos se desarrollaron en una cámara fría a 4°C .

Para seguir el perfil de elución se midió la absorbancia a 280 nm y la actividad caseinolítica fue determinada luego de 6 minutos de incubación a 45°C .

Cuando se obtiene una fracción no homogénea se hace necesario recromatografiar la misma modificando el gradiente salino y manteniendo las demás condiciones experimentales

constantes, lográndose así una mejor resolución.

4.6.2. Cromatografía de exclusión molecular

Cuando la cromatografía de intercambio iónico no permitió una completa resolución de las fracciones proteicas presentes en las preparaciones enzimáticas crudas, se recurrió a una posterior etapa cromatográfica de exclusión molecular. A tales efectos, el contenido de los tubos correspondiente a la fracción proteolíticamente activa a ser recromatografiada se reunió y precipitó con 3 volúmenes de acetona. El precipitado rediseuelto en buffer cítrico-fosfato 55 mM (pH 6,4) se sembró en una columna Pharmacia K15/30 (1,5 cm × 30 cm) rellena con Sephadex G-75 (Pharmacia) previamente hidratado en el mismo buffer durante 3 horas a baño de María. Para verificar el correcto empaque del gel se hizo pasar un volumen igual al 2% del volumen de la columna de una solución del colorante Blue-dextran al 0,2%. La elución se llevó a cabo con el mismo buffer (cítrico-fosfato 55 mM, pH 6,4) a una velocidad de flujo de 15 cm³.h⁻¹. Se recogieron fracciones de 1,8 ml a las que se les ensayó la actividad caseinolítica incubando 6 minutos a 45°C.

4.7. Efecto activador de cisteína sobre la actividad caseinolítica

Se midió el efecto de la cisteína, agente reductor tiólico, como activador de la actividad enzimática. Para ello, las preparaciones enzimáticas se incubaron durante 15 minutos en presencia de cisteína 12mM y el ensayo de actividad caseinolítica fue posteriormente realizado de la manera anteriormente descrita.

4.8. Acción de inhibidores sobre la actividad caseinolítica

A fin de comprobar si las proteasas en estudio pertenecen realmente al grupo de las proteasas cisteínicas, como lo son las demás proteasas de *Asclepiadaceae* hasta ahora estudiadas, de acuerdo a los tipos mecanísticos propuestos por Barrett & Rawlings (1998), las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con los siguientes inhibidores: E-64 (10 μM), Cl₂Hg (0,1mM), iodoacetato de sodio (0,1mM) y fluoruro de

fenilmetilsulfonilo (PMSF, 10 mM). El PMSF inhibe tanto a proteinasas cisteínicas como serínicas, pero en el primer caso la inhibición se revierte por el agregado de tioles reductores (Salvesen & Nagase, 1989), por lo que las muestras fueron preincubadas con PMSF durante 15 minutos a 37°C y luego se determinó la actividad con y sin tratamiento previo con cisteína 12 mM.

Además se probó la acción del SDS (dodecilsulfato de sodio) al 2% p/v sobre la caseinólisis. Finalizada la incubación, en todos los casos se determinó la actividad caseinolítica remanente.

4.9. Contenido proteico

La determinación del contenido de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Bradford (1976). Su fundamento se sustenta en la formación de un complejo por unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a la proteína, hecho que produce un corrimiento del máximo de absorbancia desde 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). Este método es aconsejable para cuantificar proteínas en extractos vegetales que suelen contener sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el método de Lowry comúnmente utilizado (Peterson, 1979).

Las curvas patrones se realizaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 100-1000 µg/ml para el macrométodo y en el de 10-100 µg/ml para el micrométodo.

En los perfiles cromatográficos la estimación de proteínas se realizó directamente por medida de la absorbancia a 280 nm.

4.10. Cantidad de hidratos de carbono

Se estimó conveniente utilizar como marcador del grado de purificación alcanzado la cantidad de hidratos de carbono solubles. El contenido de los mismos se evaluó por el método de Dubois *et al.* (1956), basado en la formación de un compuesto coloreado con máxima absorbancia a 490 nm por reacción del fenol con los glúcidos (azúcares y sus metil derivados,

oligosacáridos y polisacáridos solubles), en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Para obtener la concentración de hidratos de carbono se realizó previamente una curva de calibración utilizando glucosa (Mallinckrodt) en el rango de 10-100 µg/ml.

4.11. Variación de la actividad proteolítica con el pH

Para obtener el perfil de pH, tanto de los extractos crudos como de las fracciones purificadas, se utilizó caseína en las condiciones antes indicadas, preparada en soluciones 25 mM de los siguientes buffers: MES [ácido 2-(N-morfolino)-etan-sulfónico], MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propan-sulfónico], TAPS [ácido N-tris-(hidroximetil)-metil-3-aminopropan-sulfónico], AMPSO {ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropan-sulfónico} y CAPS [ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propan-sulfónico] (Good & Izawa, 1972) en un rango de pH 6,0 a 11,0 con intervalos de 0,5 unidades. Estas soluciones buffers permiten mantener la fuerza iónica constante. No se utilizaron valores de pH inferiores a 6,0 debido a la muy escasa solubilidad de la caseína en esas condiciones.

4.12. Estabilidad térmica

Con el objeto de conocer el comportamiento de las enzimas luego de ser sometidas a distintas temperaturas durante tiempos variables, las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos a 40°C, 50°C, 60°C y 70°C, a pH 8,5. Finalizado el período de incubación, las muestras se mantuvieron en un baño de agua-hielo hasta el momento de ensayar la actividad caseinolítica residual de acuerdo a la técnica descrita en 4.4.

4.13. Variación de la actividad caseinolítica con la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad caseinolítica de las proteasas en estudio, se realizaron curvas de progreso de reacción a 37°C, 45°C, 60°C y 70°C a diferentes tiempos (5, 10, 20, 30 y 60 minutos).

4.14. Determinación de actividad endoesterásica sobre sustratos sintéticos

La medida de la actividad endoesterolítica fue llevada a cabo utilizando sustratos sintéticos: N- α -carbобензохи-*p*-nitrofenilésteres de L aminoácidos, según el método de Silverstein con algunas modificaciones (Silverstein, 1974). Estos sustratos sintéticos presentan bloqueados tanto el grupo α NH₂ como el α COOH del resto aminoacídico, estando este último asociado a un grupo cromóforo que permite la determinación de la actividad endoesterásica relativa respecto del aminoácido que aporta el grupo carboxilo. Los sustratos empleados fueron los N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los siguientes aminoácidos: Gln, Ala, Asp, Phe, Asn, Tyr, Trp, Gly, Leu, Val y Pro, todos provenientes de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los ensayos se realizaron a 40°C en buffer Tris-HCl (pH 8,0) conteniendo EDTA 2mM y cisteína 25 μ M en la mezcla de reacción. La absorbancia fue medida a 405 nm cada 10 segundos. El equipo utilizado para estas determinaciones fue un espectrofotómetro Beckman DU 640 termostatizado. Estas determinaciones se llevaron a cabo tanto con extractos crudos como con las fracciones purificadas. Una unidad enzimática arbitraria (Ucbz) fue definida como la cantidad de proteasa que libera 1,0 μ M de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo. Para determinar los micromoles de *p*-nitrofenol producidos durante la reacción, fue realizada una curva estándar (*p*-nitrofenol 15-70 μ M).

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

1°) Diluir la enzima con buffer cítrico-fosfato 55 mM, pH 6,4 conteniendo 1 mM de cisteína y conservar en baño de hielo. La concentración de cisteína (activador enzimático) a usar se seleccionó en base a ensayos preliminares con blanco de reactivos, de modo que no actúe como catalizador de la reacción de hidrólisis (Ascenzi *et al.*, 1983).

2°) Colocar en la cubeta en el siguiente orden:

Blanco	Muestra
<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl de buffer cítrico-fosfato 55mM pH 6,4; Cys 1mM • 2ml de buffer Tris-HCl 0,1M pH 8,0 preincubado a 37°C con EDTA 2mM • 50 µl de sustrato disuelto en acetonitrilo • Mezclar por inmersión, colocar la cubeta en el espectrofotómetro termostatzado a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl de enzima diluida • 2 ml de buffer Tris-HCl 0,1M pH 8,0 preincubado a 37°C con EDTA 2mM • 50 µl de sustrato disuelto en acetonitrilo • Mezclar por inmersión, colocar la cubeta en el espectrofotómetro termostatzado a 37°C

Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se analizaron mediante el programa Sigma Plot, usando regresión lineal para el cálculo de las velocidades iniciales.

4.14. 1. Determinación de los parámetros K_m y k_{cat}

Una vez conocidas las velocidades iniciales se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m ; para esto se usó el programa Sigma Plot y se asumió que la cinética sigue el mecanismo del estado estacionario propuesto por Haldane (Summer *et al.*, 1993).

4.15. Estabilidad enzimática en solventes orgánicos

A fin de conocer la estabilidad de las enzimas estudiadas en medio orgánico, se prepararon muestras por precipitación con 3 volúmenes de acetona, se redisolviéron en el buffer apropiado de pH óptimo y se pusieron en contacto con distintos sistemas no acuosos. Luego de intervalos de tiempo prefijados se extrajeron muestras a las que se les determinó la actividad caseinolítica residual.

4.15.1. Estabilidad enzimática en sistemas monofásicos

El sistema utilizado en este caso consistió en N,N-dimetilformamida al 30% en buffer Tris-HCl de pH 8,5. Se incubaron 2ml de cada una de las muestras con 0,86 ml del sistema no acuoso con agitación constante a 40°C y se extrajeron muestras a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos.

4.15.2. Estabilidad enzimática en sistemas bifásicos

Como solventes orgánicos se utilizaron cloroformo y n-heptano. En este caso la enzima disuelta en medio acuoso (Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0) forma con el cloroformo un sistema de dos fases (50:50 v/v), que se deja incubar a 40°C a distintos tiempos con agitación constante en un equipo diseñado especialmente para este tipo de reacciones (Caffini *et al.*, 1990).

4.16. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

A fin de corroborar la homogeneidad de las proteasas purificadas y de estimar sus masas moleculares, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en medio desnaturalizante (SDS) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970).

4.16.1. Preparación de las muestras

Las muestras a ser sometidas a SDS-PAGE se prepararon en tubos eppendorf mediante precipitación con cinco volúmenes de acetona, redisolviendo luego el precipitado en buffer de muestra sin β -mercaptoetanol conteniendo E 64 10 μ M a fin de evitar la autodigestión de las proteasas y llevando a ebullición (3 minutos). Luego se les adicionó β -mercaptoetanol y se calentó nuevamente durante 5 minutos; posteriormente las muestras fueron centrifugadas a $5.000 \times g$ durante 5 minutos en una centrífuga Hermle Z 323 K utilizando un rotor 22087 V01.

Buffer de muestra

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

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

4.16.2. Preparación de los geles

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

Solución de poliacrilamida al 14%

<i>Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)</i>	<i>3,5 ml</i>
<i>Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8</i>	<i>0,94 ml</i>
<i>SDS 10%</i>	<i>75 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>4 µl</i>
<i>Persulfato de sodio al 1,5%</i>	<i>375 µl</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>2,61 ml</i>

Solución de "stacking" al 5 %

<i>Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)</i>	<i>1,16 ml</i>
<i>Buffer Tris-ClH 0,5 M, pH 6,8</i>	<i>0,87 ml</i>
<i>SDS 10%</i>	<i>70µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>4 µl</i>
<i>Persulfato de amonio al 1,5%</i>	<i>0,3 5ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>4,53 ml</i>

4.16.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las siembras de las muestras se realizaron bajo buffer con jeringa Hamilton. Los volúmenes sembrados fueron de 5 μ l para los patrones de peso molecular y de 5-10 μ l para las muestras. Las electroforesis se desarrollaron en un equipo vertical, Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad), manteniendo la corriente a 30 mA durante el pasaje de las proteínas por el gel de stacking y a 60 mA hasta que el colorante azul de bromofenol, utilizado como marcador, llegue al final del gel de resolución. El buffer de reservorio empleado fue el siguiente:

Buffer de reservorio

<i>Tris</i>	<i>3,0 g</i>
<i>Glicina</i>	<i>14,4 g</i>
<i>SDS</i>	<i>1,0 g</i>
<i>Agua c.p.s.</i>	<i>100 ml</i>

Este buffer se debe diluir 1:10 antes de ser utilizado.

4.16.4. Fijación y coloración

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

Solución colorante

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

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

Solución decolorante

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

4.16.5. Estimación de las masas moleculares

Con el objeto de estimar las masas moleculares se sembró en todos los geles una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos con masas moleculares comprendidas entre 14,4 kDa y 94 kDa (LMW kit, Pharmacia). Los geles fueron “escaneados” y analizados utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation. 82 Worman's Mill Court, Suite H. Web site: <http://www.scioncorp.com>) y las masas moleculares relativas se estimaron mediante el uso de la correspondiente curva de calibración.

4.17. Isoelectroenfoque

Se desarrolló la técnica de isoelectroenfoque (IEF) sobre geles de poliacrilamida al 10% con un gradiente de pH de 3,0 a 10,0. Mediante esta técnica desarrollada con el empleo de un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad) se determinaron los valores de los puntos isoeléctricos de las fracciones proteolíticamente activas.

4.17.1. Preparación de las muestras

Tanto las muestras purificadas como los extractos crudos se concentraron por precipitación con 3 volúmenes de acetona. Los sobrenadantes resultantes luego de centrifugar a $11.000 \times g$ durante 20 minutos fueron eliminados y la desionización se logró por redisolución de los precipitados en agua desionizada, repitiendo dos veces consecutivas dicho tratamiento.

4.17.2. Formación de los geles.

Los geles para el desarrollo de los isoelectroenfocos fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles provista por el Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad) que permite preparar dos placas en forma simultánea. Para cada placa se utiliza una película plástica (Gel Support Film, Bio-Rad) que presenta una cara hidrofóbica y una cara hidrofílica; ésta última se adhiere firmemente sobre un vidrio de las mismas dimensiones y el conjunto se invierte sobre la bandeja formadora de geles, quedando la cara hidrofóbica hacia abajo. Para obtener dos geles de un gradiente de pH comprendido entre 3,0 y 10,0 se debe preparar la siguiente solución de poliacrilamida:

Solución de poliacrilamida al 10%

<i>Acilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C)</i>	<i>2,0 ml</i>
<i>Glicerol (25% p/v)</i>	<i>2,0 ml</i>
<i>Anfolitos (Pharmalyte 3-10)</i>	<i>0,5 ml</i>
<i>Agua desionizada</i>	<i>5,5 ml</i>

Luego de ser desgasificada durante 15 minutos por aplicación de vacío, a esta solución se le deben adicionar los siguientes reactivos necesarios para iniciar la polimerización:

<i>TEMED</i>	<i>3,0 μl</i>
<i>Persulfato de sodio al 10%</i>	<i>60 μl</i>

Posteriormente la mezcla a polimerizar se dejó escurrir lentamente con pipeta, cuidando de no permitir la entrada de oxígeno a la misma, entre la cara hidrofóbica de la película plástica adherida a la placa de vidrio y la bandeja formadora de geles.

El conjunto se mantuvo durante 12 horas a temperatura ambiente para lograr la polimerización total. Luego los geles fueron removidos de la bandeja con ayuda de una espátula delgada. Una forma alternativa de lograr la polimerización en forma más rápida (2 horas) fue agregar a la mezcla antes mencionada 60 μ l de una solución saturada de riboflavina.

4.17.3. Desarrollo del isoelectroenfoque

Las siembras de las muestras a analizar se aplicaron con jeringa Hamilton en volúmenes comprendidos entre 1-5 μ l y se permitió que difundieran dentro del gel durante 5 minutos. Los electrodos de la celda de isoelectroenfoque fueron humedecidos con agua bidestilada, los geles sembrados se apoyaron inmediatamente sobre los mismos y sobre la celda se colocó la tapa, quedando herméticamente cerrada. El enfocado de las proteínas se llevó a cabo en tres etapas sucesivas: 15 minutos a 100 V, otros 15 minutos a 200 V y 60 minutos a 450 V.

4.17.4. Fijación y coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles fueron sumergidos durante 30 minutos en la siguiente solución fijadora:

<i>Acido sulfosalicilico</i>	<i>4 g</i>
<i>Metanol</i>	<i>30 ml</i>
<i>Acido Tricloroacético</i>	<i>12,5 g</i>
<i>Agua c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

Luego de fijados, los geles fueron tratados durante dos horas con una solución colorante y posteriormente decolorados mediante sucesivos lavados en primer término con solución decolorante I y finalmente con solución decolorante II, hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante

<i>Acido acético glacial</i>	<i>10 ml</i>
<i>Etanol</i>	<i>27 ml</i>
<i>Coomasie Brilliant Blue R 250</i>	<i>40 mg</i>
<i>Agua c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

Esta solución se debe filtrar antes de utilizarla.

Solución decolorante I

<i>Acido acético glacial</i>	<i>7 ml</i>
<i>Etanol</i>	<i>12 ml</i>
<i>CuSO₄</i>	<i>500 mg</i>
<i>Agua c.s.p.</i>	<i>100 ml</i>

Solución decolorante II

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

4.17.5. Estimación de los puntos isoelectricos

Para estimar los puntos isoelectricos (pI) de las proteasas investigadas mediante la técnica de isoelectroenfoque, se sembró en los geles una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (3,5-9,3) como patrones de referencia (kit Pharmacia). Luego se confeccionó una curva de calibración graficando los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

4.18. Zimograma

Para detectar cuál de las bandas enfocadas presenta actividad proteolítica, luego del desarrollo del IEF los geles sin fijar fueron inmediatamente puestos en contacto durante 15 min a 55°C con un gel de agarosa embebido en caseína al 1% (Westergaard *et al.*, 1980) y luego se colorearon con Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.18.1 Preparación de las placas agarosa-caseína

Las placas de agarosa para el desarrollo del zimograma se prepararon sobre una película de GelBond (Pharmacia) de un tamaño mayor al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en una solución de caseína al 1% en el mismo buffer durante 20 minutos, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 minutos.

4.18.2. Incubación

El gel de poliacrilamida proveniente del IEF, sin previa fijación, se dispuso sobre la placa de agarosa embebida en caseína que actúa como sustrato, evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto se colocó en el interior de una cámara húmeda y se llevó a estufa a 55°C durante 15 minutos.

4.18.3. Proceso de fijación y coloración

Luego de la incubación, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 minutos en la siguiente solución fijadora:

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

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa-caseína fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 minutos. Luego fue secada con pistola de aire y finalmente sumergida durante 10-30 minutos en la siguiente solución colorante:

Solución colorante

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

Esta solución debe ser filtrada antes de usar.

Por último se elimina el exceso de colorante mediante inmersión de la placa de agarosa-caseína en solución fijadora durante 10 minutos.

4.19. Determinación de la secuencia aminoacídica N-terminal

El microsecuenciamiento de proteínas se realizó en un secuenciador automático basado en la técnica de Edman. El rendimiento y la sensibilidad se ven muy aumentados con respecto al procedimiento manual debido a la óptima exclusión del oxígeno, la buena preservación de todos los productos químicos dentro del equipo bajo presión de nitrógeno y la alta sensibilidad del detector de UV.

En el procedimiento de Edman, el feniltioisocianato reacciona cuantitativamente con el grupo amino libre de la proteína y rinde el correspondiente péptido feniltiocarbamilado. Por tratamiento con ácido anhídrico (trifluoroacético), el resto N-terminal se separa en forma de aminoácido feniltiocarbamilado, dejando intacto el resto de la cadena polipeptídica. El aminoácido feniltiocarbamilado en ácido diluido sufre una isomerización, con lo que se transforma en el correspondiente derivado de la feniltiohidantoína (PTH), que es separado e identificado cuantitativamente por el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) dispuesto en línea con el secuenciador.

El secuenciador empleado fue un equipo Beckman LF3000 Protein Sequencer equipado con un analizador de PTH-aminoácidos System Gold (Beckman).

Las muestras fueron preparadas partiendo de 10-100 picogramos de proteína y se inmovilizaron sobre filtros de PVDF. La muestra fue dispuesta en un tubo Ultrafree-Probind Filters y centrifugada a $10.000 \times g$ durante 2 minutos, procediendo luego a despegar el filtro de PVDF y a lavarlo varias veces con agua Milli Q.

A partir de la información obtenida se realizó la búsqueda de homología utilizando el servicio BLAST network (Altschul *et al.*, 1997).

Resultados

ASPECTOS BOTÁNICOS

5.1. Estudios anatómicos

5.1.1. *MORRENIA BRACHYSTEPHANA* GRISEB.

5.1.1.1. Hoja

1- Lámina

a) *Arquitectura foliar*. La red vascular es gruesa y densa. La venación es de tipo actinódroma, con una vena principal de tamaño masivo. Las venas secundarias presentan ángulo de divergencia moderado. La venación última marginal es incompleta. Las vénulas se ramifican 2 o 3 veces y están constituidas por traqueidas prosenquimáticas que se disponen en número de 3 a 5 en posición lateral unas con respecto a las otras, dando esto un aspecto dilatado a las terminaciones vasculares. Las aréolas, rectangulares, están bien desarrolladas y dispuestas al azar con vénulas simples o ramificadas una vez (Fig. 10 A; Fig. 11 A-B).

b) *Epidermis en vista superficial*. Las células epidérmicas son pentagonales, hexagonales y más raramente cuadrangulares, de contornos rectos. Los estomas, presentes en ambas caras de la hoja, son de tipo rubiáceos, con reborde cuticular (Fig. 14 A-C).

Los pelos simples unicelulares y pluricelulares con superficie verrucosa están en ambas caras, siendo más abundantes en la abaxial (Fig. 10 B-C).

Con MEB se observa una cutícula estriada con depósito conspicuo de ceras epicuticulares que se presentan como grumos subsféricos (Fig. 14 A-C).

c) *Corte transversal*. Ambas epidermis son uniestratificadas, de células cuadradas o rectangulares, con paredes celulares engrosadas y cubiertas de una cutícula conspicua. Los estomas se encuentran levemente hundidos con respecto a las células vecinas.

Se observa una hipodermis diferenciada en la cara adaxial. El mesófilo es de tipo isobilateral con clorénquima en empalizada representado por tres hileras de células, discontinuo a la altura del nervio medio en la cara abaxial. El parénquima esponjoso laxamente dispuesto deja espacios intercelulares, presenta cristales de oxalato de calcio formando drusas (Fig. 15 A) y cuerpos grasos cuyo diámetro promedio es de $291,8 \pm 1,39 \mu\text{m}$. Laticíferos ramificados no articulados recorren el mesófilo.

El nervio medio se halla constituido por haces vasculares bicolaterales y presenta un refuerzo de colénquima laminar hacia la cara abaxial (Fig. 10 D; Fig. 11 C).

2-Pecíolo. El corte transversal es de contorno cóncavo-convexo con dos pequeñas alas. La epidermis es unistrata con pelos simples similares a los descritos para la lámina (Fig. 14 D). Colénquima laminar en posición subepidérmica, continuo, más abundante en las alas, seguido de 2 o 3 capas de clorénquima en empalizada que se interrumpe hacia el lado convexo. En el parénquima esponjoso se observan drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio y canales secretores de mucílagos.

El nervio principal constituido por haces vasculares bicolaterales al igual que los nervios de cada una de las alas (Fig. 10 E).

Caracteres observados	Epidermis adaxial	Epidermis abaxial
Índice estomático	$2,55 \pm 0,64$	$4,26 \pm 1,87$
Densidad de estomas	$68,71 \pm 4,68$	$96,57 \pm 11,56$
Longitud de células oclusivas	$26,38 \pm 1,81$	$28,05 \pm 2,42$
Densidad de indumento	$35,01 \pm 4,43$	$127,0 \pm 0,98$
Índice de empalizada	$1,92 \pm 0,47$	$1,35 \pm 0,24$

Tabla 1. Caracteres morfométricos de la hoja.

5.1.1.2. Tallo

a) *Estructura en el estado de crecimiento primario.* El transcorte por la

zona media de un entrenudo de ramas jóvenes muestra una epidermis uniestratificada con gruesa cutícula y pelos simples uni o pluricelulares. En la corteza se observa colénquima laminar constituido por dos capas de células, el parénquima cortical con canales secretores, laticíferos no articulados ramificados y drusas de oxalato de calcio. El cilindro central está limitado por fibras perifloemáticas blandas. El sistema vascular es una sifonostela anfifloica.

La médula está bien desarrollada y el parénquima que la constituye es de células isodiamétricas grandes. Se pueden observar en ella canales secretores de mucílagos, laticíferos y drusas de oxalato de calcio (Fig. 10 F).

b) Estructura en el estado de crecimiento secundario. Muestra una epidermis unistrata con gruesa cutícula y escasos estomas. Se observa un parénquima cortical externo formado por dos capas de colénquima laminar y tres capas de parénquima en empalizada con laticíferos y drusas de oxalato de calcio; el parénquima interno está constituido por células más o menos isodiamétricas con escasos espacios intercelulares. Hay cavidades secretoras, drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio (Fig. 15 B).

Las fibras blandas que limitan externamente el cilindro vascular se disponen en forma de casquetes.

El xilema forma un anillo continuo atravesado por radios uni o biseriados; aparecen fibras con capa G. El floema interno está formando grupos aislados en la margen de la médula.

El parénquima medular contiene cavidades con mucílagos, laticíferos, drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio (Fig. 10 G).

c) Material disociado del tallo. Se observan elementos vasales cortos, punteados con pequeño apéndice, placa de perforación simple y oblicua y otros más largos, escalariformes, sin apéndice con placa de perforación simple y levemente oblicua. Las puntuaciones areoladas presentan disposición alterna. También se encuentran algunas traqueidas, fibras libriformes, células del parénquima axial y laticíferos no articulados ramificados (Fig. 10 J-K; Fig. 11 E-F).

Caracteres morfoanatómicos	Diámetro (μm)	Longitud (μm)		
		Mínimo	Máximo	Promedio
Fibras	$11,9 \pm 2,84$	250	400	$304 \pm 38,93$
Elementos vasales	$26,0 \pm 10,48$	210	380	$253 \pm 51,00$

Tabla 2. Caracteres morfométricos de fibras y elementos vasales del tallo.

5.1.1.3. Raíz

Se observan zonas de súber quebrado, bien desarrollado con hasta 15 capas de células de paredes delgadas. El parénquima cortical presenta espacios intercelulares con mucílagos, esclereidas aisladas, drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio y laticíferos.

El xilema es de porosidad subcircular con pocos vasos de diámetro pequeño, escaso parénquima axial difuso y vasicéntrico y numerosas fibras libriformes. Los radios son uni o biseriados de células parenquimáticas anchas (Fig. 10 H; Fig. 11 D).

5.1.1.4. Fruto

El corte transversal del pericarpio muestra un epicarpio representado por una epidermis externa unistrata con estomas, pelos adpresos, abundantes en el fruto joven y en menor cantidad en el fruto maduro, y una hipodermis pluriestratificada, de 2 a 3 capas de células.

Se continúa el mesocarpio, parenquimatoso pluriestratificado, que comprende una zona externa, laxa y una región interna más compacta formada por células de paredes delgadas que dejan entre sí espacios intercelulares de forma variable. Durante el crecimiento y maduración del fruto aumenta el tamaño de los espacios intercelulares, formándose un aerénquima. Presenta haces vasculares colaterales con casquetes de fibras del lado del floema y abundantes laticíferos no articulados ramificados.

El endocarpio está constituido por una epidermis interna, de células tangencialmente aplanadas y una capa subepidérmica pluriestratificada (Fig. 10 I).

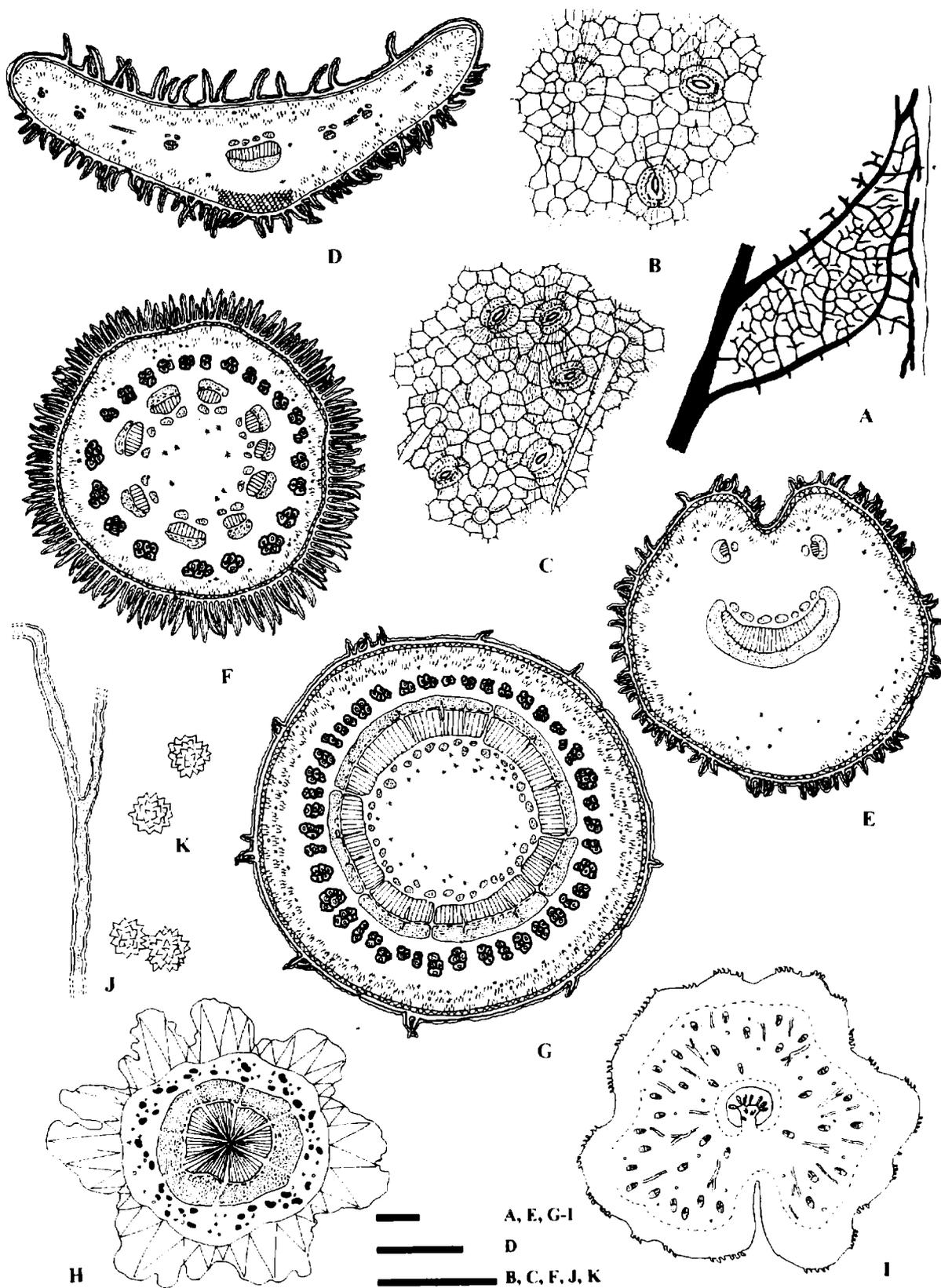


Figura 10. A-K *Morrenia brachystephana* Griseb. Representación esquemática. Arquitectura foliar: A: detalle de la aréola con venación marginal. B-C: vista superficial de la epidermis, estomas rubiáceos: B: adaxial, C: abaxial. D-I: sección transversal: D: lámina foliar, E: peciolo, F: tallo con estructuración primaria, G: tallo con estructuración secundaria, H: raíz, I: fruto. J-K: elementos disociados: J: laticíferos, K: cristales de oxalato de calcio. Escala = 500 μm : A, E, G-I; 300 μm : D; 100 μm : B, C, F, J, K.

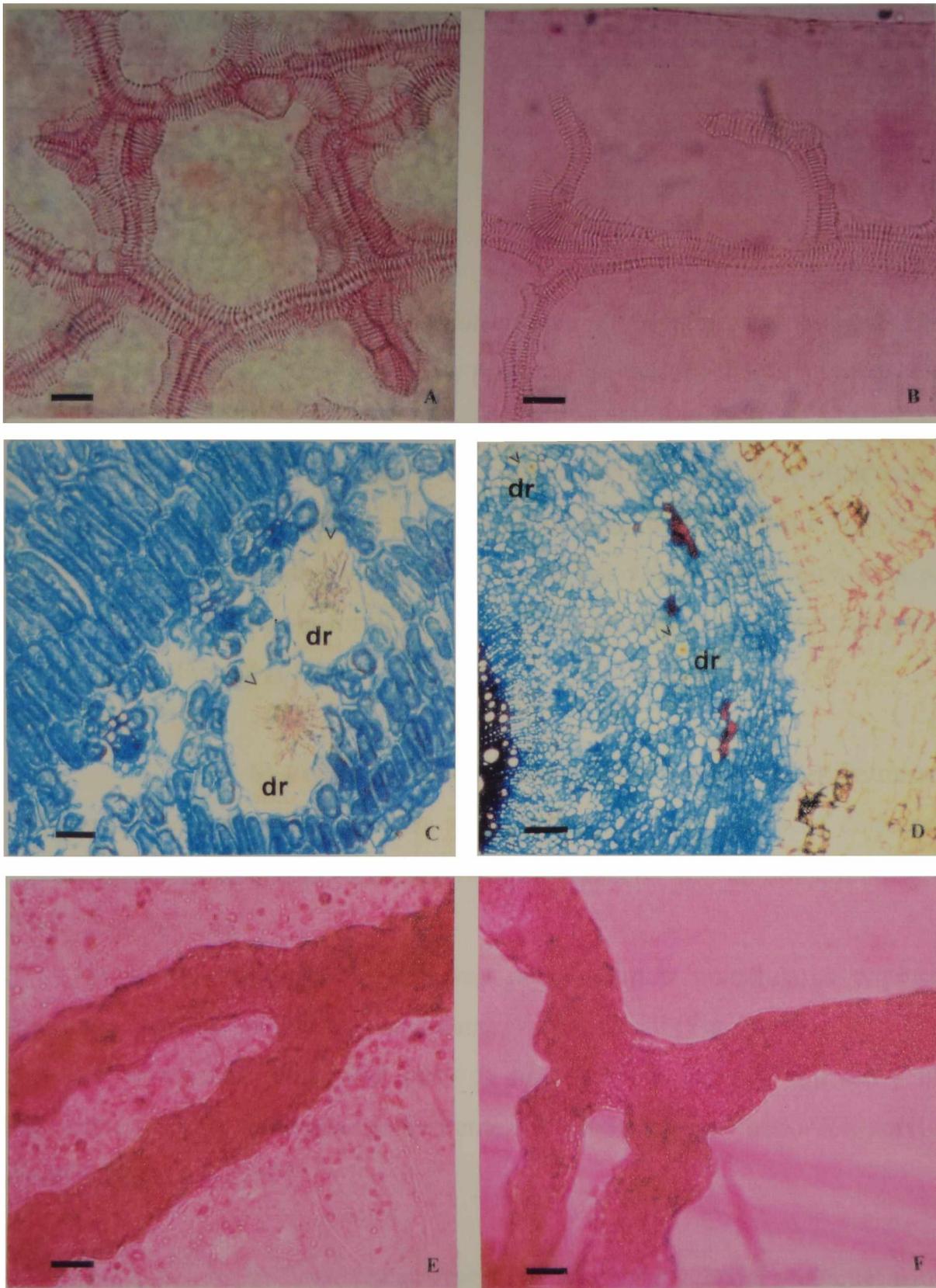


Figura 11. A-F *Morrenia brachystephana* Griseb. Fotomicrografías con MO. A-B: arquitectura foliar: A: detalle de la aréola, B: terminación vascular con 3-5 traqueidas prosenquimáticas y venación última marginal incompleta. C-D: sección transversal: C: mesófilo isobilateral, D: raíz, E-F: elementos disociados: E: laticífero configuración Y, F: laticífero configuración H. dr: drusas de oxalato de calcio. Escala = 25 μm : A, B, E, F; 50 μm : C; 100 μm : D.

5.1.2. MORRENIA ODORATA (HOOK. ET ARN.) LINDLEY

5.1.2.1. Hoja

I- Lámina

a) *Arquitectura foliar*. La red vascular es gruesa y densa. La venación es de tipo actinódroma. Con una vena primaria de tamaño fuerte y venas secundarias con ángulo de divergencia moderado. La venación última marginal es ojalada. Las vénulas se ramifican 2 o 3 veces. Las vénulas están constituidas por traqueidas prosenquimáticas que se disponen en número de 3 a 5 en posición lateral unas con respecto a las otras, lo que da un aspecto dilatado a las terminaciones vasculares. Las aréolas están bien desarrolladas, tienen disposición al azar y por la forma son rectangulares, con vénulas simples o ramificadas una vez (Fig. 12 A; Fig. 13 A-B).

b) *Epidermis en vista superficial*. Las células epidérmicas propiamente dichas son pentagonales, hexagonales y más raramente cuadrangulares, de paredes rectas. Los estomas, presentes en ambas caras, son de tipo rubiáceos, con un doble reborde cuticular (Fig. 12 B-C; Fig. 14 E-F).

En ambas epidermis se observan pelos simples unicelulares y pluricelulares con superficie verrucosa, siendo más abundantes en la abaxial (Fig. 14 H).

La observación con MEB puso de manifiesto la cutícula estriada y un depósito de ceras epicuticulares en forma densamente filamentosa y en menor proporción de grumos subsféricos (Fig. 14 E-F).

c) *Corte transversal*. Las epidermis adaxial y abaxial son unistratas, de células cuadradas o rectangulares, con paredes tangenciales externas engrosadas, cubiertas de una cutícula conspicua y con estomas levemente hundidos con respecto a las células vecinas. Por debajo de la epidermis adaxial se ubica una hipodermis de células cuadrangulares grandes. El mesófilo es de tipo isobilateral compuesto por tres capas de células de parénquima en empalizada, discontinuo a la altura del nervio medio en la cara abaxial. El parénquima

esponjoso laxamente dispuesto deja amplios espacios intercelulares, presenta idioblastos con drusas de oxalato y cuerpos grasos cuyo diámetro promedio es de $259,9 \pm 1,19 \mu\text{m}$ (Fig. 13 C-D).

Laticíferos ramificados no articulados siguen a los haces vasculares, se ramifican en el mesófilo y alcanzan a menudo la epidermis.

El nervio medio se halla constituido por haces vasculares bicolaterales, que presentan un refuerzo de colénquima laminar hacia la cara abaxial (Fig. 12 D).

2-Pecíolo. El corte transversal es de contorno adaxial-abaxial acanalado convexo, con dos pequeñas expansiones adaxiales aliformes. La epidermis es unistrata con pelos simples similares a los descritos para la lámina. En posición subepidérmica el colénquima laminar ocupa todo el contorno, siendo aún más abundante en las alas. Se continúa con 2 ó 3 capas de clorénquima en empalizada que se interrumpe hacia el lado convexo. En el parénquima esponjoso se observan drusas, cristales solitarios de oxalato de calcio y canales secretores de mucílagos.

El nervio principal está constituido por haces vasculares bicolaterales con dos haces menores que se encuentran en la proximidad de las alas (Fig. 12 E).

Caracteres observados	Epidermis adaxial	Epidermis abaxial
Índice estomático	$1,64 \pm 0,61$	$1,80 \pm 0,46$
Densidad de estomas	$31,71 \pm 4,92$	$34,88 \pm 1,53$
Longitud de células oclusivas	$26,16 \pm 1,25$	$25,00 \pm 2,50$
Densidad de indumento	$23,01 \pm 3,37$	$92,01 \pm 4,12$
Índice de empalizada	$1,57 \pm 0,19$	$1,50 \pm 0,20$

Tabla 3. Caracteres morfométricos de la hoja.

5.1.2.2. Tallo

a) *Estructura en el estado de crecimiento primario.* Se estudiaron

cortes transversales realizados a nivel del primer o segundo entrenudo desde el ápice. Las estructuras observadas permitieron distinguir una epidermis uniestratificada con gruesa cutícula y pelos simples uni o pluricelulares (Fig. 14 G), en la corteza dos capas de células de colénquima laminar y en el parénquima cortical canales secretores, laticíferos no articulados ramificados y cristales de oxalato de calcio formando drusas.

El cilindro central está limitado por fibras perifloemáticas blandas. El sistema vascular es una sifonostela anfifloica.

La médula está bien desarrollada y el parénquima que la constituye es de células redondeadas grandes. Podemos observar en ella canales secretores de mucílagos, laticíferos y drusas de oxalato de calcio (Fig. 12 F).

b) Estructura en el estado de crecimiento secundario. Muestra una peridermis de origen epidérmico. El parénquima cortical externo está formado por dos capas de colénquima laminar y tres capas de parénquima en empalizada con laticíferos y drusas de oxalato de calcio. El parénquima interno presenta una organización más laxa con células más o menos isodiamétricas que dejan escasos espacios intercelulares, con cavidades secretoras, drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio.

El cilindro vascular está limitado externamente por fibras blandas que se disponen formando casquetes.

El xilema forma un anillo continuo atravesado por radios uni o biseriados; aparecen fibras con capa G. El floema interno está formando grupos aislados en la margen de la médula.

El parénquima medular presenta cavidades con mucílagos, laticíferos, drusas y cristales solitarios de oxalato de calcio (Fig. 12 G).

c) Material disociado del tallo. Se observan vasos cortos, punteados con pequeño apéndice, placa de perforación simple y oblicua, además de otros más largos, escalariformes, sin apéndice. La placa de perforación es simple horizontal o ligeramente inclinada y las puntuaciones son areoladas con disposición alterna.

Se observan también algunas traqueidas, fibras libriformes, células del parénquima axial y laticíferos no articulados ramificados (Fig. 12 J-K; Fig. 13 E-F).

Caracteres morfoanatómicos	Diámetro (μm)	Longitud (μm)		
		Mínimo	Máximo	Promedio
Fibras	$19,5 \pm 1,58$	320	440	$397 \pm 43,72$
Elementos vasales	$37,0 \pm 8,23$	230	440	$313 \pm 65,83$

Tabla 4. Caracteres morfométricos de fibras y elementos vasales del tallo.

5.1.2.3. Raíz

Presenta una peridermis de origen superficial, con 9 a 12 estratos de células rectangulares con paredes delgadas. Conserva el parénquima cortical, homogéneo, con varios estratos de células isodiamétricas que dejan espacios intercelulares; contiene abundante almidón, mucílagos, esclereidas aisladas, laticíferos no articulados ramificados, drusas y cristales prismáticos de oxalato de calcio.

El cilindro vascular con estructuración secundaria presenta el xilema sulcado en la periferia, de porosidad anular, con vasos de diámetro grande aislados. El parénquima axial es escaso y difuso y presenta numerosas fibras libriformes. El sistema radial es homogéneo, con radios uni o biseriados homocelulares (Fig. 12 H).

5.1.2.4. Fruto

El corte transversal del pericarpio muestra un epicarpio con la epidermis externa con cutícula gruesa y estriada. Presenta estomas y pelos adpresos en el fruto joven. Se continúa con una hipodermis pluriestratificada, de 4 a 5 capas de células.

En el mesocarpio parenquimatoso pluriestratificado se diferencia una zona externa, compacta y una región interna muy laxa formada por células de paredes delgadas que dejan entre sí espacios intercelulares de forma variable, que aumentan de tamaño convirtiéndose en un aerénquima en el fruto maduro. Presenta haces vasculares bicolaterales con casquetes de fibras esclerenquimáticas, cristales de oxalato de calcio (Fig. 15 C-D) y laticíferos no articulados ramificados. El endocarpio está constituido por una epidermis interna, de células tangencialmente aplanadas y una capa subepidérmica pluriestratificada (Fig. 12 I).

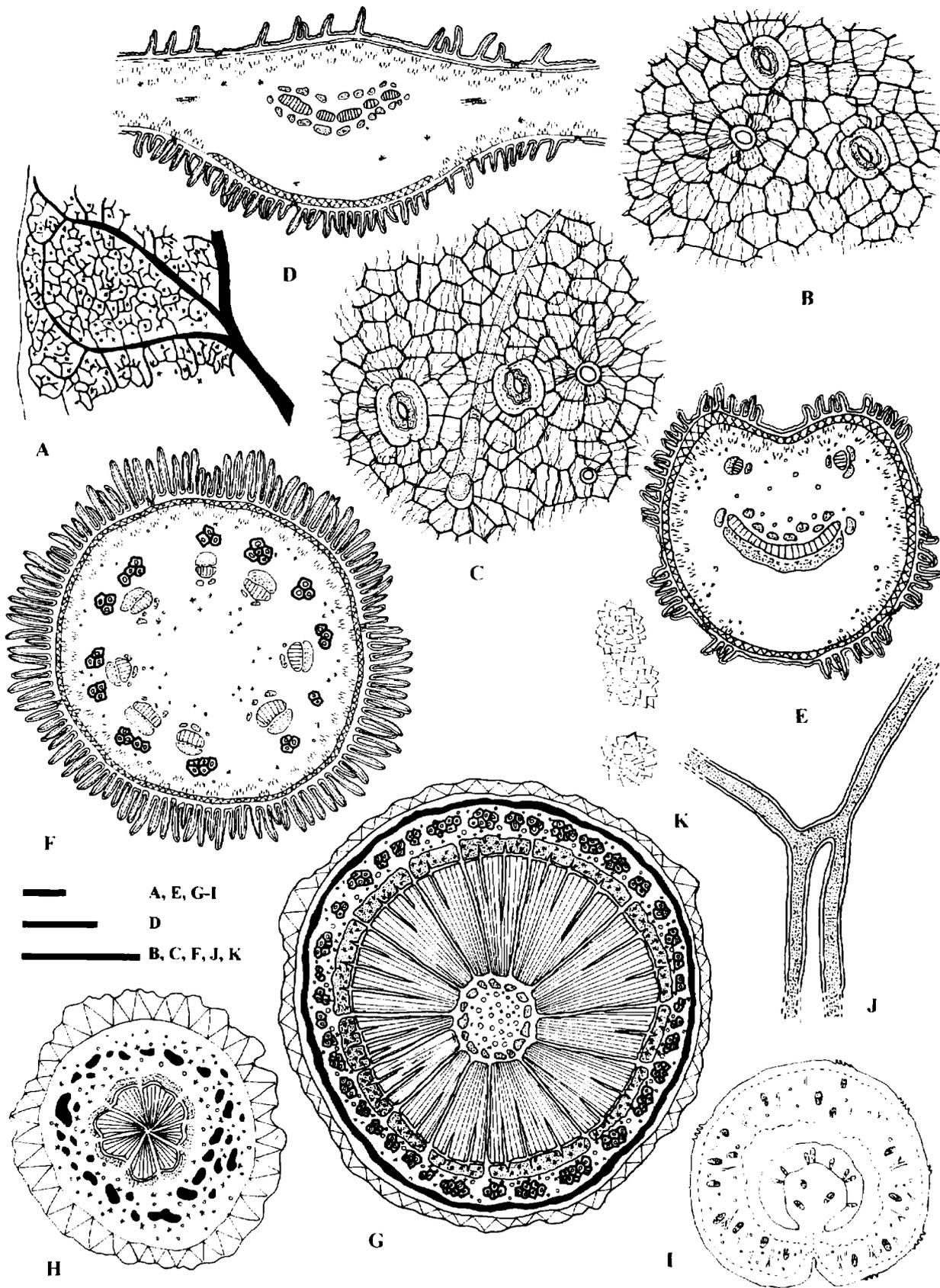


Figura 12. A-K *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. Representación esquemática. Arquitectura foliar: A: detalle de la aréola con venación marginal. B-C: Vista superficial de la epidermis, estomas rubiáceos: B: adaxial, C: abaxial. D-I: sección transversal: D: lámina foliar, E: peciolo, F: tallo con estructuración primaria, G: tallo con estructuración secundaria, H: raíz, I: fruto. J-K: elementos disociados: J: laticiferos, K: cristales de oxalato de calcio. Escala = 500 μm : A, E, G-I; 300 μm : D; 100 μm : B, C, F, J, K.

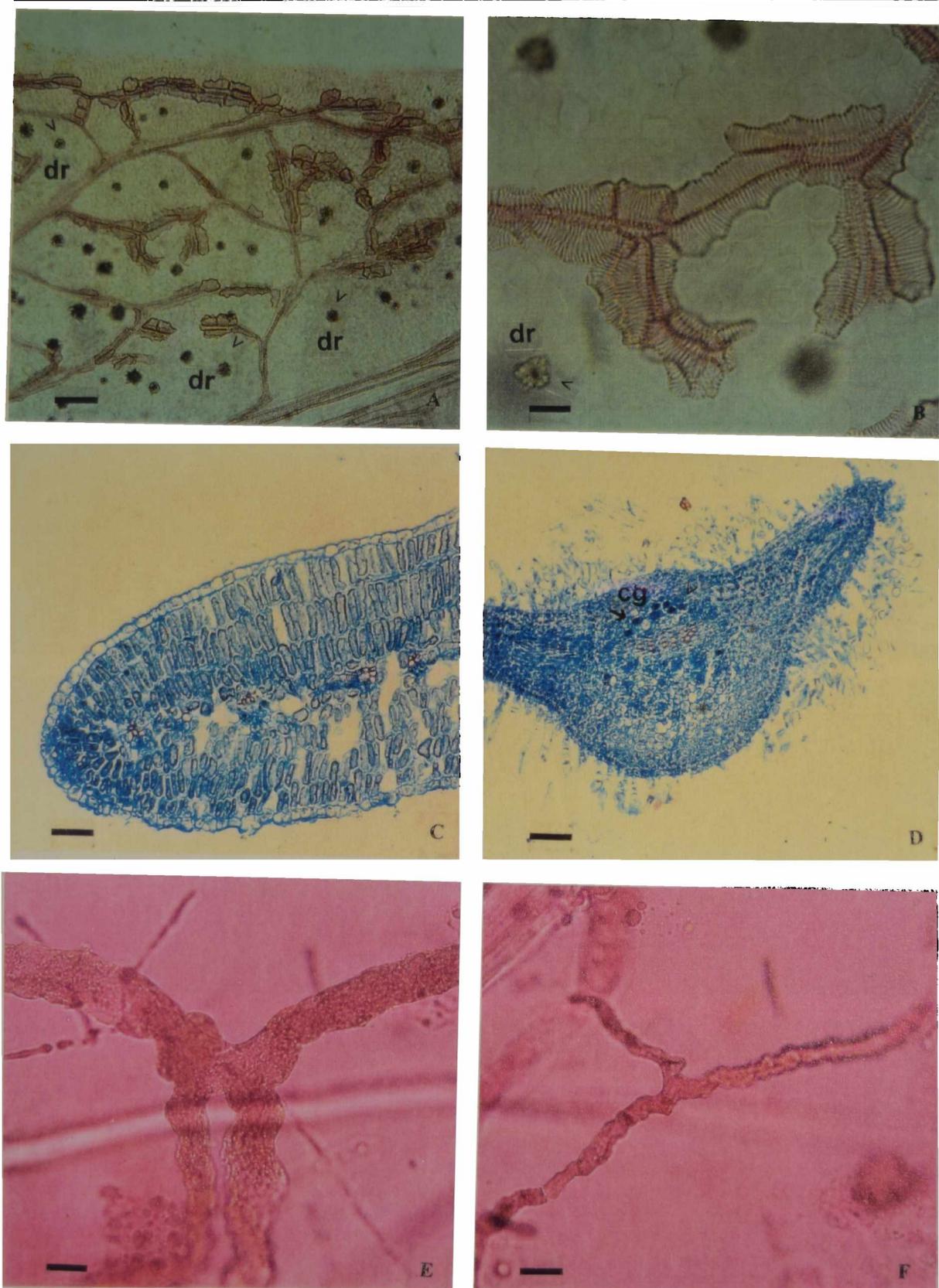


Figura 13. A-F *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. Fotomicrografías con MO. A-B: arquitectura foliar: A: terminación vascular con 3-5 traqueidas prosenquimáticas y venación última marginal ojalada, B: detalle de la aréola. C-D: sección transversal de la hoja: C: mesófilo isobilateral, D: parénquima con cuerpos grasos, E-F: elementos disociados: E: laticífero configuración H, F: laticífero configuración Y. cg: cuerpos grasos, dr: drusas de oxalato de calcio. Escala = 50 μ m: A, C, E; 25 μ m: B; 100 μ m: D, F.

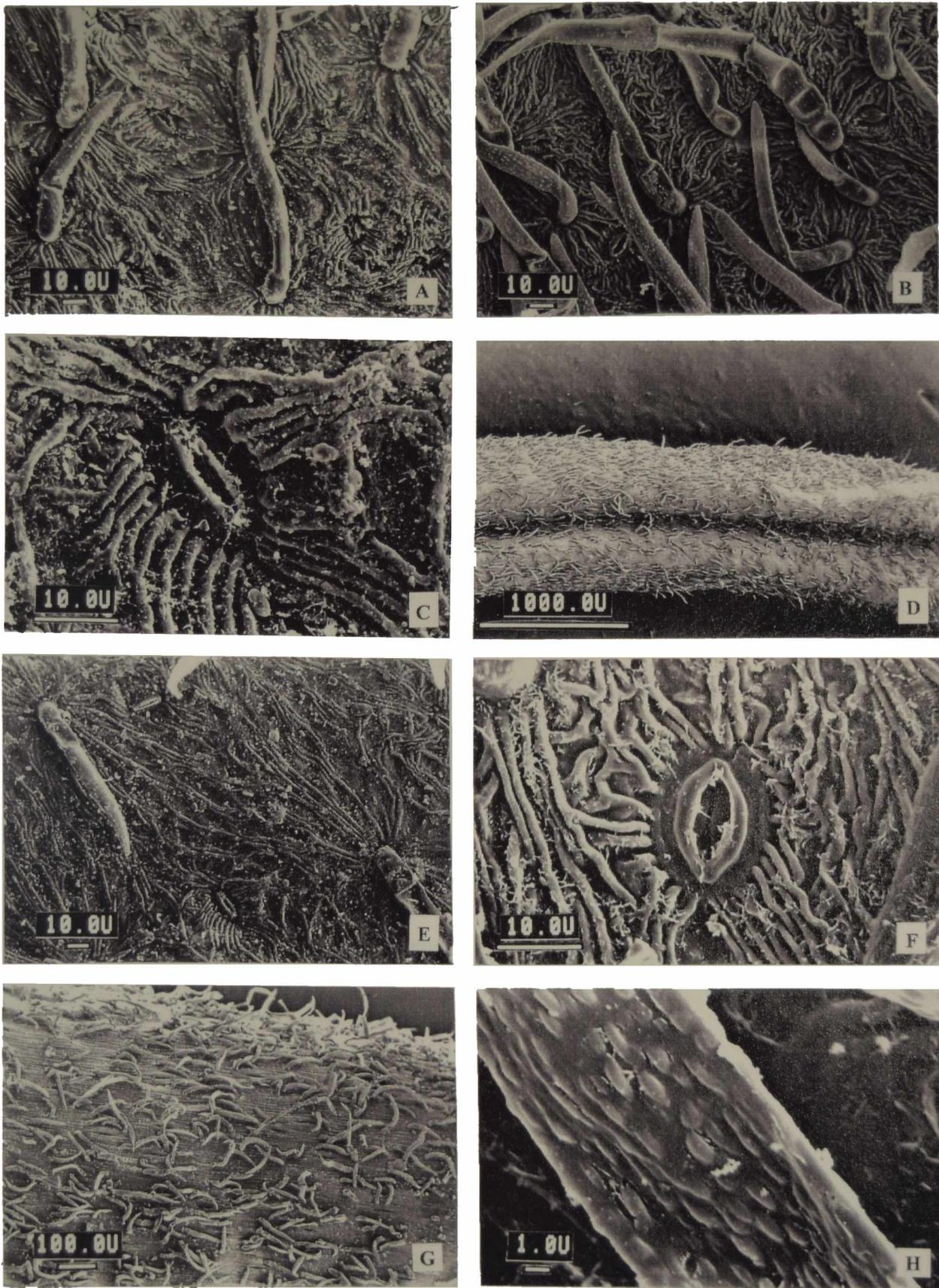


Figura 14. Observación de la superficie del vástago con MEB. A-D) *Morrenia brachystephana* Griseb.; E-H) *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. A, E: epidermis adaxial; B, F: epidermis abaxial; C, F: estoma en detalle; D: tricomas en peciolo; G: tricomas en tallo; H: tricoma en detalle

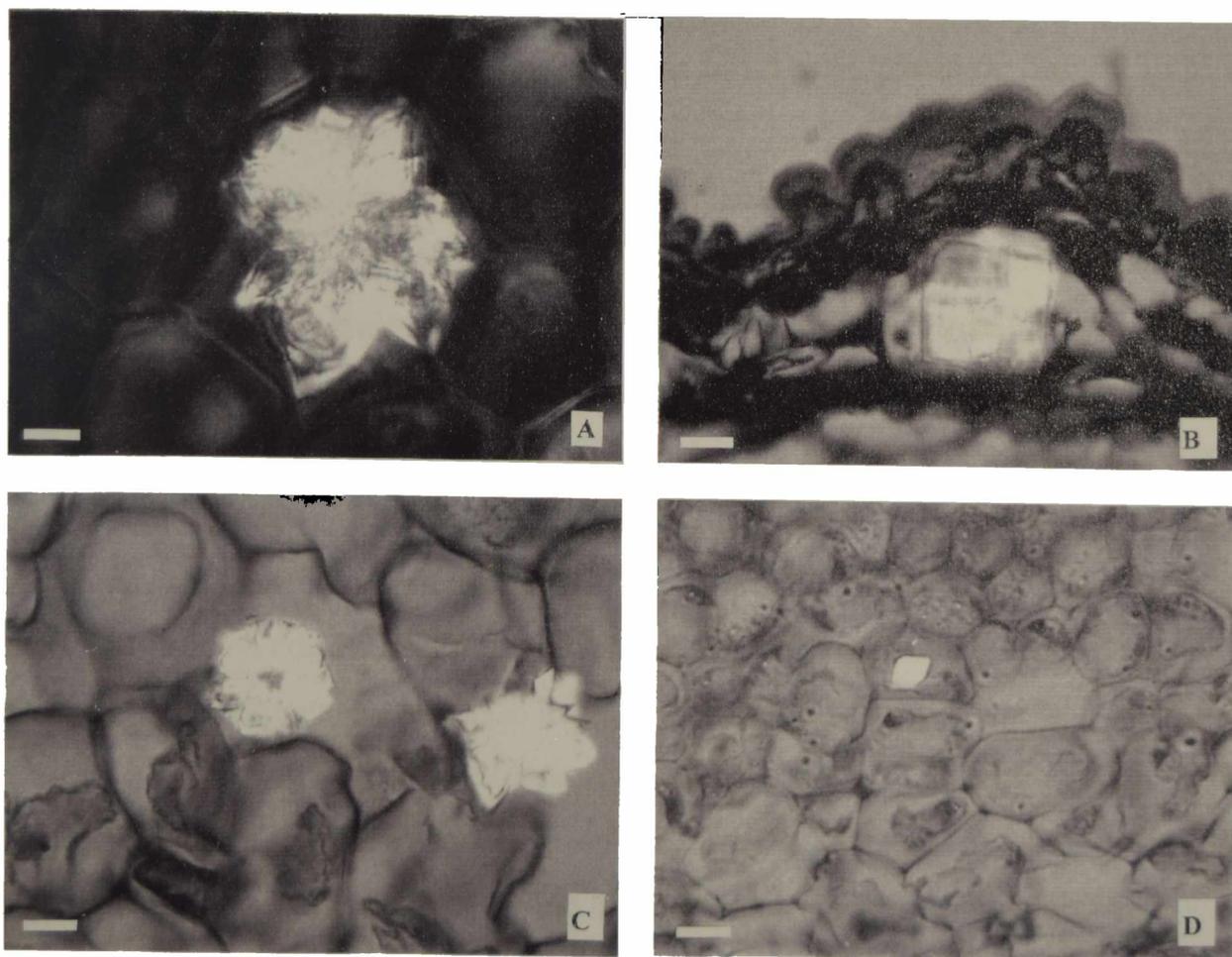
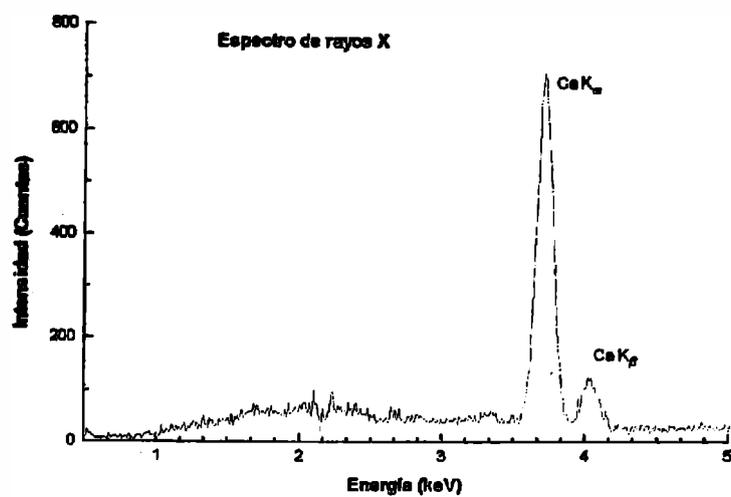


Figura 15. Fotomicrografías de cristales de oxalato de calcio con LP. A-B: *Morrenia brachystephana* Griseb.; C-D: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. A, C drusas en cortes transversales: A: de hoja; C: de fruto; B, D cristal solitario en cortes transversales: B: de tallo; D: de fruto. Espectro EDAX correspondiente al elemento calcio. Escala = 10 μ m: A-D.

5.2. Estudios ontogenéticos y ultraestructurales de los laticíferos

5.2.1. Origen y desarrollo

El sistema de laticíferos tanto en *Morrenia brachystephana* Griseb. como en *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley se origina a partir de un número definido de células iniciales presentes en el embrión y no adiciona nuevas iniciales durante el posterior crecimiento de la planta (Fig. 16 A).

Las iniciales, derivadas de células meristemáticas, se distinguen por su gran tamaño. En secciones transversales de semillas inmaduras se observan 26 o 27 primordios los que se encuentran como células contiguas laterales o aislados, separados por elementos procambiales embrionarios, situados formando un anillo irregular en el nudo cotiledonear en la capa más interna de la corteza (Fig. 16 F-G). Ya en este estadio temprano de desarrollo el laticífero es más largo y ancho que las células adyacentes.

Durante el desarrollo del embrión el sistema de laticíferos se alarga a distinta velocidad, penetra intrusivamente por la lámina media de las células vecinas estableciendo contacto con nuevas células, pero nunca se observa que penetren o se fusionen con células adyacentes. Durante su crecimiento el extremo se ramifica repetidas veces y en los embriones maduros el agregado de ramas desde las iniciales del laticífero forma una red compleja en el nudo cotiledonear (Fig. 16 D). A partir de éste los laticíferos se desarrollan en todas direcciones sin anastomosarse. Primero se desarrollan acrópetamente y se ramifican en forma horizontal por una corta distancia, vuelven a ramificarse y continúan con ambos crecimientos, acrópeta y basípetamente, formando una clara configuración en H.

A partir del nudo los laticíferos se desarrollan en forma basípeta, siguiendo la periferia del cilindro vascular del hipocótilo llegando cerca del meristema radicular; otras ramas ascienden hacia el epicótilo terminando directamente debajo del ápice del vástago o entran en los cotiledones ramificándose (Fig. 16 B-E). Así pues, hay terminaciones de los laticíferos en las inmediaciones de ambos meristemas, el del brote y el de la raíz.

Frecuentemente el laticífero se puede identificar por la forma elongada, largos núcleos, a menudo de forma elipsoidal conteniendo uno o más nucléolos. Durante el

alargamiento de la inicial del laticífero el núcleo se divide para formar una célula binucleada, la que por sucesivas cariocinesis no seguidas de citocinesis resulta en un laticífero no articulado multinucleado (Fig. 16 E). Un considerable volumen del mismo aparece ocupado por una vacuola (Fig. 17 H-L).

Durante la diferenciación, el laticífero con frecuencia se distingue de las células adyacentes por la presencia de paredes primarias más o menos gruesas. El espesamiento puede ser desigual, los campos de puntuación son raramente observados, existiendo plasmodesmos entre los laticíferos y las células parenquimáticas adyacentes.

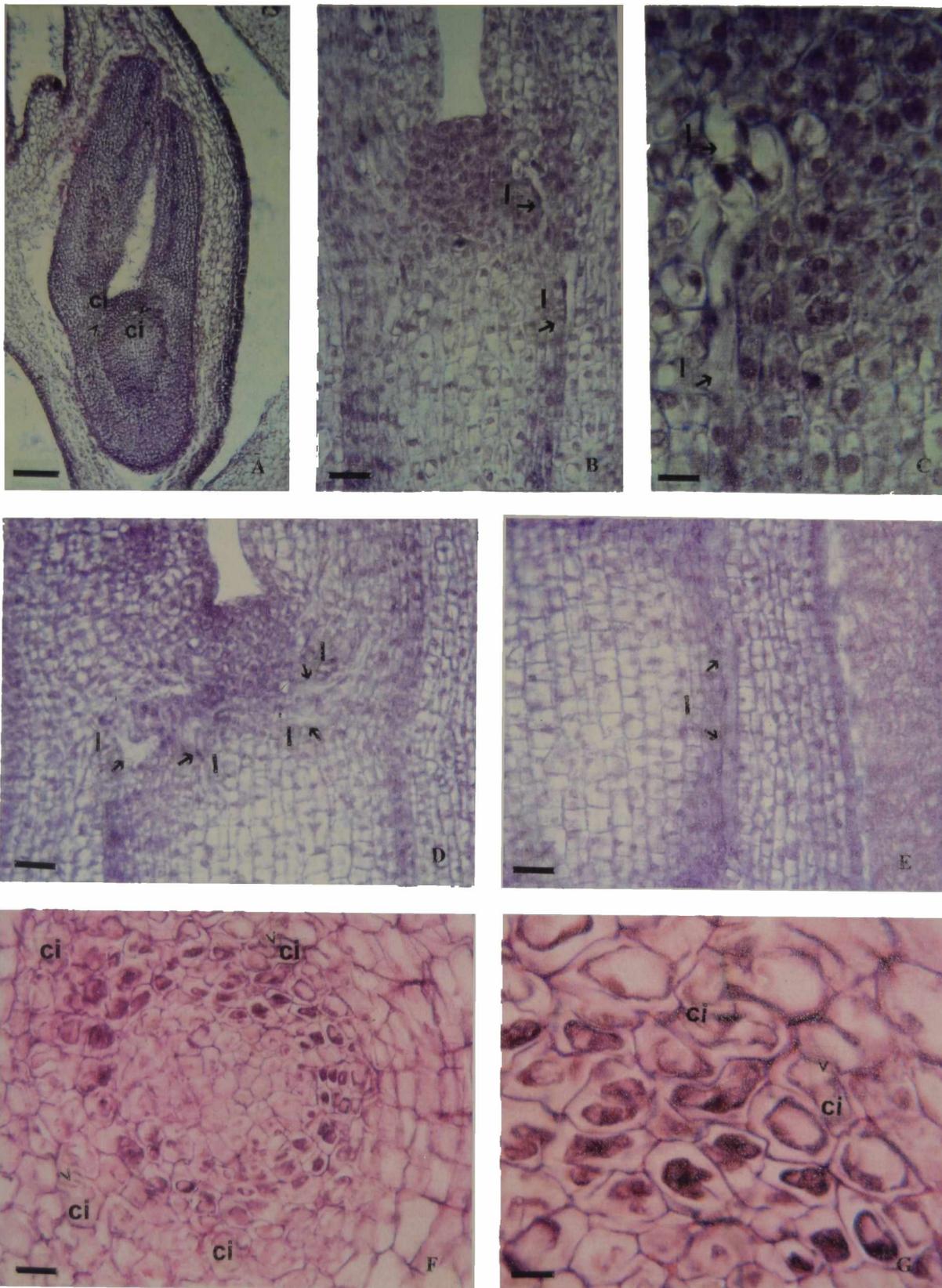


Figura 16. Fotomicrografías de embrión, origen y comienzo del desarrollo de laticíferos desde el nudo cotiledonar con MO. A-C: *Morrenia brachystephana* Griseb.; D-G: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. A-E: sección longitudinal: A: embrión mostrando el inicio de los laticíferos junto al meristema apical, B-C: desarrollo de los laticíferos fuera del nudo cotiledonar, D: plexo nodal, E: laticífero multinucleado en el hipocótilo. F-G: sección transversal a través del nudo cotiledonar del embrión. ci: células iniciales de los laticíferos, l: laticíferos. Escala = 100 μ m: A; 50 μ m: B; 10 μ m: C, G; 25 μ m: D-F.

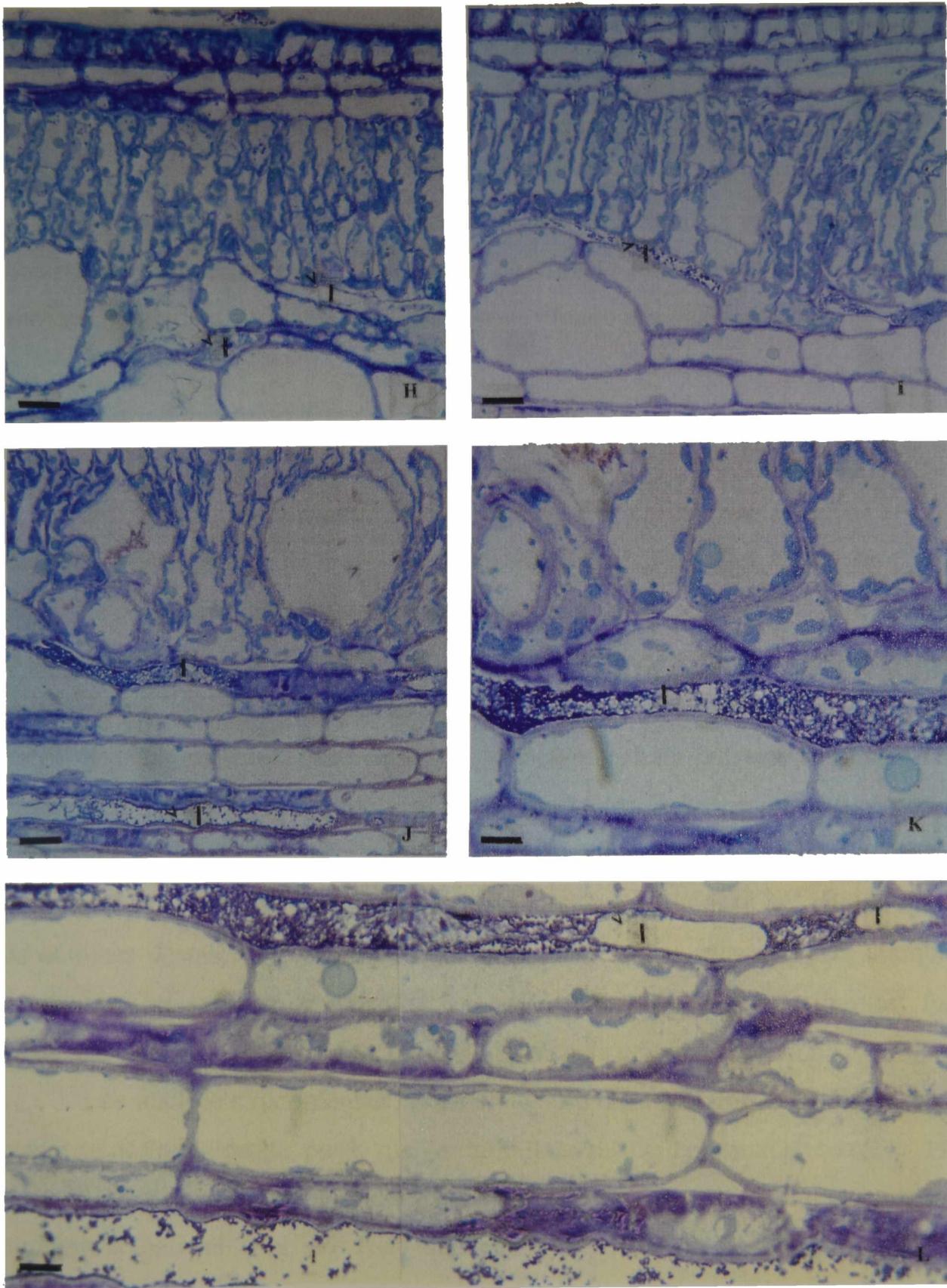


Figura 17. Sección longitudinal de laticiferos en el parénquima cortical de tallo en el estado de crecimiento primario. H-K: *Morrenia brachystephana* Griseb.; L: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. l: laticiferos. Escala = 25 μm : H-K; 10 μm : L.

5.2.2. Ultraestructura

5.2.2.1. Laticíferos en embrión joven

Se observa el extremo de crecimiento de los laticíferos que penetra entre las células. Los mismos presentan citoplasma denso, de aspecto meristemático, rico en ribosomas, que encierra numerosas vesículas pequeñas, no existiendo una larga vacuola.

5.2.2.2. Laticíferos en proceso de diferenciación

Se desarrolla un sistema de vesículas elongadas que derivan del sistema de endomembranas integrado por el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi. Estas vesículas constituyen una trama tubular protovacuolar que se ramifica y se extiende por toda la célula, al principio es un sistema de cavidades deprimidas o dobles membranas de secuestación que aíslan largas áreas citoplasmáticas formando lo que se podrían llamar bolsas lisosómicas. En el seno de las mismas comienza un proceso degradativo o autofágico gracias a la activación de las enzimas líticas que hay en la luz de los túbulos protovacuolares. Esta digestión afecta a la membrana de los túbulos que queda en el interior de las bolsas así como al contenido citoplasmático atrapado dentro de las mismas. La luz de estas bolsas lisosómicas después del proceso degradativo será la luz vacuolar y la membrana que ha quedado en el exterior se transformará en el tonoplasto. Las vacuolas así formadas son pequeñas, pero se fusionan a fin de formar la vacuola grande axial.

Los núcleos experimentan varias divisiones, están en grupos de dos o tres, con forma más o menos redondeada, por lo que los laticíferos resultan plurinucleados (Fig. 19 G).

En los laticíferos diferenciados se reconoce un área con una vacuola grande, axial y el citoplasma parietal (Fig. 19 H-J) que contiene todas las organelas usuales. El retículo endoplásmico se presenta en láminas múltiples paralelas a la pared, los ribosomas son abundantes y las mitocondrias de forma ovoide o elongada también son numerosas. Los dictiosomas están bien representados en las áreas meristemáticas y en las áreas diferenciadas donde su cara distal produce vesículas relativamente largas. Los plastidios y los microcuerpos son notables.

5.2.2.3. Laticíferos en embrión adulto

Existen vacuolas grandes con depósitos de contenido electrodenso localizados junto al tonoplasto y vacuolas más pequeñas con contenido fibrilar claro (Fig. 18 A-F).

Los cuerpos osmofílicos son numerosos en todo el citoplasma y tienen un límite electrodenso en este estado de desarrollo del laticífero. El retículo endoplasmático frecuentemente es ramificado y dilatado, los leucoplastos muestran un estroma fibrilar con almidón y los microtúbulos están dispuestos desordenadamente junto al plasmalema.

5.2.2.4. Laticíferos en plántula

Después de la germinación, el citoplasma del laticífero se observa disperso comparado con el del laticífero en el embrión temprano. El citoplasma tiene pocos ribosomas y cuerpos osmofílicos, el retículo endoplasmático rugoso está disperso entre numerosas vacuolas con el contenido electrodenso esparcido.

El núcleo de forma ovalada presenta un espacio perinuclear dilatado (Fig. 19 K).

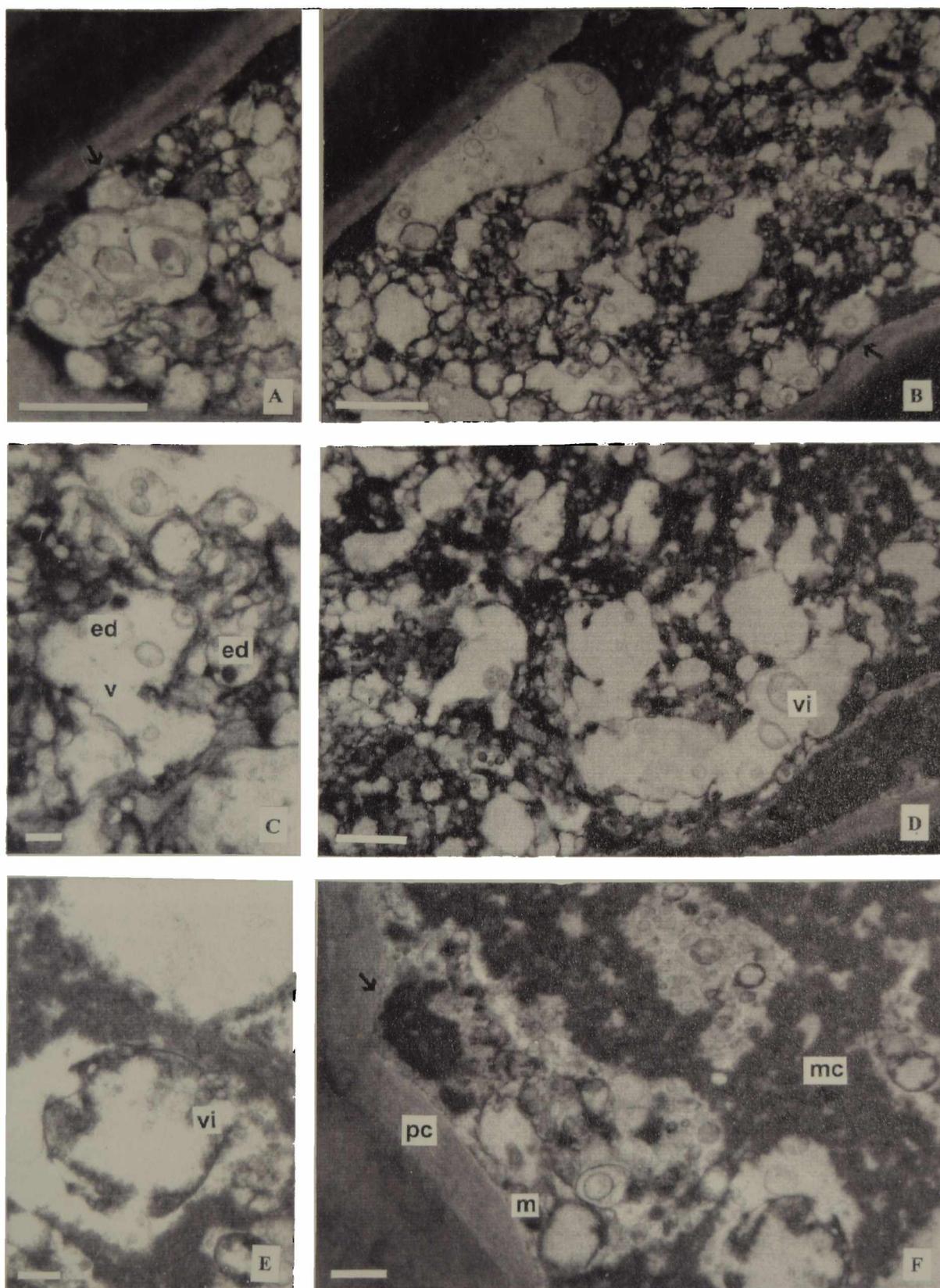


Figura 18. Fotomicrografías de laticíferos con TEM. A-D: *Morrenia brachystephana* Griseb.; E-F: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. A-B: protoplasma denso de laticífero embrional, pared celular (pc); C-D: vacuolas (v) con contenido electrodenso (ed) y vesículas incluidas (vi); E: largas vacuolas con vesículas incluidas (vi) se fusionan con pequeñas vesículas presentes en el citoplasma del laticífero; F: cuerpos densos (mc), pared celular (pc) retículo endoplasmático (→) y mitocondrias (m). Escala = 0,5 μm : A-D, F; 0,05 μm : E.

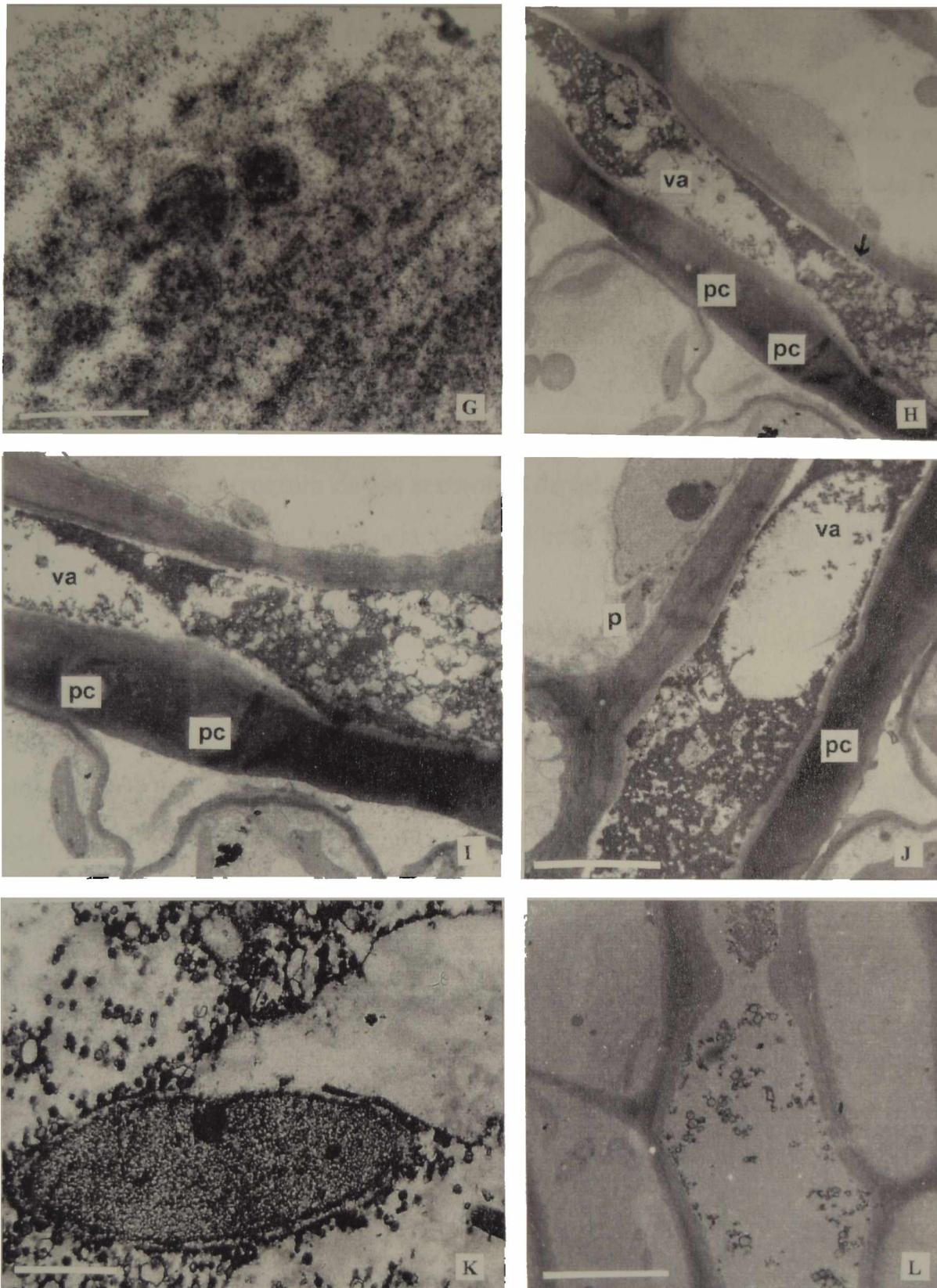


Figura 19. Fotomicrografías de laticíferos con TEM. G-J: *Morrenia brachystephana* Griseb.; K-L: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. G: segmento de laticífero embrional conteniendo cuatro núcleos; H-K: laticíferos en hipocótilo de plántula, vacuola axial (va), pared celular (pc), retículo endoplasmático (→), plastidios (p); K: núcleo con espacio perinuclear dilatado; L: laticífero con látex coagulado. Escala = 8 μm : G, J, L; 5 μm : H-I, K.

5.3. Detección y localización *in situ* de enzimas proteolíticas

La presencia de actividad proteolítica fue detectada en los laticíferos presentes en los tallos tanto de *Morrenia brachystephana* Griseb. como de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley mediante ensayos histoquímicos *in situ*.

Siguiendo la técnica de Denker, sobre la capa de gelatina coloreada con azul de toluidina se observan áreas claras, con tonalidades celestes sobre un fondo oscuro; las mismas son más notables aún en *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley debido posiblemente a la mayor actividad de las enzimas proteolíticas presentes. Dichas zonas permiten establecer una correlación con la estructura de las secciones de tejido nativo utilizado (Fig. 20 A-D), lo que nos permite corroborar la presencia de laticíferos no articulados ramificados, característica observada en los estudios anatómicos previos.

De acuerdo al método de Fratello se observa una digestión progresiva y secuencial de las tres primeras capas coloreadas de gelatina que están superpuestas en la base de nitrocelulosa de la película. Luego de terminada la reacción el film sin digerir aparece de color marrón; la digestión de las capas amarillas produce un color púrpura, mientras que si las capas amarilla y magenta son digeridas el resultado es azul. Si las tres capas de gelatina coloreadas son digeridas el resultado es blanco. En *Morrenia brachystephana* Griseb. son notables las áreas púrpura y azul (Fig. 21 A-C), mientras que en *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley predominan las áreas blancas (Fig. 22 A-C).

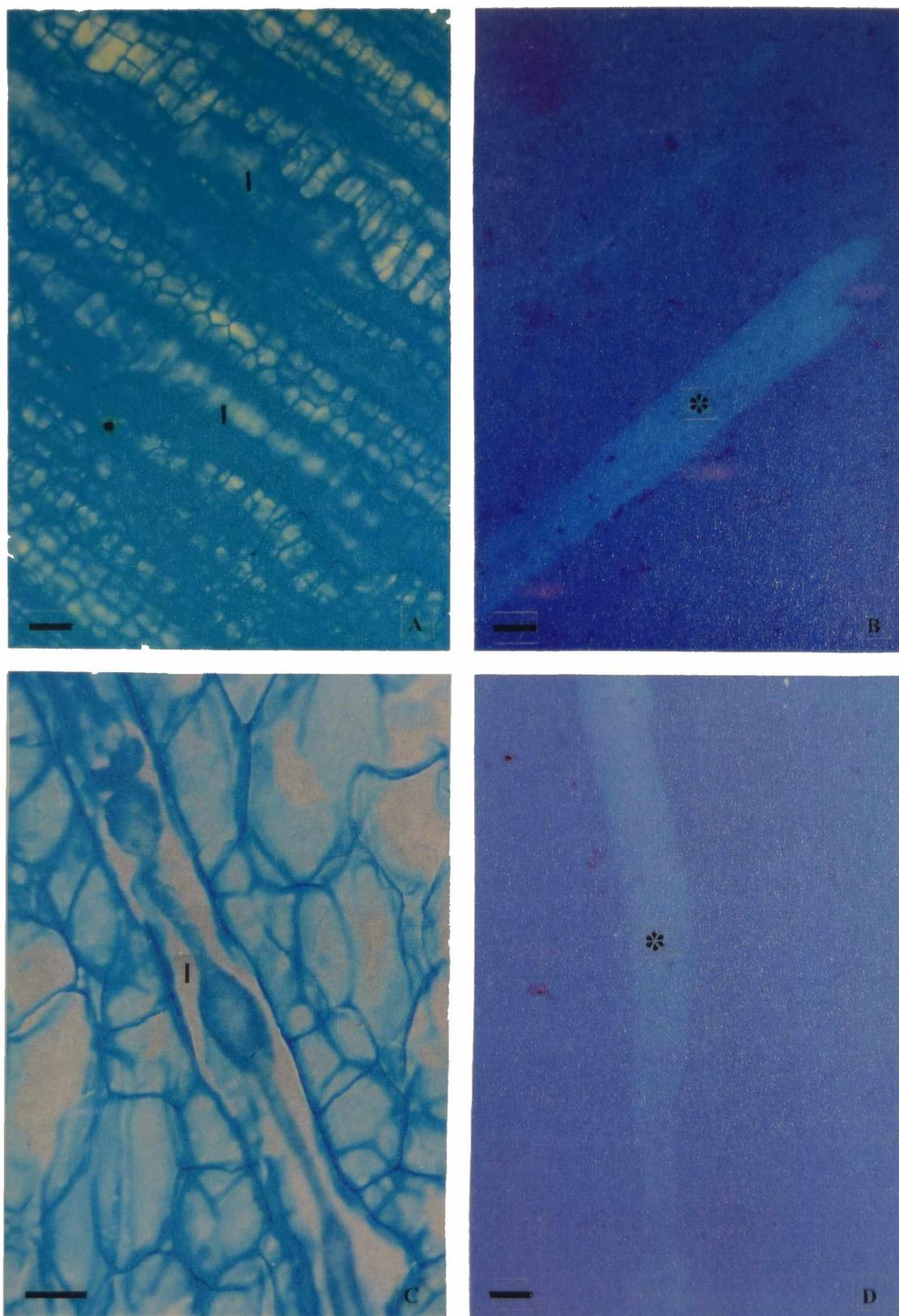


Figura 20. Localización de enzimas proteolíticas según el método de film sustrato de Denker. A-B: *Morrenia brachystephana* Griseb.; C-D: *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. A, C: secciones transversales de tallo; B-D: film de gelatina coloreado. l: laticífero; * : área de alta actividad proteolítica. Escala = 25 μm : A-D.

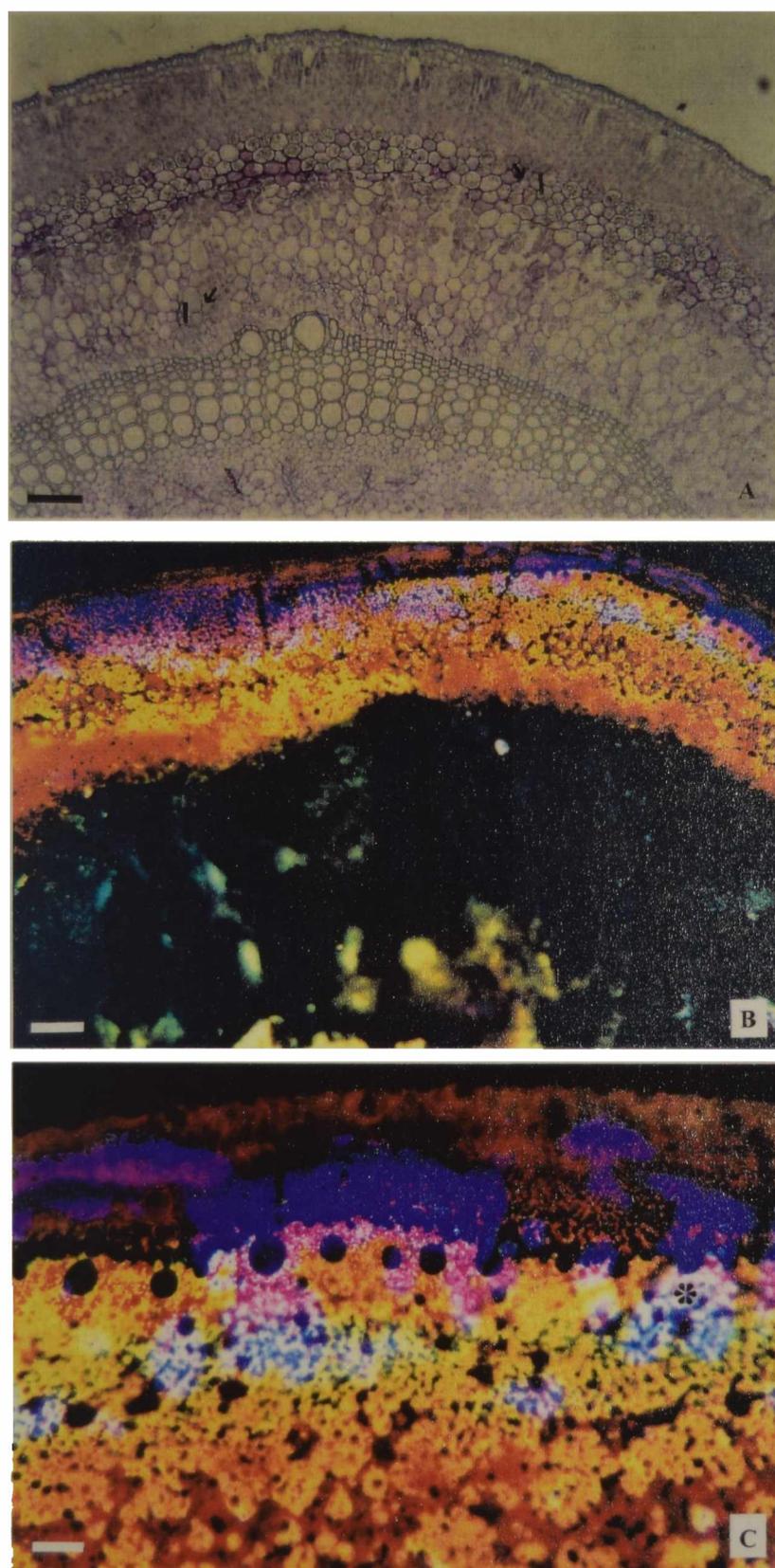


Figura 21. *Morrenia brachystephana* Griseb. Localización de enzimas proteolíticas según el método de film sustrato de Fratello. A: sección transversal de tallo; B-C: film color procesado no expuesto. l: laticífero; *: área de alta actividad proteolítica. Escala = 100 μ m: A-B; 25 μ m: C.

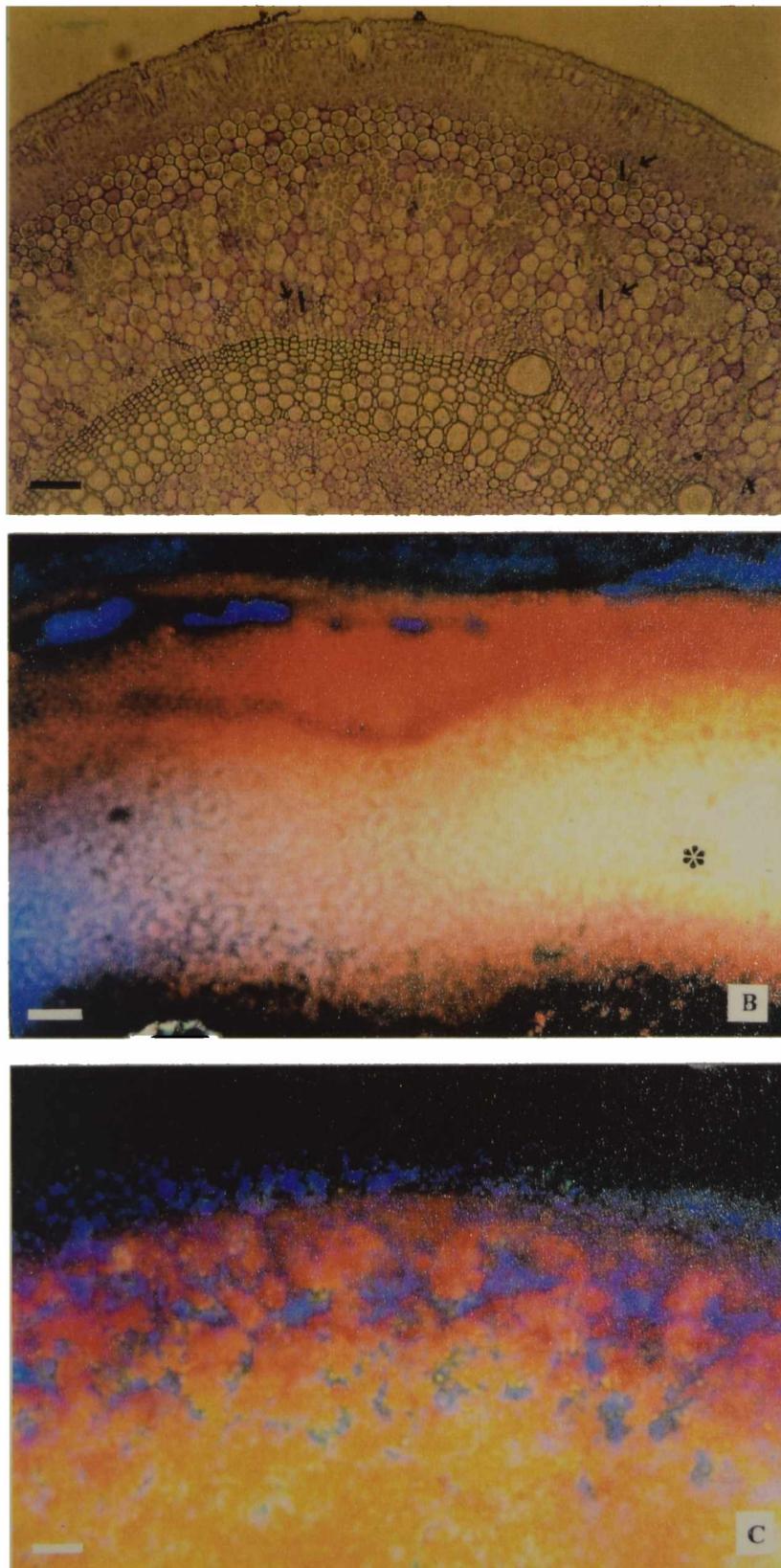


Figura 22. *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. Localización de enzimas proteolíticas según el método de film sustrato de Fratello. A: sección transversal de tallo; B-C: film color procesado no expuesto. l: laticífero; *: área de alta actividad proteolítica. Escala = 100 μm : A-B; 50 μm : C.

ASPECTOS BIOQUÍMICOS

5.4. *MORRENIA BRACHYSTEPHANA* GRISEB.

5.4.1. Obtención del extracto crudo

A partir de incisiones transversales realizadas en tallos y pecíolos se obtuvo un látex semifluido de color blanco lechoso (Fig. 23), a partir del cual se preparó un extracto crudo con elevada actividad proteolítica. A fin de evitar variaciones estacionales en los resultados, las muestras siempre fueron tomadas en el período primavera-verano.



Figura 23. Exudado de látex.

5.4.1.1. Caracterización del extracto crudo

5.4.1.1.1. Acción de activadores e inhibidores

La actividad enzimática del extracto crudo ensayada sobre caseína como sustrato se vio notablemente aumentada por la presencia de cisteína 12 mM en la mezcla de reacción, en tanto que el mismo fue completamente inactivado por incubación durante 10 minutos con Cl_2Hg 1 mM. Esta inhibición fue totalmente revertida por incubación con cisteína 12 mM. En contacto con iodoacetato de sodio 0,01 mM luego de 30 minutos es fuerte e irreversiblemente inhibido. Lo propio ocurre en presencia de E-64 10 μM . Por otra parte, la incubación durante 30 minutos con PMSF 10 mM disminuye la actividad a un 45% del valor inicial; sin embargo la inhibición es parcialmente revertida cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de cisteína 12 mM (Tabla 5).

Los resultados obtenidos sugieren que grupos $-\text{SH}$ deben estar involucrados en el mecanismo catalítico de las proteasas presentes en el extracto crudo, indicando que las mismas pertenecen al tipo de peptidasas cisteínicas.

Inhibidores	Concentración	Actividad residual %	
		10 min	30 min
Ninguno		100,00	100,00
Cloruro mercúrico	0,1 mM	20,00	19,00
Cloruro mercúrico	1 mM	0,00	0,00
Iodoacetato de sodio	0,01 mM	10,90	2,40
Iodoacetato de sodio	0,1 mM	4,60	0,00
E-64	2 μM	14,00	3,30
E-64	8 μM	8,70	3,00
PMSF	10 mM	59,50	45,90
PMSF+cisteína	10 mM+12 mM	65,00	71,20

Tabla 5. Efecto de inhibidores sobre el extracto crudo de *M. brachystephana* Griseb.

5.4.1.1.2. Variación de la actividad caseinolítica con el pH

Con el propósito de conocer el comportamiento del extracto crudo en distintas condiciones de pH se determinó la actividad caseinolítica del mismo en un rango de pH comprendido entre 6,0 y 11,0. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 24.

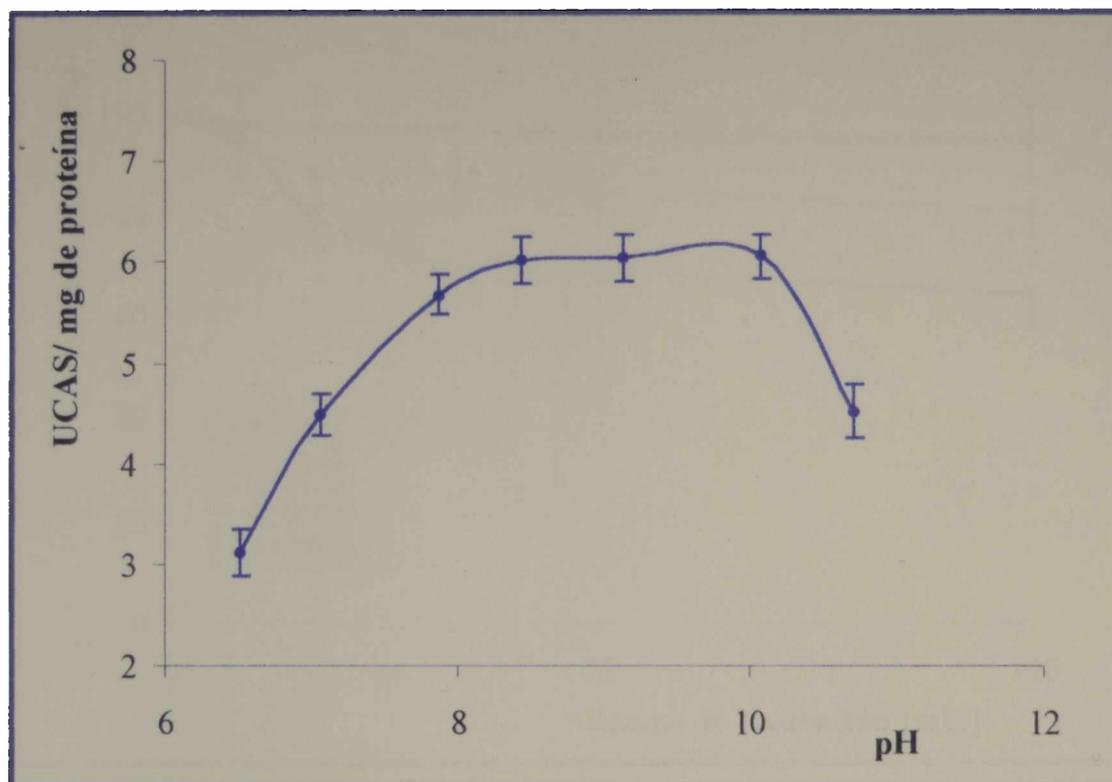


Figura 24. Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica del extracto crudo.

Se observa máxima actividad proteolítica en un rango de pH alcalino (8,0-10,5). Este comportamiento es similar al de otras proteasas de *Asclepiadaceae* estudiadas y en general a las de las proteasas cisteínicas, que se caracterizan por presentar máxima actividad proteolítica a pH alcalino.

5.4.1.1.3. Estabilidad térmica

Se analizó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática del extracto crudo. En la figura 25 puede observarse que la actividad caseinolítica permanece prácticamente inalterada luego de incubar el extracto crudo durante dos horas a 40°C y 50°C,

reteniendo en ambos casos casi el 95 % de la actividad enzimática inicial. Mientras que a 60°C mantiene el 80% de su actividad enzimática, a 70°C pierde solamente un 35% de la misma. Estos valores demuestran que la preparación enzimática cruda de *Morrenia brachystephana* Griseb. es bastante estable con la temperatura.

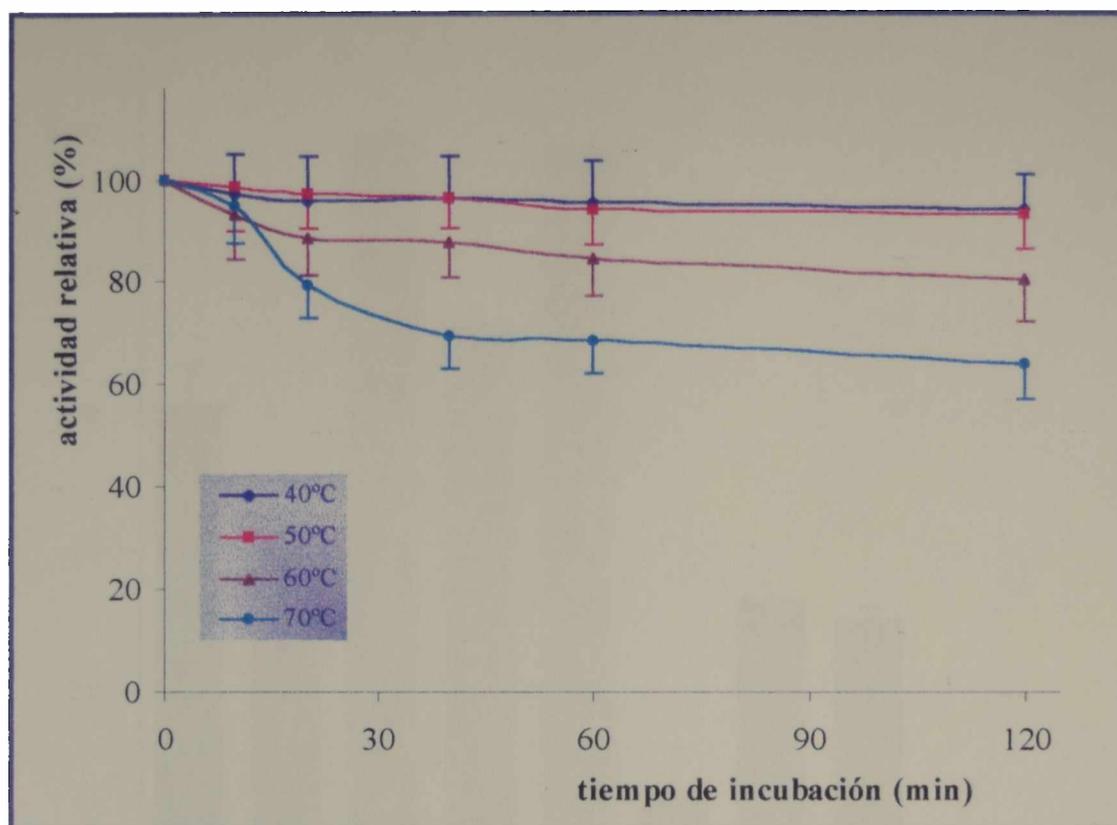


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática del extracto crudo.

5.4.1.1.4. Actividad endoesterásica sobre sustratos sintéticos

Con el objeto de conocer si las proteasas del extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. presentan actividad endoesterásica, se ensayó la actividad del mismo sobre sustratos sintéticos del tipo N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos y se determinaron las preferencias sobre los mismos. Como indican los resultados, los sustratos de máxima especificidad para el extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. son los N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina y lisina (Fig. 26).

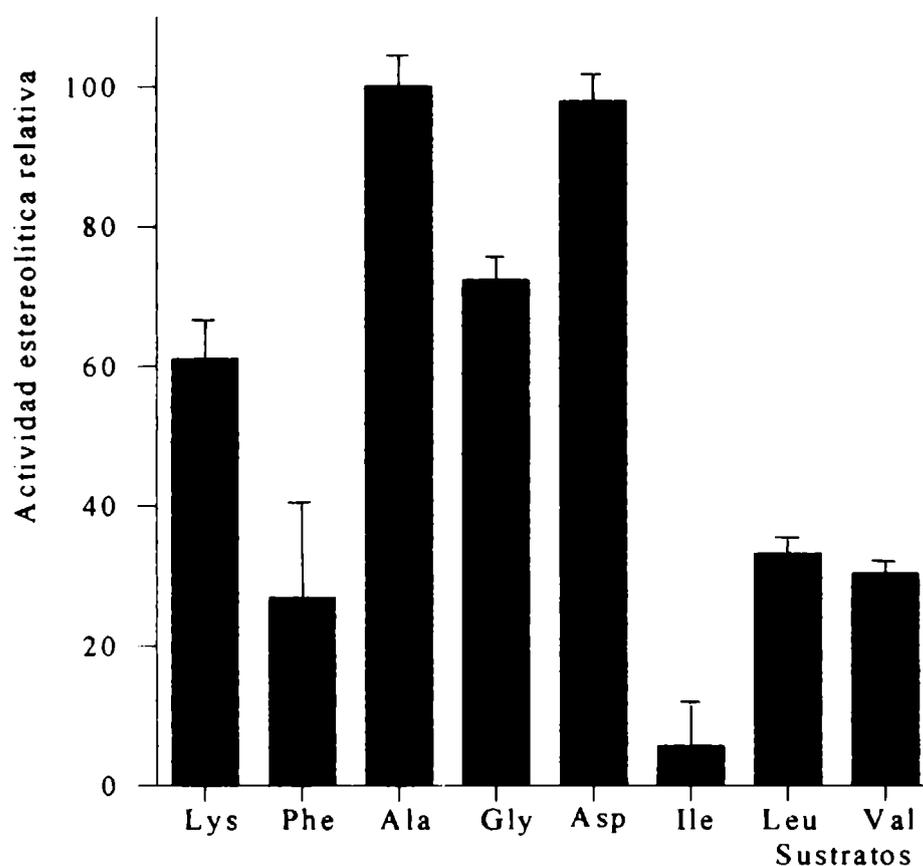


Figura 26. Determinación de la preferencia del extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. por N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos.

5.4.1.1.5. Isoelectroenfoque y zimograma: puntos isoelectrónicos de las proteasas presentes

El extracto crudo fue analizado mediante isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida en un gradiente de pH comprendido entre 3,0 y 10,0. Las proteínas presentes muestran en su mayoría puntos isoelectrónicos elevados, por encima de pH 7,0. En el zimograma

correspondiente a un gel de isoelectroenfoque sin fijar y colorear se observó que las proteasas que se encuentran en el extracto crudo presentan pI mayores que 9,0 (Fig. 27).



Figura 27. Isoelectroenfoque y zimograma del extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. **Calle 1:** patrones de punto isoelectrico (3,5-9,3); **calle 2:** extracto crudo; **calle 3:** zimograma del extracto crudo.

5.4.1.2. Purificación preliminar: fraccionamiento acetónico

El extracto crudo contiene 58,6 mg/ml de azúcares solubles. Los mismos fueron parcialmente eliminados al mezclar un volumen de extracto crudo con un volumen de acetona fría (-20 °C), proceso que remueve también algunas proteínas de baja actividad enzimática. El precipitado obtenido P_I retiene 16,7 mg/ml de azúcares y 132 µg/ml de proteínas con una actividad específica de 1,84 Ucas/mg. La adición de un segundo volumen de acetona al primer sobrenadante (S_I) produce un precipitado P_{II} desprovisto de azúcares y muy rico en

proteínas activas (9,01 Ucas/mg). Cuando un nuevo volumen de acetona se agrega al segundo sobrenadante (S_{II}), se obtiene un tercer precipitado P_{III}, también libre de azúcares solubles, que contiene menos cantidad de proteínas con buena actividad específica (6,46 Ucas/mg) Tabla 6.

Muestra	Azúcares solubles (mg/ml)	Proteínas (µg/ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
Extracto crudo	58,6	664,0	4,70	7,10
P _I	16,7	132,0	0,24	1,84
P _{II}	0	360,0	3,24	9,01
P _{III}	0	126,5	0,82	6,46

Tabla 6. Precipitación acetónica fraccionada del extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb.

Sobre la base de los datos precedentes se decidió utilizar el fraccionamiento acetónico como una primera etapa de purificación, siendo los mejores resultados los obtenidos por adición de un volumen de acetona fría a un volumen de extracto crudo, descartando el precipitado obtenido que contiene un 20% de proteínas con solamente 5,1% de actividad y luego adicionando 2 volúmenes de acetona al sobrenadante remanente. Esto produce una preparación parcialmente purificada denominada “precipitado acetónico” desprovisto de azúcares solubles y conteniendo 78,5 % de proteínas que retienen el 83% de actividad proteolítica (Tablas 6 y 7).

5.4.1.3. Purificación cromatográfica: intercambio iónico

La aplicación de la técnica de isoelectroenfoque (IEF) y de su respectivo zimograma al extracto crudo mostró que la mayoría de las fracciones proteolíticas se localizan cerca del cátodo (Fig. 27), evidenciando de este modo su naturaleza básica. Esta información fue de suma utilidad para decidir la siguiente etapa de purificación. La misma consistió en una cromatografía de intercambio catiónico sobre una columna de CM-Sepharose CL-6B Fast

Flow, equilibrada con buffer cítrico fosfato 55 mM de pH 6,4. Luego de sembrar la muestra, mediante el pasaje de un volumen de columna de buffer de partida se logra eluir una fracción proteica inactiva no retenida por el intercambiador catiónico.

Mediante la posterior aplicación de un gradiente lineal de ClNa entre 0,3 y 0,7 M se obtienen dos fracciones proteicas caseinolíticamente activas (I y II). La primera de ellas eluye a una concentración de ClNa 0,38 M y la segunda lo hace a 0,43 M (Fig. 28).

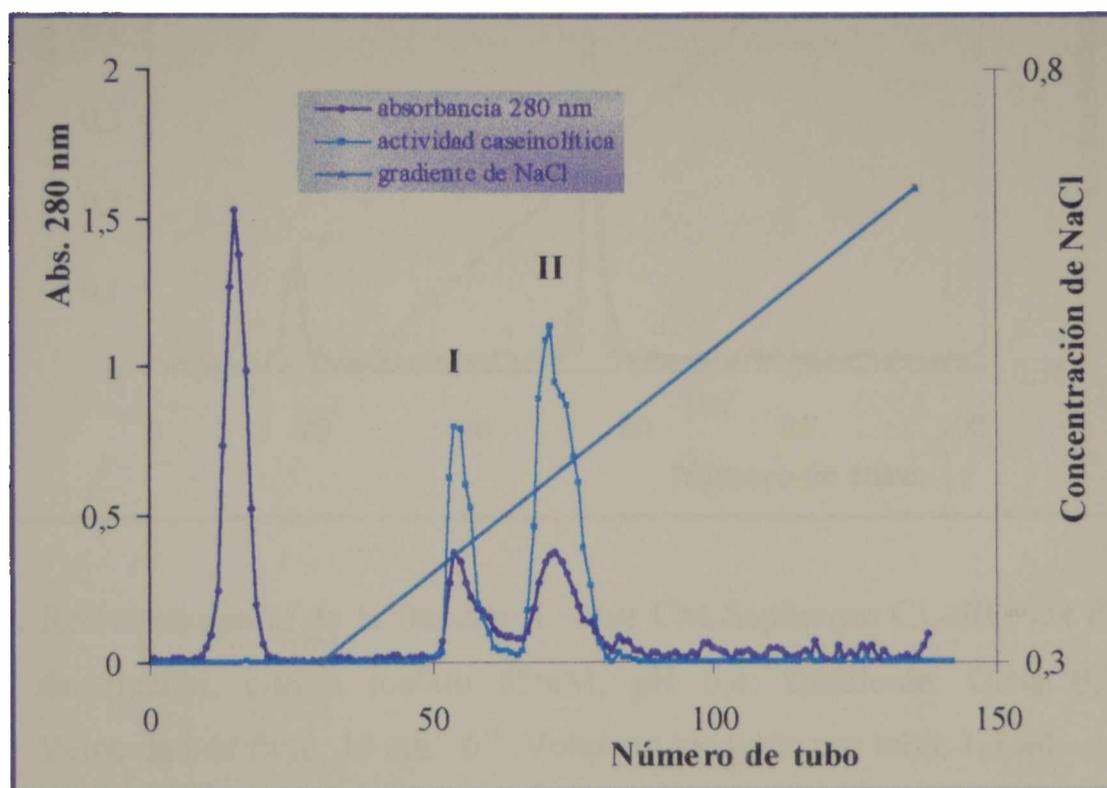


Figura 28. Cromatografía de intercambio sobre CM-Sepharose CL-6B Fast Flow del precipitado acetónico redisuelto. Buffer de elución: cítrico-fosfato 55 mM, pH 6,4. Gradiente: ClNa 0,3-0,7 M. Velocidad de flujo: $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Volumen recogido por tubo: 1,5 ml.

La fracción I no resultó homogénea por posteriores ensayos de electroforesis, por lo que se decidió recurrir a un posterior proceso de recromatografía utilizando las mismas condiciones anteriores pero con un gradiente lineal comprendido entre 0,35 M y 0,45 M de ClNa.

De este modo se logra obtener una fracción no retenida sin actividad enzimática y una

fracción activa (I) que eluye a una concentración 0,37 M de ClNa (Fig. 29) y que resulta homogénea por electroforesis a la que se denomina morrenaina b I.

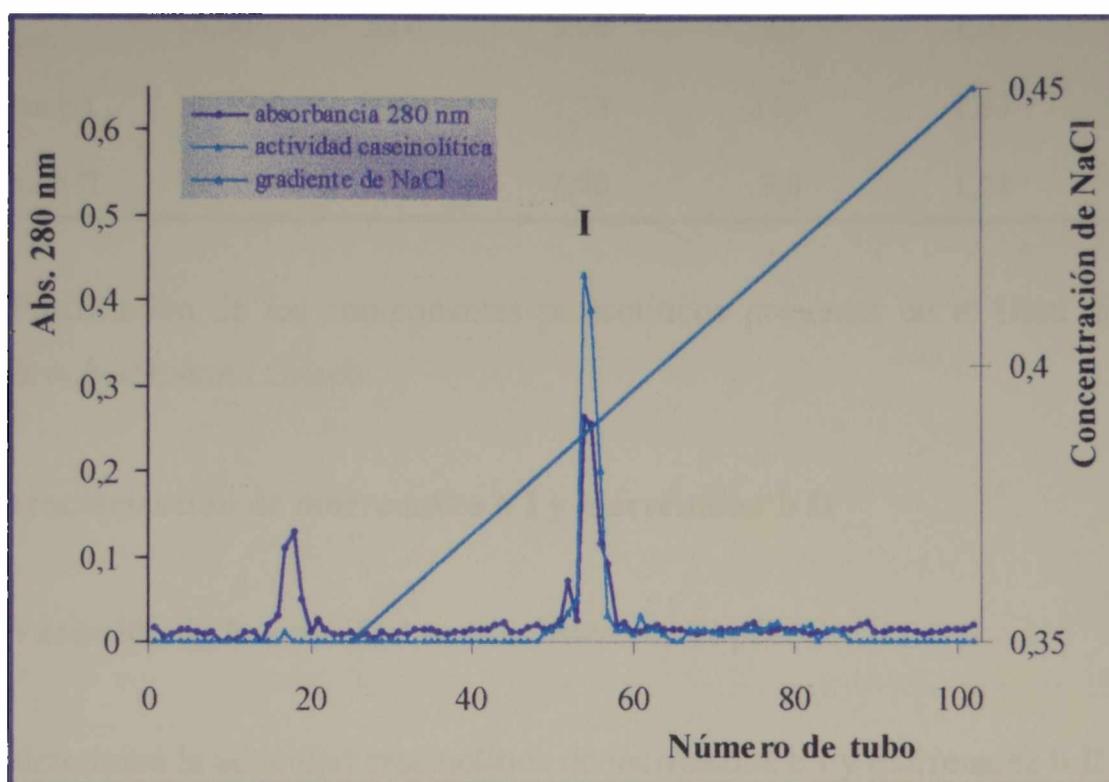


Figura 29. Recromatografía de la fracción I sobre CM-Sepharose CL-6B Fast Flow. Buffer de elución: citrico fosfato 55mM, pH 6,4. Gradiente: ClNa 0,35-0,45 M. Velocidad de flujo: $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Volumen recogido por tubo: 1,5 ml.

En consecuencia, como resultado de esta purificación cromatográfica a partir del látex de *Morrenia brachystephana* Griseb. se obtienen 2 fracciones proteicas con actividad caseinolítica a las que se denominan morrenaina b I y morrenaina b II.

5.4.1.4. Esquema de purificación

El esquema de purificación (Tabla 7) muestra que morrenaina b II fue la principal fracción proteolítica purificada con un rendimiento de 40,4%, aunque morrenaina b I también muestra una significativa actividad con un rendimiento de 28,3%. Sin embargo, el grado de purificación de ambas proteasas es aparentemente bajo: 1,24 y 1,53 veces, respectivamente.

Muestra	Azúcares solubles (µg/ml)	Proteínas (µg/ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	58,60	664	4,70	7,1	1,00	100,0
Precipitado acetónico	16,00	521	3,90	7,5	1,05	83,0
Morrenaina b I		122	1,33	10,9	1,53	28,3
Morrenaina b II		215	1,90	8,8	1,24	40,4

Tabla 7. Purificación de los componentes proteolíticos presentes en el látex de *Morrenia brachystephana* Griseb.

5.4.1.5. Caracterización de morrenaina b I y morrenaina b II

5.4.1.5.1. Variación de la actividad caseinolítica con el pH

Se determinó la actividad caseinolítica de morrenaina b I y morrenaina b II en el rango de pH comprendido entre 6,0 y 11,0.

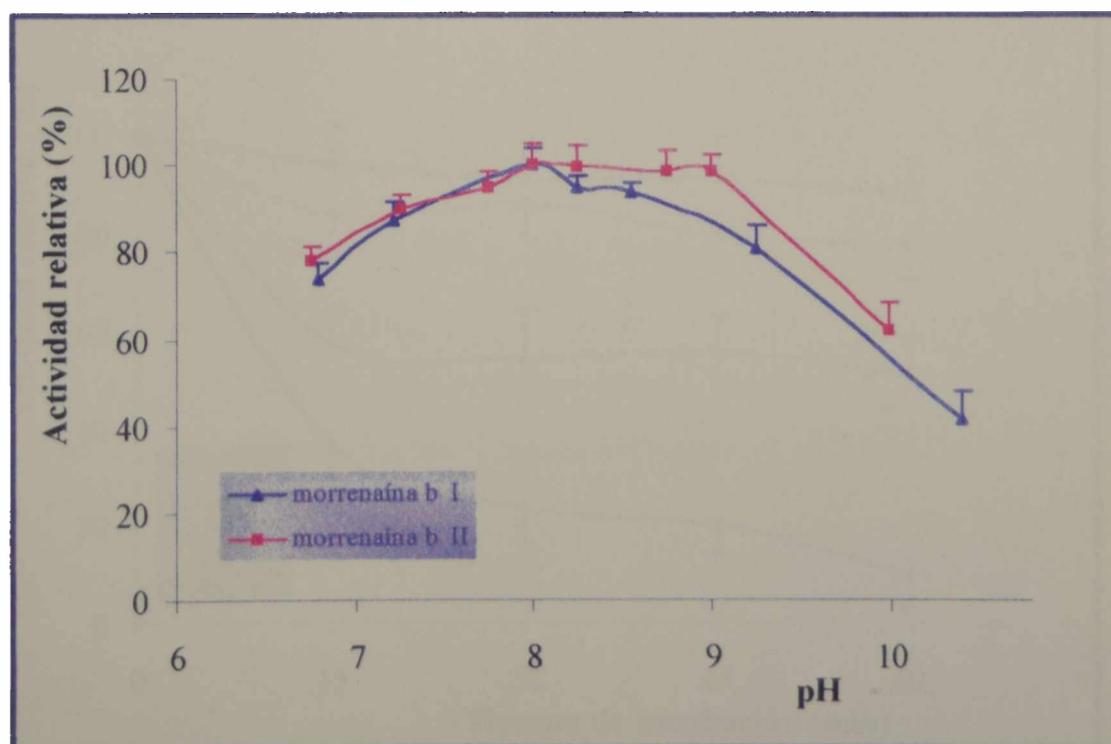


Figura 30. Perfil de actividad caseinolítica con el pH de morrenaina b I y b II.

Como puede apreciarse en la figura 30 los resultados indican, para ambas proteasas, máxima actividad proteolítica en un rango de pH alcalino (7,5-9,5); si bien morrenáina b II prácticamente no varía su actividad caseinolítica en este rango de pH, morrenáina b I pierde un 20% de su capacidad proteolítica a pH 9,0. El comportamiento de estas proteasas concuerda con el de otras proteasas de *Asclepiadaceae* previamente estudiadas.

5.4.1.5.2. Estabilidad térmica

En los gráficos presentados en las figuras 31 y 32 puede observarse el efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de morrenáina b I y morrenáina b II.

Las variaciones en la actividad caseinolítica que se registran luego de someter las proteasas a distintas temperaturas a lo largo del tiempo, indican que morrenáina b II es estable con la temperatura, conservando aún un 80% de actividad caseinolítica residual luego de permanecer 60 min a 70°C. En tanto que, morrenáina b I es mucho menos estable con la temperatura, manteniendo solamente un 15% de la actividad caseinolítica inicial después de ser sometida 60 min a 70°C.

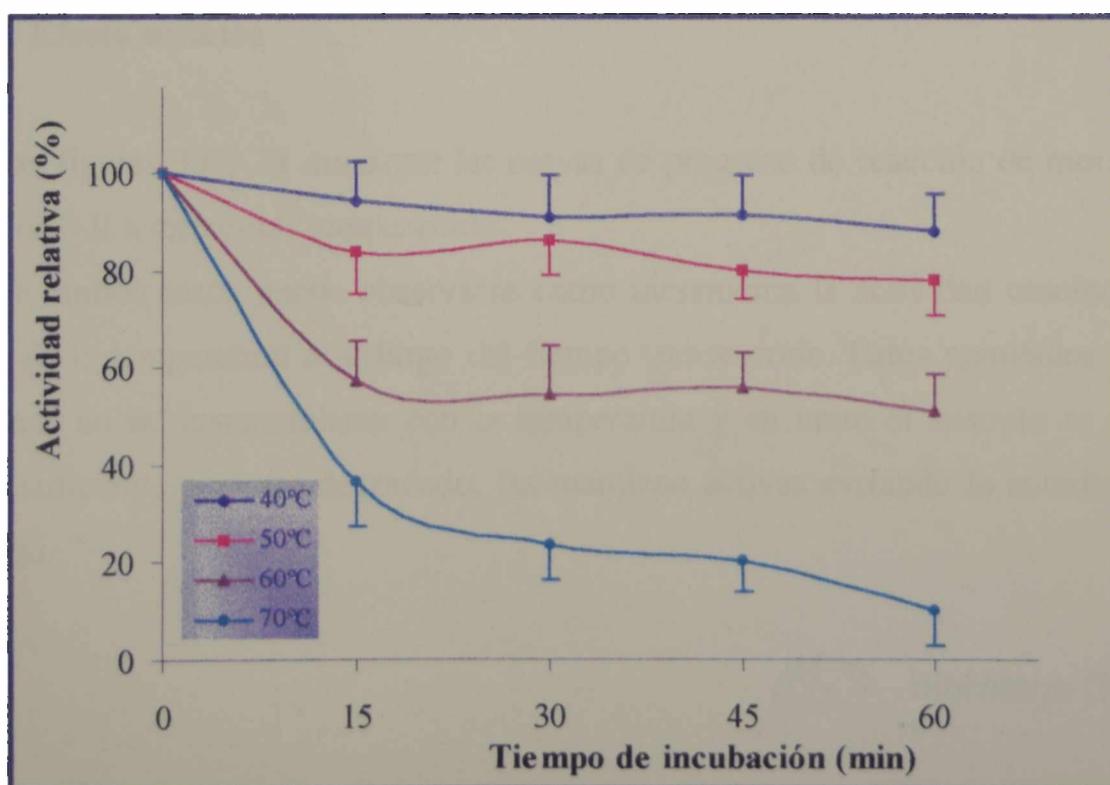


Figura 31. Estabilidad térmica de morrenáina b I.

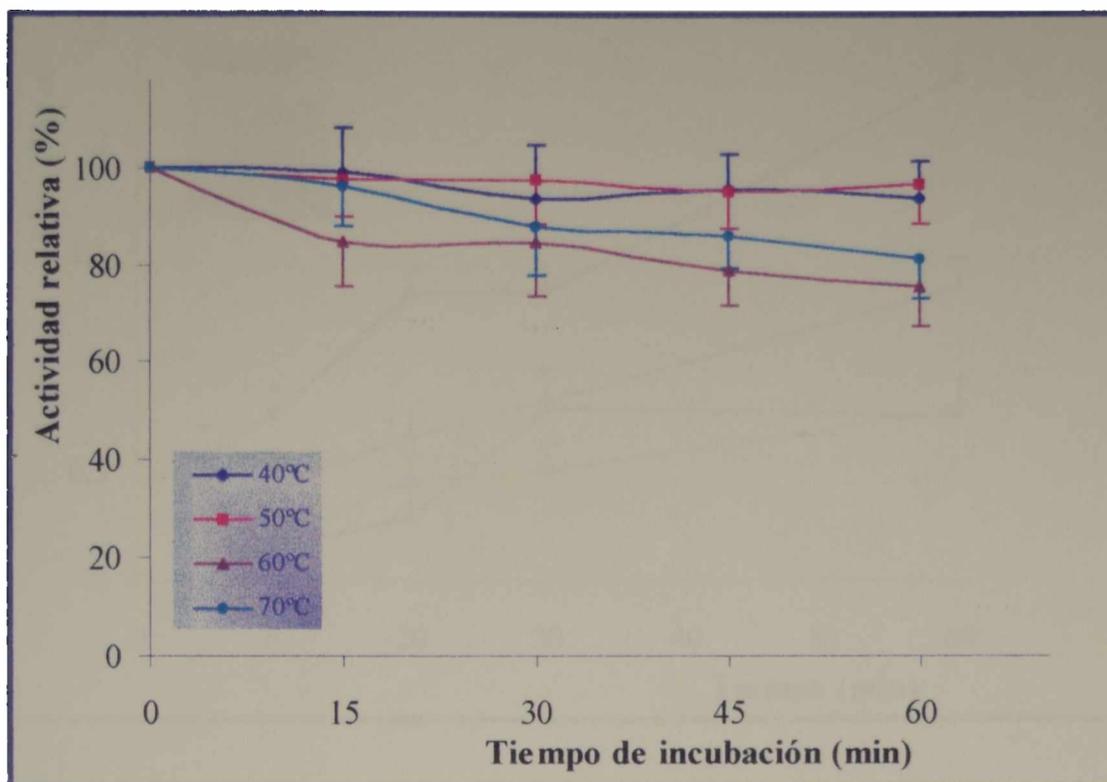


Figura 32. Estabilidad térmica de morrenaina b II.

5.4.1.5.3. Efecto térmico

Las figuras 33 y 34 muestran las curvas de progreso de reacción de morrenaina b I y morrenaina b II a diferentes temperaturas.

En ambos casos puede observarse como incrementa la actividad caseinolítica con el aumento de la temperatura a lo largo del tiempo transcurrido. Estos resultados sugieren que las enzimas no se desnaturalizan con la temperatura y en tanto el sustrato se encuentre en cantidad suficiente para ser degradado, las mantiene activas evitando la autodegradación de las mismas.



Biblioteca Central

F:

C:

100-56985

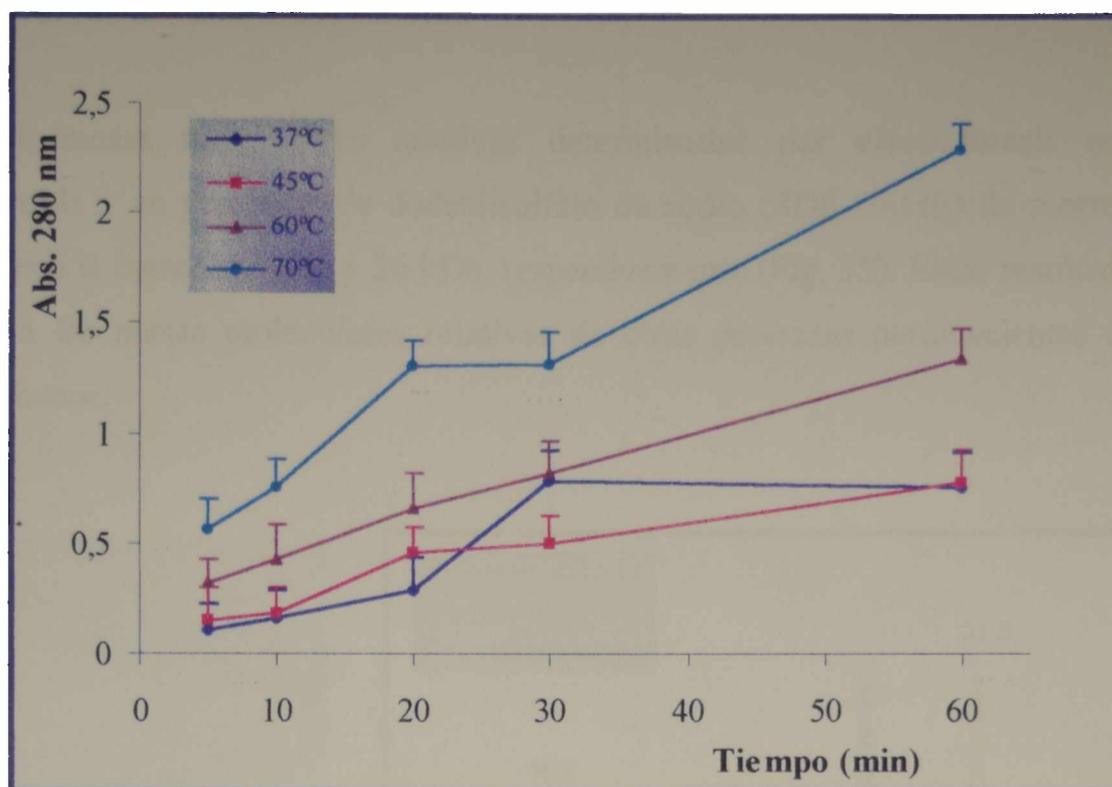


Figura 33. Efecto térmico sobre morrenaina b I.

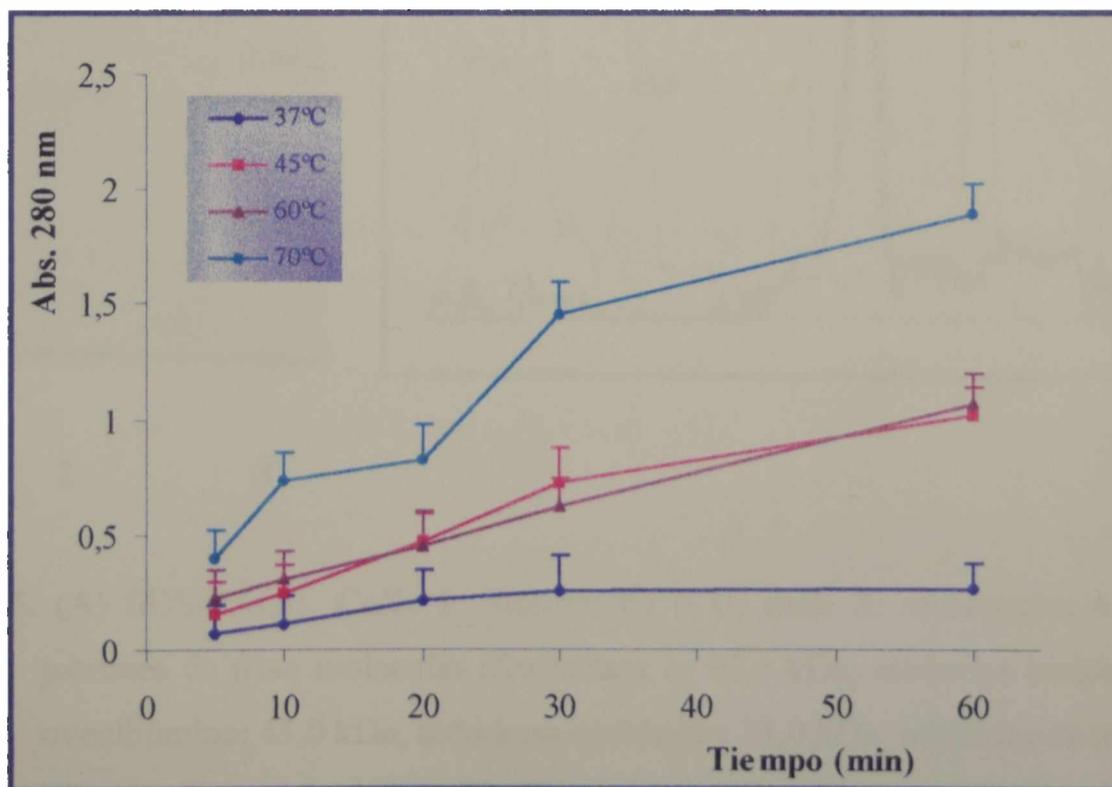


Figura 34. Efecto térmico sobre morrenaina b II.

5.4.1.5.4. Masas moleculares relativas

Las masas moleculares relativas determinadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de morrenáina b I y morrenáina b II fueron de 25,5 y 26 kDa, respectivamente (Fig. 35). Estos resultados son muy similares a las masas moleculares relativas de otras proteasas pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae*.

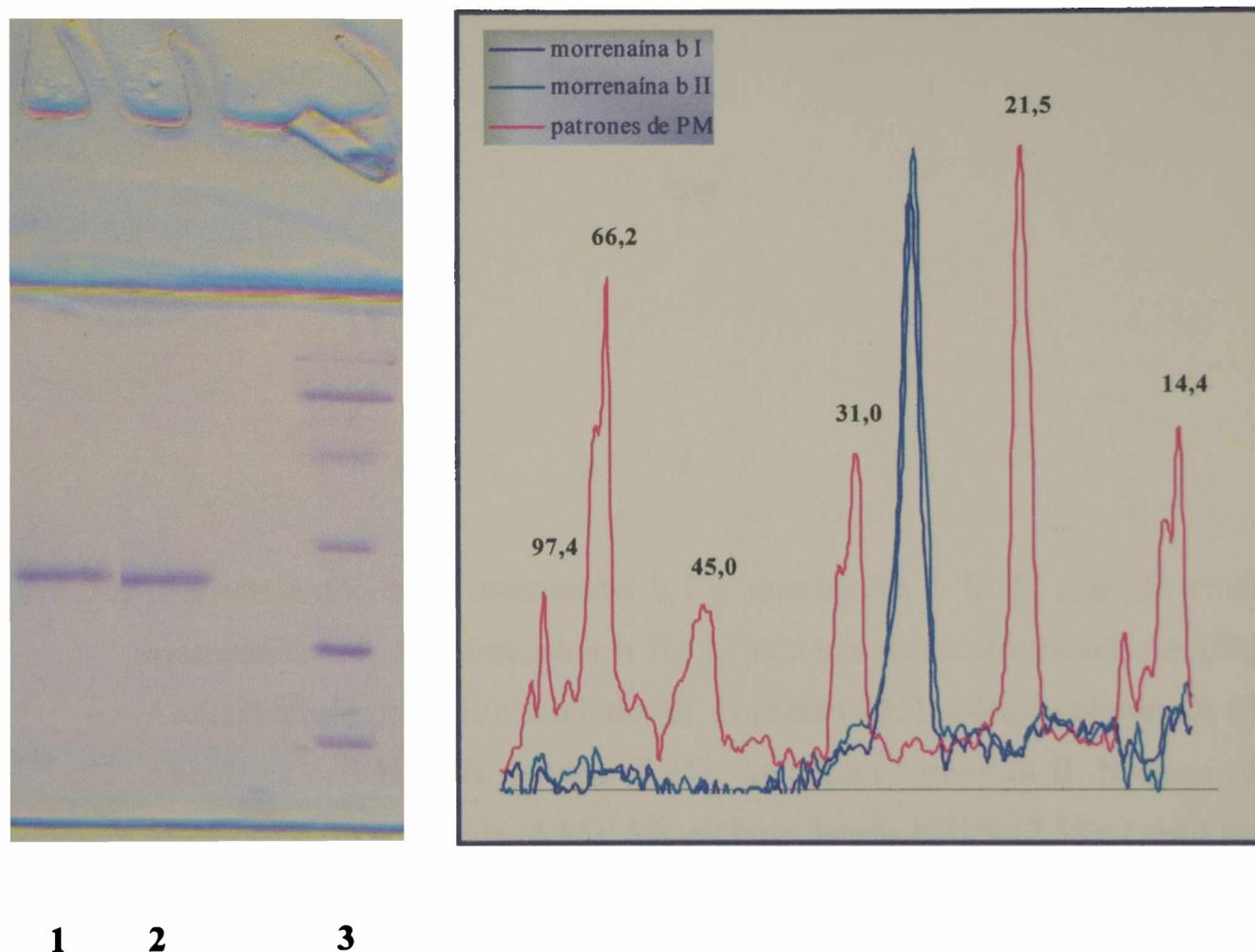


Figura 35. (A) SDS-PAGE. **Calle 1:** morrenáina b II; **calle 2:** morrenáina b I; **calle 3:** patrones de peso molecular (fosforilasa b: 97,4 kDa; albúmina sérica: 66,2 kDa; ovoalbúmina: 45,0 kDa; anhidrasa carbónica: 31,0 kDa; inhibidor de tripsina: 21,5 kDa; lisozima: 14,4 kDa). (B) Densitograma de SDS-PAGE de morrenáina b I y morrenáina b II.

5.4.1.5.5. Puntos isoeléctricos

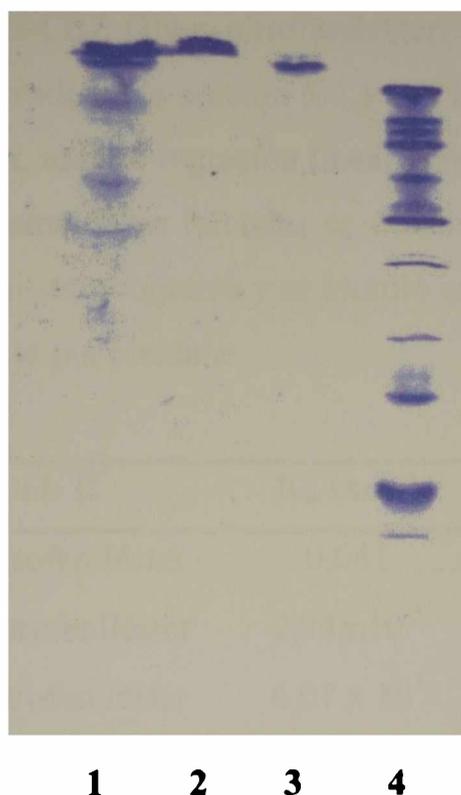


Figura 36. Isoelectroenfoque de morrenina b I y morrenina b II. 1: extracto crudo; 2: morrenina b I; 3: morrenina b II; 4: patrones de isoelectroenfoque (Sigma), Amiloglucosidasa (3,50); Inhibidor de Tripsina (4,55); β -lactoglobulina A (5,20); Anhidrasa carbónica B, bovina (5,85); Anhidrasa carbónica B, humana (6,55); Mioglobina, banda ácida (6,85); Mioglobina, banda básica (7,35); Lentil lectina, ácida (8,15); Lentil lectina, media (8,45); Lentil lectina, básica (8,65); Tripsinógeno (9,30).

Mediante el análisis por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con gradiente de pH 3,0-10,0 puede observarse que tanto morrenina b I como morrenina b II presentan valores de pI superiores a 9,3.

5.4.1.5.6. Parámetros cinéticos de morrenáina b II: K_m y k_{cat}

Para las determinaciones de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} se seleccionaron morrenáina b II y los sustratos sintéticos N- α -CBZ-Ala-*p*-nitrofeniléster, N- α -CBZ-Asp-*p*-nitrofeniléster y N- α -CBZ-Gly-*p*-nitrofeniléster, teniendo en cuenta el comportamiento del extracto crudo observado en la sección 5.4.1.1.4. El análisis de los resultados se realizó con el programa Sigma Plot, usando regresión lineal para el cálculo de las velocidades iniciales. Una vez conocidas las velocidades iniciales se determinaron los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} , para esto se usó el mismo programa y se asumió que la cinética sigue el mecanismo del estado estacionario propuesto por Haldane.

Morrenáina b II	K_m (mM)	k_{cat} (seg ⁻¹)	k_{cat}/K_m (seg ⁻¹ M ⁻¹)
N- α -CBZ-Ala- <i>p</i> -nitrofeniléster	0,041	6,6	$1,6 \times 10^5$
N- α -CBZ-Asp- <i>p</i> -nitrofeniléster	$2,34 \times 10^{-3}$	0,961	$4,1 \times 10^2$
N- α -CBZ-Gly- <i>p</i> -nitrofeniléster	$4,07 \times 10^3$	$3,46 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$

Tabla 8. Parámetros cinéticos de morrenáina bII sobre N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos.

5.4.1.5.7. Estabilidad de morrenáina b II en solventes orgánicos

Considerando que las enzimas en estudio podrían ser aplicadas en biotransformaciones en medios no acuosos, resulta indispensable como parte de su caracterización conocer la estabilidad en estos medios. La preparación enzimática pura disuelta en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 que corresponde al pH de óptima actividad caseinolítica, se mezcló con el solvente (N,N-dimetilformamida, cloroformo ó n-heptano) en proporciones distintas, dependiendo del solvente utilizado.

5.4.1.5.7.1. Estabilidad de morrenaína b II en sistemas monofásicos

La estabilidad de la enzima en N,N-dimetilformamida al 30 % se observa en la figura 37. Como puede apreciarse morrenaína b II es sumamente estable, manteniendo un 84% de la actividad caseinolítica luego de permanecer 60 minutos en un medio conteniendo 30% de N,N-dimetilformamida.

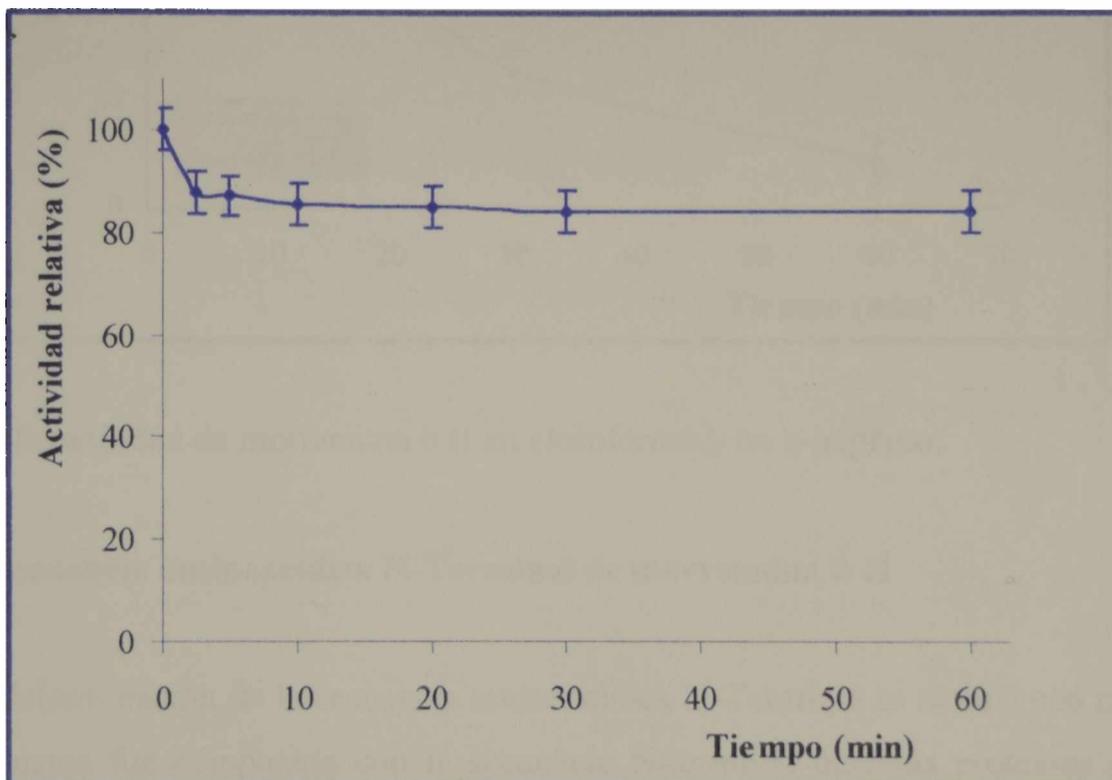


Figura 37. Estabilidad de morrenaína b II en N,N-dimetilformamida.

5.4.1.5.7.2. Estabilidad de morrenaína b II en sistemas bifásicos al 50%

La estabilidad de la enzima en medios heterogéneos conteniendo cloroformo y n-heptano se muestra en la figura 38. La proteasa manifiesta un comportamiento diferencial; frente al n-heptano resulta estable reteniendo un 68 % de la actividad inicial luego de una hora, en tanto que es muy inestable en presencia de cloroformo, ya que pierde un 90% de actividad en el mismo tiempo.

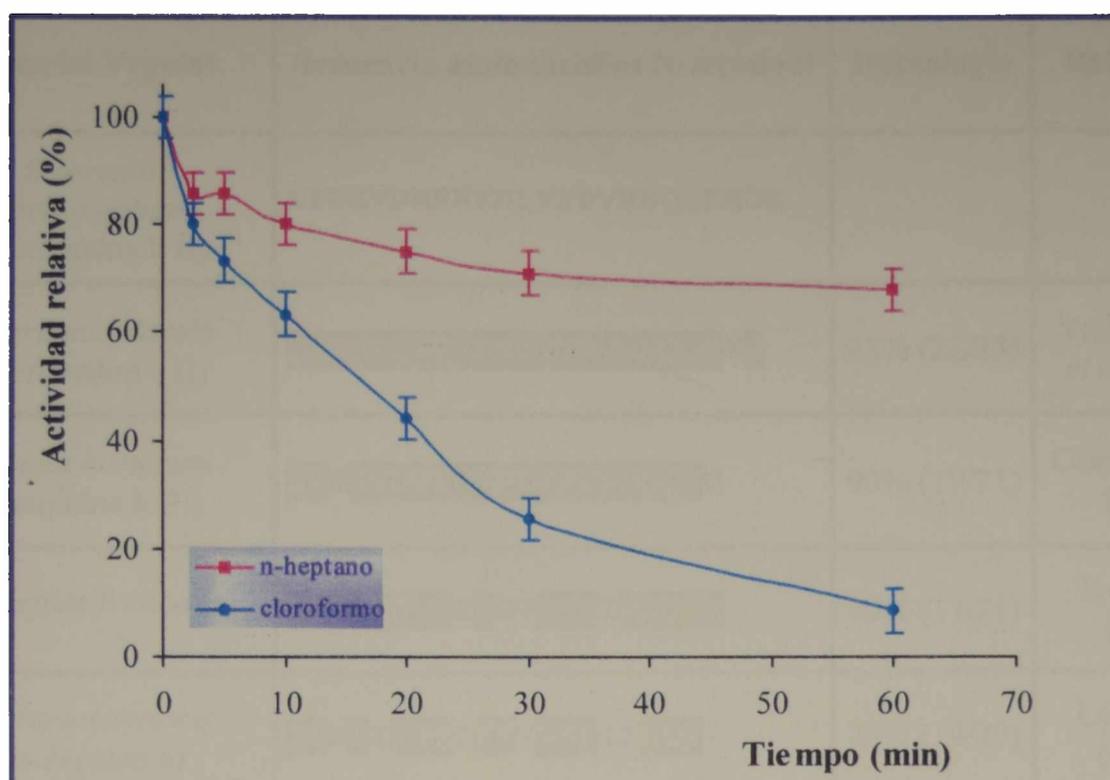


Figura 38. Estabilidad de morrenaína b II en cloroformo y en n-heptano.

5.4.1.5.8. Secuencia aminoacídica N-Terminal de morrenaína b II

La determinación de la secuencia aminoacídica N-Terminal se realizó con morrenaína b II y la misma fue comparada con la secuencia N-terminal de otras proteasas cisteínicas (Tabla 9).

Material Vegetal	Secuencia aminoacídica N-terminal	Homología	Referencias
<i>Morrenia brachystephana</i> (morrenaina b II)	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKGG		
<i>Morrenia odorata</i> (morrenaina o II)	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKGG	95% (22/23)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2000)
<i>Araujia hortorum</i> (araujiaina h III)	LPESVDWRKKNLVFPVRNQGQ	90% (19/21)	Obregón <i>et al.</i> (2001)
<i>Asclepias fruticosa</i>	LPDSVDWREKGVVFPVRNQGK	80% (17/21)	Trejo <i>et al.</i> (2000)
<i>Asclepias syriaca</i> (asclepaina a)	LPNSIDWRQKNVVFPIKNOG	70% (14/20)	Lynn <i>et al.</i> (1980b)
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSVDRKKGAVSPVKNQGG	69% (16/23)	Ye & Varner (1993)
<i>Asclepias syriaca</i> (asclepaina b)	LPNEVDWRKNGVVFPVRNQGQ	66% (14/21)	Lynn <i>et al.</i> (1980b)
<i>Carica papaya</i> (caricaina)	LPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCG	65% (15/23)	Dubois <i>et al.</i> (1988)
<i>Oryza sativa</i>	LPESVDWREKGAVALPVKNQGG	65% (15/23)	Watanabe <i>et al.</i> (1991)
<i>Carica candamarcensis</i> (proteasa cisteínica III)	PESIDWRKKGAVTPVKNQGSXG	63% (14/22)	Walreavens <i>et al.</i> (1993)
<i>Carica papaya</i> (papaina)	IPEYVDWRQKGAVALPVKNQG	60% (12/20)	Mitchel <i>et al.</i> (1970)
<i>Araujia hortorum</i> (araujiaina h II)	VPDSIDWREKDAVLPVRNQGQXG	60% (14/23)	Obregón <i>et al.</i> (2001)

Tabla 9. Comparación de la secuencia N-Terminal de morrenaina b II con otras endopetidases vegetales.

5.5. MORRENIA ODORATA (HOOK. ET ARN.) LINDLEY

5.5.1. Obtención del extracto crudo

Mediante incisiones transversales realizadas en tallos y pecíolos se obtuvo un látex semifluido de color blanco lechoso (Fig. 39) a partir del cual se preparó un extracto crudo con elevada actividad proteolítica. Las muestras fueron tomadas en el período primavera-verano a fin de evitar variaciones estacionales en los resultados.



Figura 39. Exudado de látex.

5.5.1.1. Caracterización del extracto crudo

5.5.1.1.1. Acción de activadores e inhibidores

La actividad caseinolítica del extracto crudo ensayada en presencia de cisteína 12 mM en la mezcla de reacción se incrementó notoriamente. Por otra parte la inhibición de la actividad enzimática del extracto crudo mediante la incubación del mismo durante 10 minutos con Cl_2Hg 1 mM fue total, aunque también fue totalmente revertida por incubación con cisteína 12 mM. Por su parte, el iodoacetato 0,01 mM inhibe irreversiblemente el 95 % de la actividad enzimática original luego de 30 minutos de incubación. Lo propio ocurre en presencia de E-64 10 μM . Mientras que la incubación durante 30 minutos con PMSF 10 mM disminuye la actividad a un 46% del valor inicial, la inhibición es parcialmente revertida cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de cisteína 12 mM (Tabla 10).

Estos resultados sugieren que grupos $-\text{SH}$ estarían comprometidos en el mecanismo catalítico de las proteasas presentes en el extracto crudo, lo que indicaría que las mismas pertenecen al tipo de peptidasas cisteínicas.

Inhibidores	Concentración	Actividad residual %	
		10 min	30 min
Ninguno		100,0	100,0
Cloruro mercúrico	0,1 mM	19,0	10,5
Cloruro mercúrico	1 mM	1,5	0,8
Iodoacetato de sodio	0,01 mM	10,7	4,8
Iodoacetato de sodio	0,1 mM	3,0	1,1
E-64	2 μM	40,0	39,7
E-64	8 μM	3,3	1,0
PMSF	10 mM	48,0	46,2
PMSF+cisteína	10 mM+12mM	59,3	63,2

Tabla 10. Efecto de inhibidores sobre el extracto crudo de *M. odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.

5.5.1.1.2. Variación de la actividad caseinolítica con el pH

A fin de conocer como se comporta el extracto crudo en distintas condiciones de pH, se ensayó la actividad caseinolítica del mismo en un rango de pH comprendido entre 6,0 y 11,0. Los resultados obtenidos se observan en la figura 40.

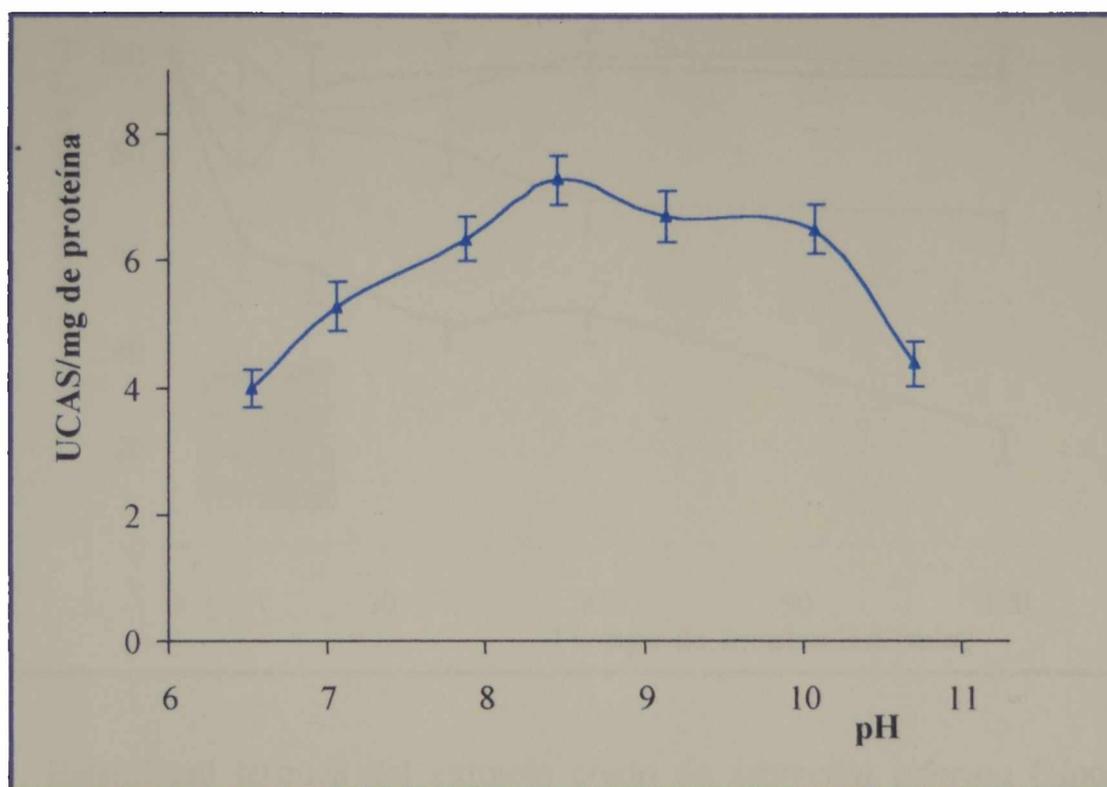


Figura 40. Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica del extracto crudo.

Al igual que el extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb., el de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley manifiesta su mayor actividad enzimática en la zona de pH alcalino (8,0-10,3).

5.5.1.1.3. Estabilidad térmica

La acción de la temperatura sobre la estabilidad enzimática del extracto crudo puede analizarse en la figura 41. La actividad caseinolítica del extracto crudo permanece prácticamente constante luego de dos horas de incubación a 40°C y 50°C, reteniendo el 65 %

de la actividad enzimática inicial a 60°C. En tanto que a 70°C es inestable, ya que a los 40 minutos pierde el 50 % de actividad y a los 120 minutos sólo mantiene un 25% de la actividad caseinolítica inicial.

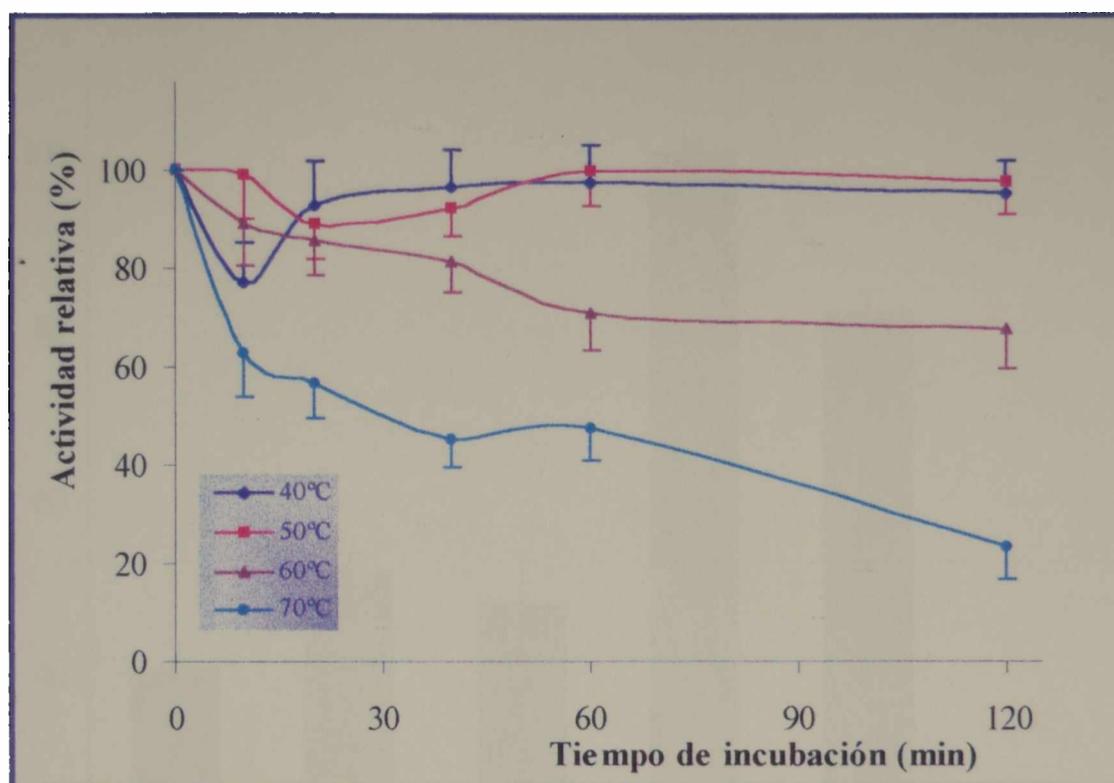


Figura 41. Estabilidad térmica del extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.

5.5.1.1.4. Actividad endoesterásica con sustratos sintéticos

A fin de conocer la actividad endoesterásica de las proteasas presentes en el extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley se ensayó la actividad del mismo sobre sustratos sintéticos del tipo N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos y se determinaron las preferencias sobre los mismos. Como indican los resultados, los sustratos de máxima especificidad para el extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley, en orden decreciente, son los N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos leucina, isoleucina, glicina, tirosina y alanina (Fig. 42).

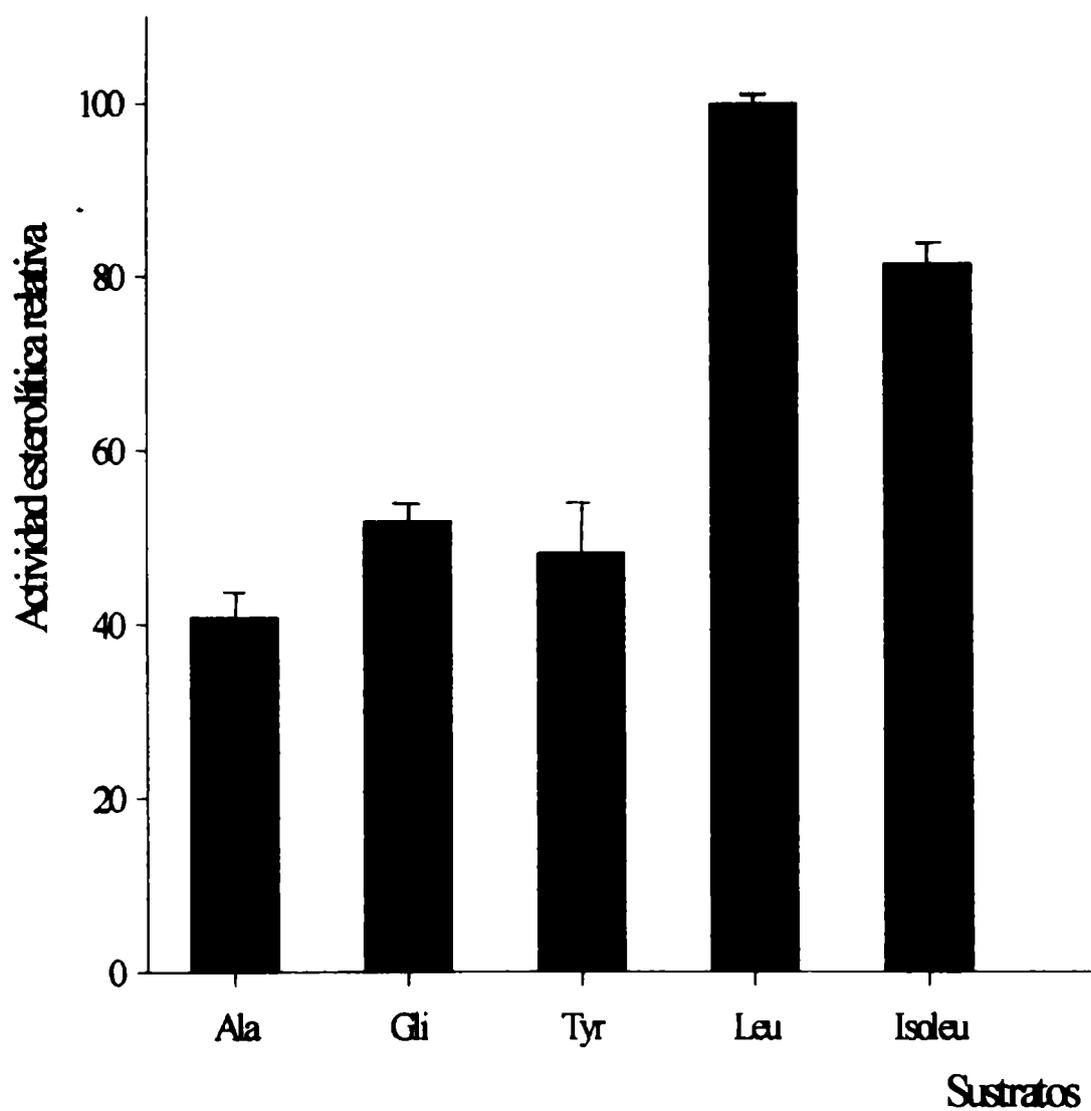


Figura 42. Determinación de la preferencia del extracto crudo de *M. odorata* (Hook. et Arn.) Lindley por N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos.

5.5.1.1.5. Isoelectroenfoque y zimograma: puntos isoeléctricos de las proteasas presentes



Figura 43. Isoelectroenfoque y zimograma del extracto crudo de *Morrenia odorata*. (Hook. et Arn.) Lindley 1: patrones de punto isoeléctrico (3,5-9,3); 2: extracto crudo; 3: zimograma del extracto crudo.

El análisis del extracto crudo mediante isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida y en un gradiente de pH comprendido entre 3,0 y 10,0 muestra que las proteínas en el extracto crudo poseen en su mayoría puntos isoeléctricos elevados, superiores a pH 7,0. Según puede apreciarse en el zimograma correspondiente a un gel de isoelectroenfoque sin fijar y colorear, las proteasas que se encuentran en el extracto crudo presentan pI mayores que 9,3 (Fig.43).

5.5.1.2. Purificación preliminar: fraccionamiento acetónico

El extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley contiene 74,5 mg/ml de azúcares solubles. Al mezclar un volumen del extracto crudo con un volumen de acetona

fría (-20°C) se elimina el 89,3 % de los mismos y se retiene un 30,7 % de proteínas con muy buena actividad enzimática (8,15 Ucas/mg) en el precipitado P_I. La adición de un segundo volumen de acetona al primer sobrenadante (S_I) produce un precipitado P_{II} prácticamente desprovisto de azúcares y muy rico en proteínas activas (11,0 Ucas/mg). Cuando un nuevo volumen de acetona se agrega al segundo sobrenadante (S_{II}), se obtiene un tercer precipitado P_{III}, que contiene muy baja cantidad de proteínas con escasa actividad específica (0,9 Ucas/mg) (Tabla 11).

Muestra	Azúcares solubles (mg/ml)	Proteínas (µg/ml)	Actividad caseinolítica (Ucas/ml)	Actividad específica (Ucas/mg)
Extracto crudo	74,5	512	4,88	9,50
P _I	8,0	157	1,97	8,15
P _{II}	6,0	244	2,71	11,00
P _{III}	0	16	0,015	0,90

Tabla 11. Precipitación acetónica fraccionada del extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.

Para *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley, de acuerdo a los resultados obtenidos en el fraccionamiento acetónico, se decidió realizar una purificación preliminar partiendo de un volumen de extracto crudo, agregando directamente 2 volúmenes de acetona fría, con lo que se logra obtener un “precipitado acetónico” que retiene 77,7 % de proteínas con el 91,8 % de actividad caseinolítica y una actividad específica de 11,25 Ucas/mg (Tabla 12).

5.5.1.3. Purificación cromatográfica: intercambio iónico

Mediante la aplicación de la técnica de isoelectroenfoque (IEF) y de su respectivo zimograma pudo observarse que la mayoría de las fracciones proteolíticas del extracto enfocan cerca del cátodo (Fig. 43), evidenciando de este modo su naturaleza básica. Esta información permitió decidir el uso de cromatografía de intercambio catiónico en la posterior

etapa de purificación. La misma se llevó a cabo sobre una columna de CM-Sepharose CL-6B Fast Flow, equilibrada con buffer cítrico fosfato 55 mM de pH 6,4. Luego de sembrar la muestra, mediante el pasaje de un volumen de columna de buffer de partida se logra eluir una fracción proteica inactiva no retenida por el intercambiador catiónico. Mediante la posterior aplicación de un gradiente lineal de ClNa entre 0,0 y 0,7 M, se obtienen dos fracciones proteicas caseinolíticamente activas (I y II). La primera de ellas eluye a una concentración de ClNa 0,38 M y la segunda lo hace a 0,58 M (Fig. 44).

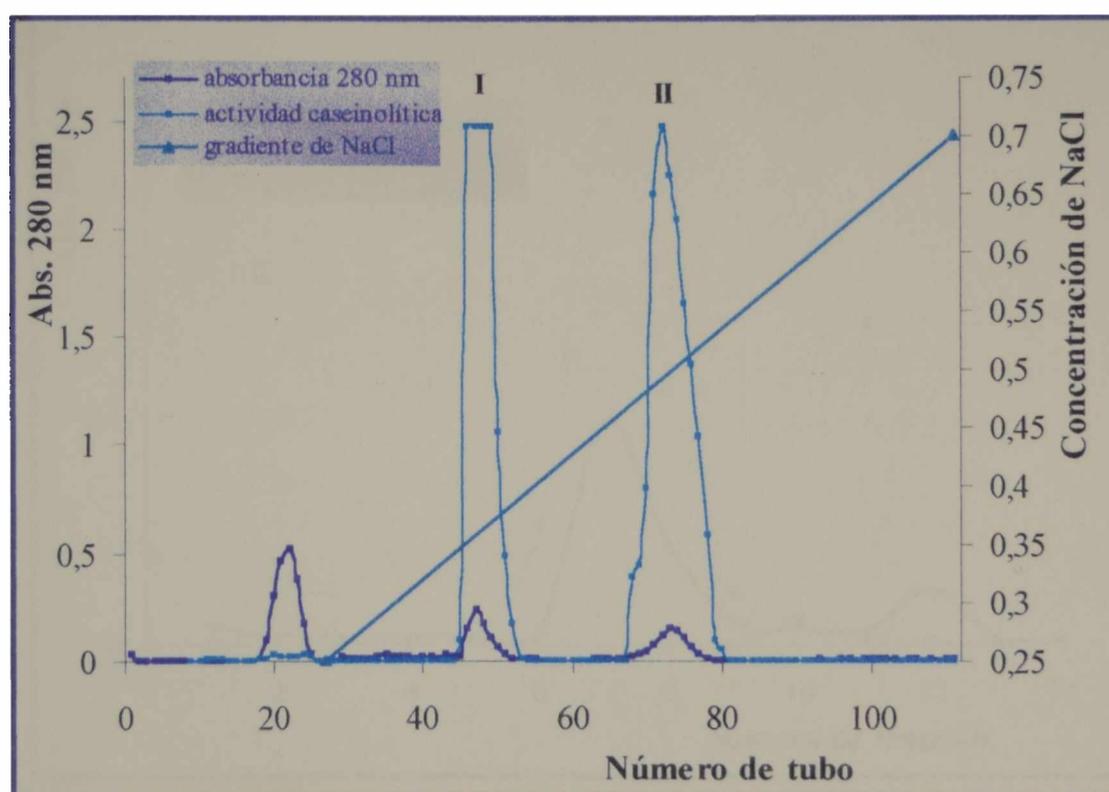


Figura 44. Cromatografía de intercambio sobre CM-Sepharose CL-6B Fast Flow del precipitado acetónico redissuelto. Buffer de elución: cítrico-fosfato 55mM, pH 6,4. Gradiente: ClNa 0,0-0,7 M. Velocidad de flujo: $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Volumen recogido por tubo: 1,5 ml.

5.5.1.3.1. Purificación cromatográfica: exclusión molecular

Teniendo en cuenta que mediante posteriores análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida la fracción II no resultó homogénea, la misma fue recolectada y aplicada a una

columna de exclusión molecular (Sephadex G-75) equilibrada y eluida con buffer cítrico-fosfato de pH 6,4 a una velocidad de flujo de $0,1 \text{ cm}^3/\text{min}$.

Mediante cromatografía de exclusión molecular, la fracción II se resuelve en dos picos de los cuales el que eluye en primer término es el más importante y presenta actividad caseinolítica, en tanto que posteriormente eluye un segundo pico menos importante, de menor peso molecular y no activo enzimáticamente (Fig. 45).

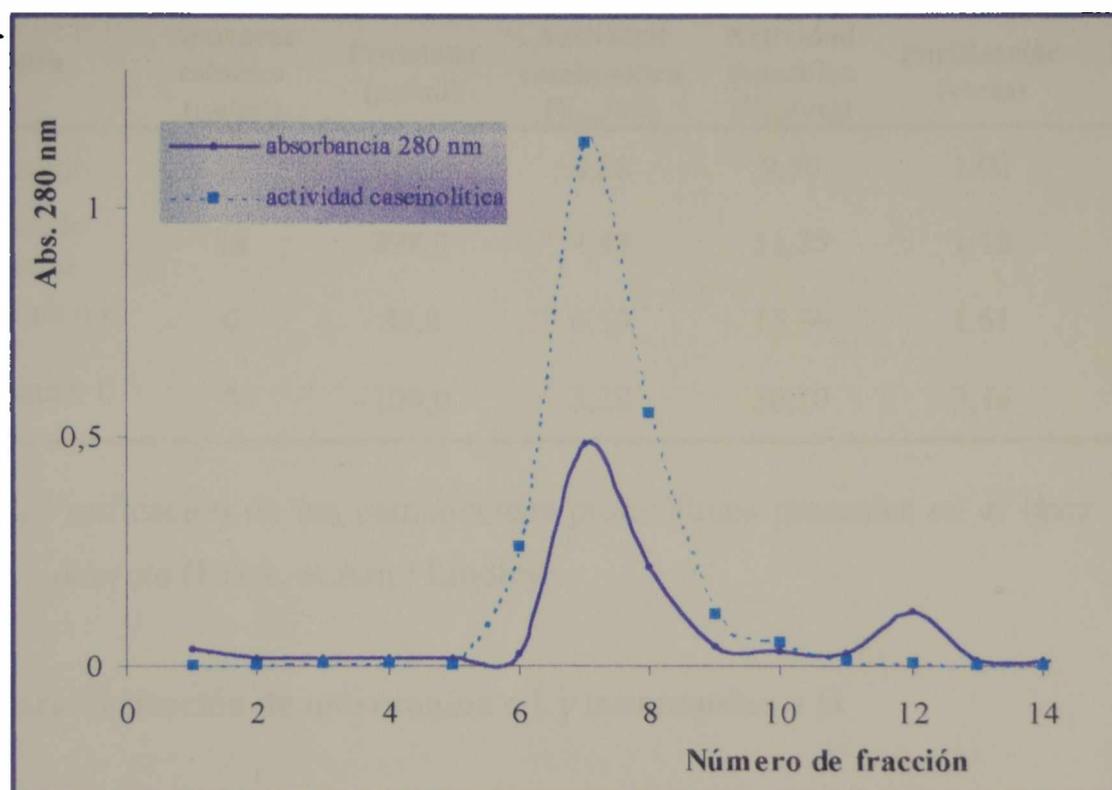


Figura 45. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) de la fracción II proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico. Buffer de elución: cítrico-fosfato 55 mM de pH 6,4. Velocidad de flujo: $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ Volumen de cada fracción: $1,8 \text{ cm}^3$.

De esta manera, combinando cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular se obtienen dos fracciones proteolíticamente activas a las que se denominan morrenáina o I y morrenáina o II.

5.4.1.4. Esquema de purificación

Como puede observarse en el cuadro de purificación (Tabla 12), morrenaina o II es la principal fracción proteolítica purificada con un rendimiento del 67%. Por su parte, morrenaina o I presenta solamente un 11,2 % de rendimiento, aunque con buena actividad específica. Ambas proteasas, morrenaina o I y morrenaina o II, alcanzan un grado de purificación aparentemente no muy elevado: 1,61 y 3,16, respectivamente.

Muestra	Azúcares solubles ($\mu\text{g/ml}$)	Proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad caseinolítica ($\text{U}_{\text{cas}}/\text{ml}$)	Actividad específica ($\text{U}_{\text{cas}}/\text{mg}$)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	74	512,0	4,88	9,50	1,00	100,0
Precipitado acetónico	14	398,0	4,48	11,25	1,18	91,0
Morrenaina o I	0	35,8	0,55	15,36	1,61	11,2
Morrenaina o II	0	109,0	3,28	30,10	3,16	67,0

Tabla 12. Purificación de los componentes proteolíticos presentes en el látex de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.

5.5.1.5 Caracterización de morrenaina o I y morrenaina o II

5.5.1.5.1. Variación de la actividad caseinolítica con el pH

Se ensayó la actividad caseinolítica de morrenaina o I y morrenaina o II en el rango de pH comprendido entre 6,0 y 11,0. Como puede observarse en la figura 46, los resultados obtenidos para ambas proteasas muestran máxima actividad proteolítica en un rango de pH elevado (7,0-10,0), aunque en tanto morrenaina o I comienza a disminuir su actividad enzimática a valores superiores a pH 9,0, morrenaina o II sufre una pequeña inflexión y recién comienza a bajar su actividad por encima de pH 10,0. El comportamiento de estas proteasas es similar al de las proteasas de *Morrenia brachystephana* Griseb. y al de otras proteasas de *Asclepiadaceae* previamente estudiadas.

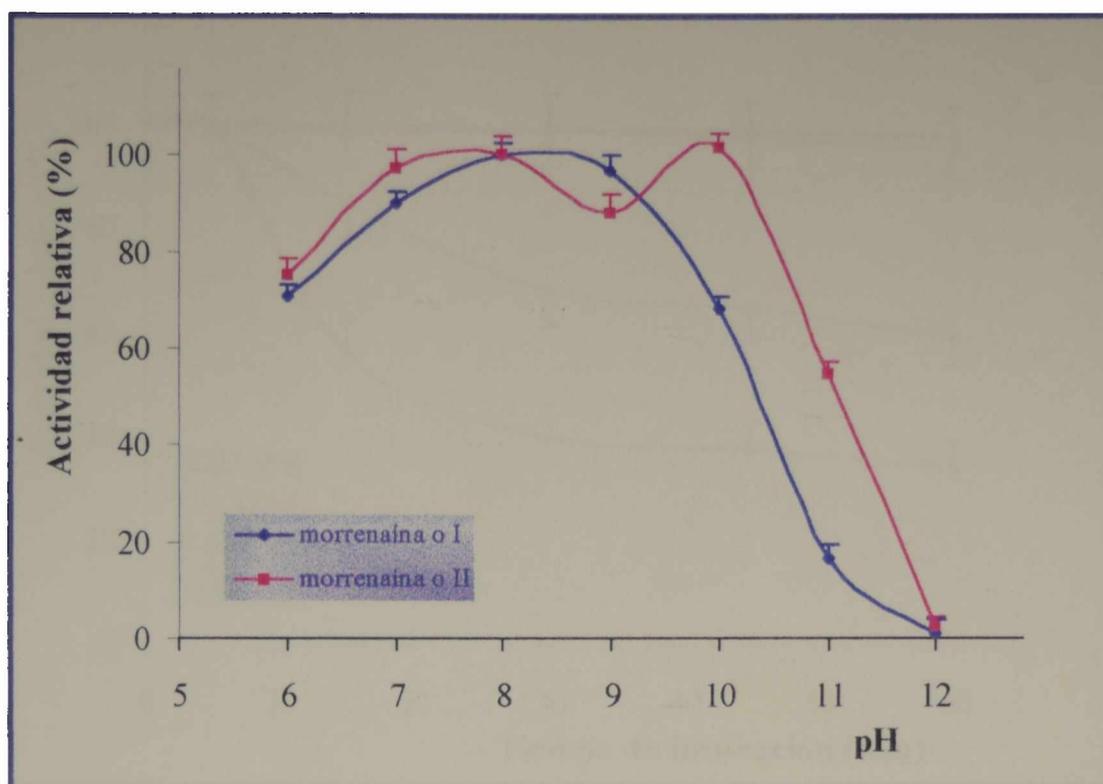


Figura 46. Perfil de actividad caseinolítica con el pH de morrenainas o I y o II.

5.5.1.5.2. Estabilidad térmica

En los gráficos presentados en las figuras 47 y 48 puede observarse el efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de morrenaina o I y morrenaina o II.

El comportamiento de ambas proteasas es muy similar. Las variaciones en la actividad caseinolítica que se registran luego de someter las proteasas a distintas temperaturas a lo largo del tiempo, indican que tanto morrenaina o I como morrenaina o II son estables a 37°C y 44°C aún hasta 60 minutos de incubación. Sin embargo, sólo conservan un 40% de actividad caseinolítica residual luego de permanecer 1 hora a 70°C y difieren en que a 60°C morrenaina o I ya a los 20 minutos de incubación pierde un 20% de actividad y a los 60 minutos un 40 %, en tanto que morrenaina o II es mucho más estable a esta temperatura, permaneciendo prácticamente inalterada aún después de 60 minutos de incubación.

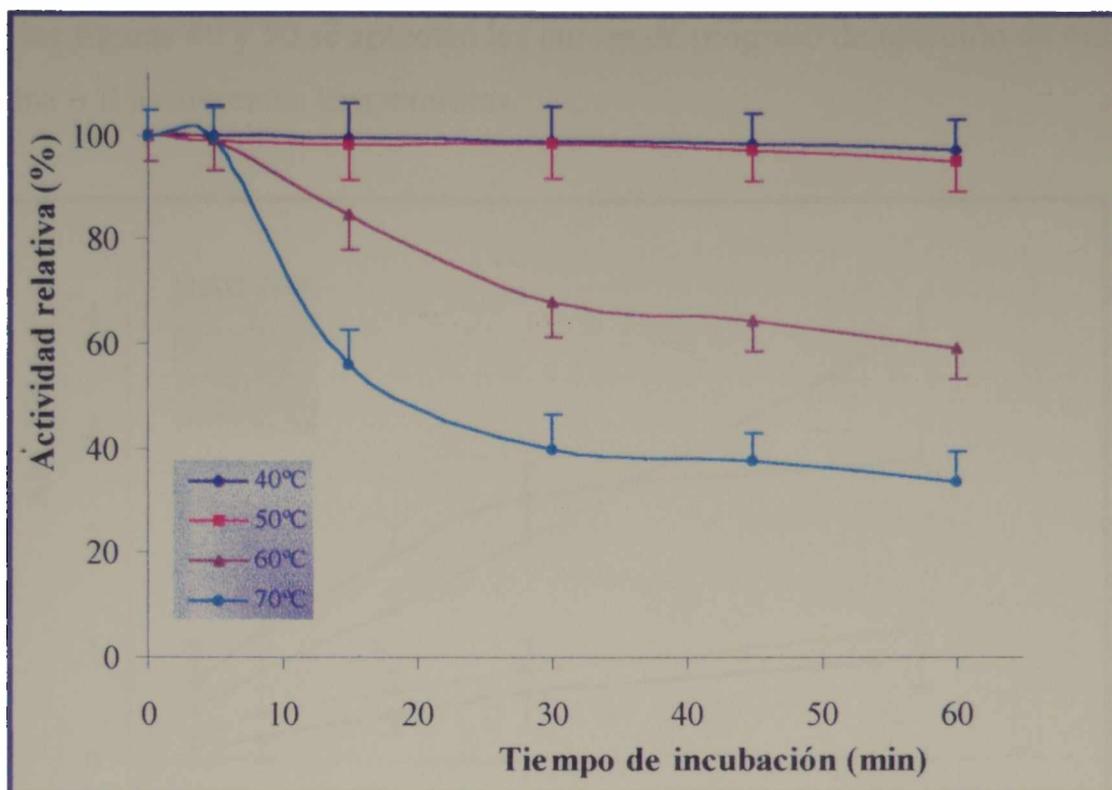


Figura 47. Estabilidad térmica de morrenaina o I.

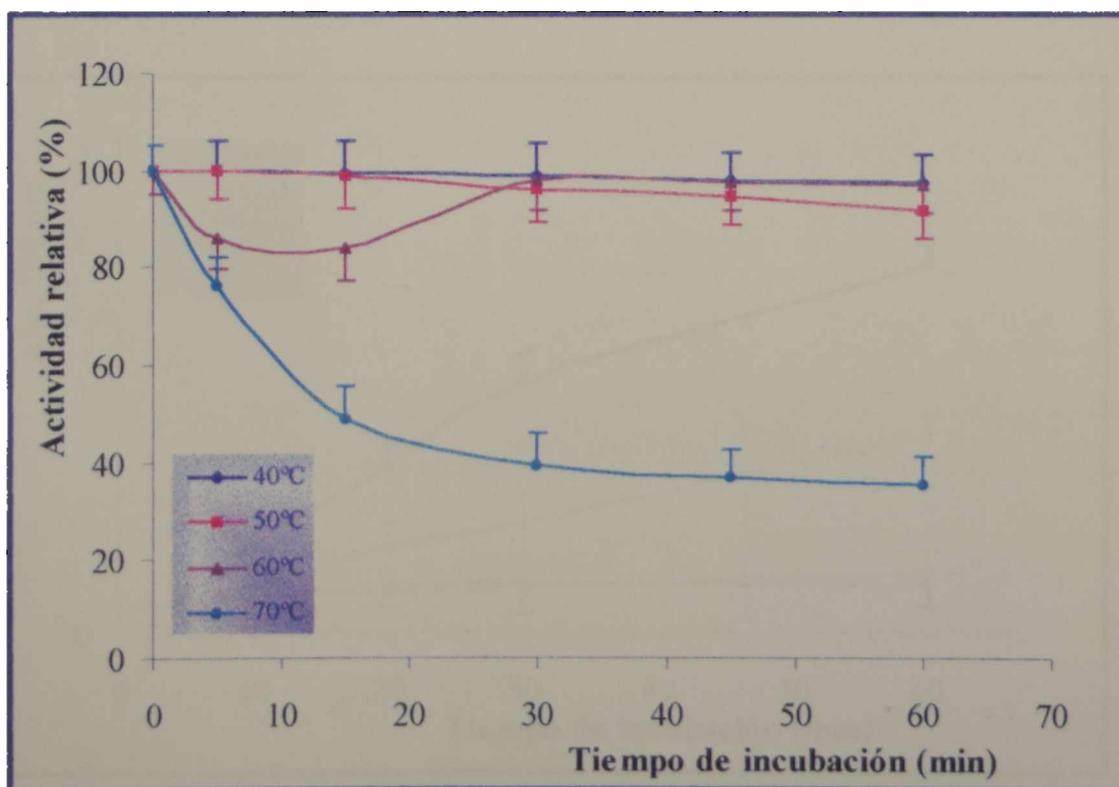


Figura 48. Estabilidad térmica de morrenaina o II.

5.5.1.5.3. Efecto térmico

En las figuras 49 y 50 se aprecian las curvas de progreso de reacción de morrenaína o I y morrenaína o II a diferentes temperaturas.

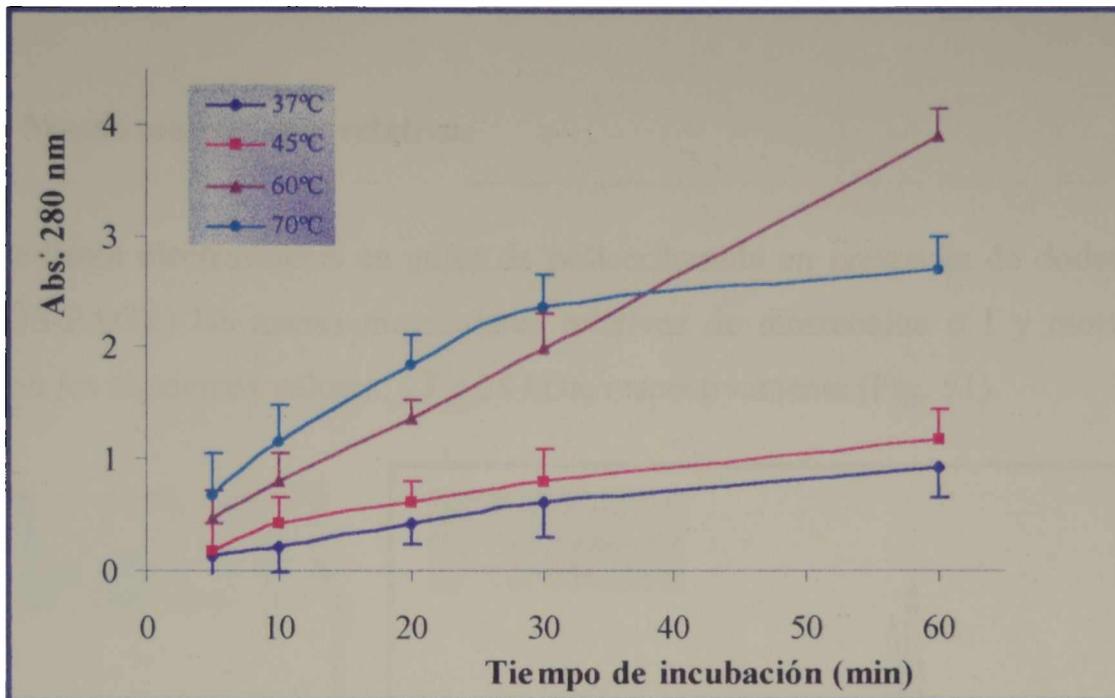


Figura 49. Efecto térmico sobre morrenaína o I.

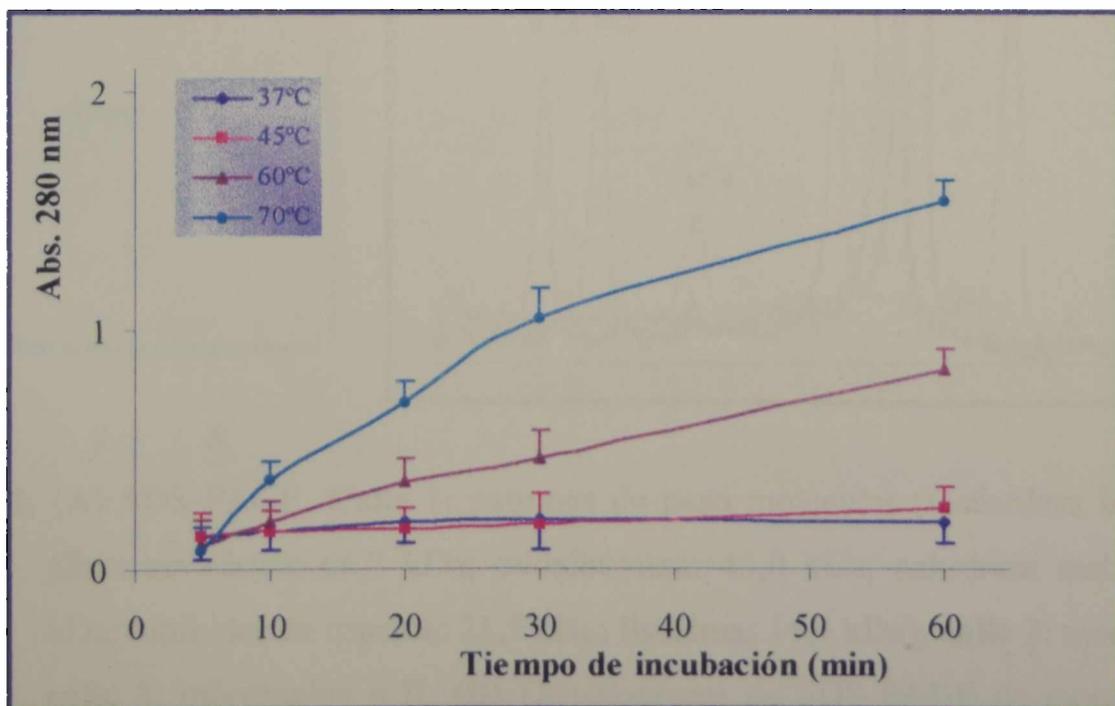


Figura 50. Efecto térmico sobre morrenaína o II.

En ambos casos puede observarse que en general la actividad caseinolítica aumenta con el incremento de la temperatura a lo largo del tiempo transcurrido. Estos resultados indicarían que las enzimas no sufren desnaturalización con la temperatura y en tanto el sustrato se encuentre en cantidad suficiente para ser degradado, las mismas no se autodegradarían.

5.5.1.5.4. Masas moleculares relativas

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) las masas moleculares relativas de morrenaína o I y morrenaína o II presentaron los siguientes valores: 27 y 28 kDa, respectivamente (Fig. 51).

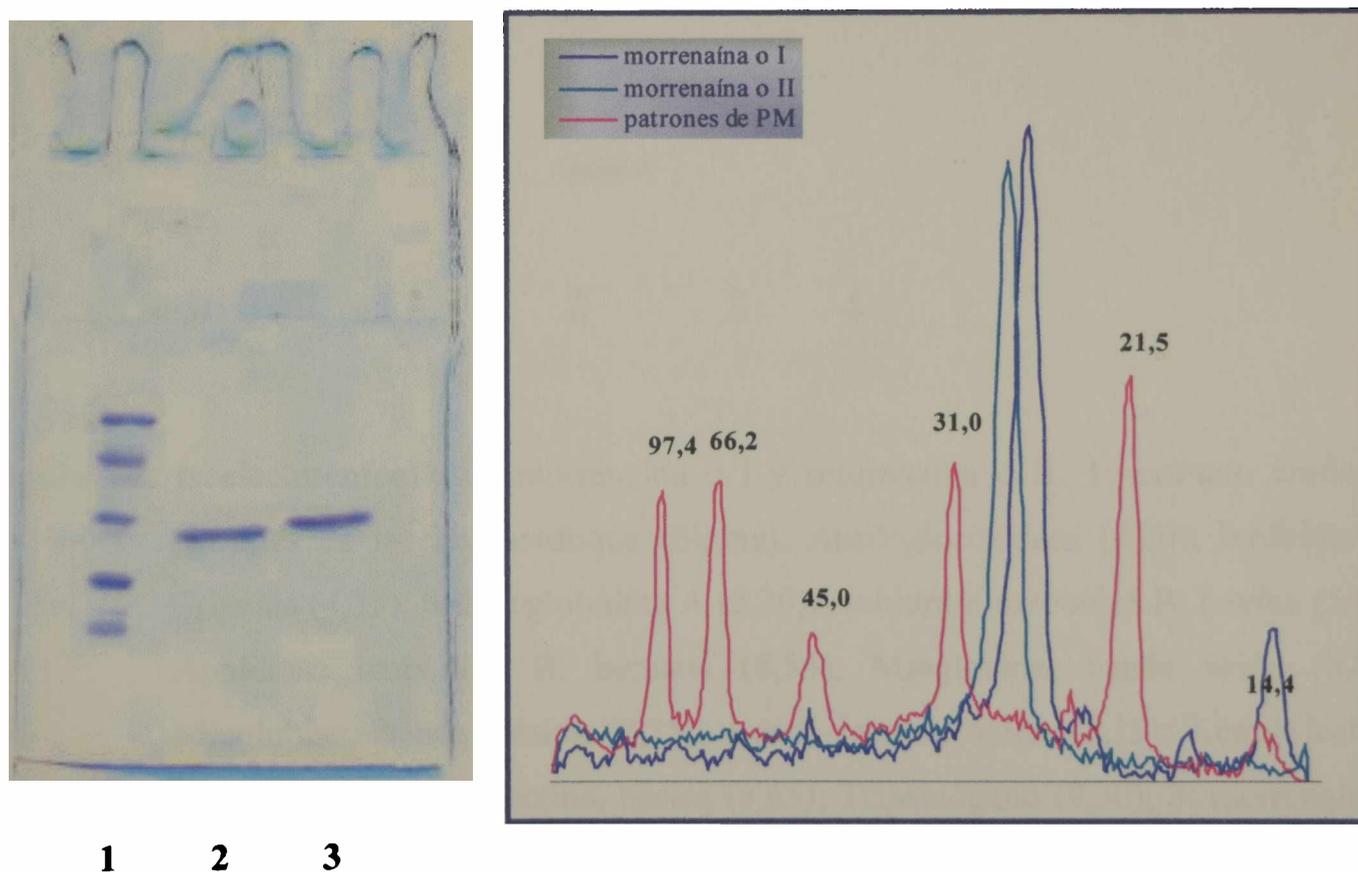


Figura 51. (A) SDS-PAGE. **Calle 1:** patrones de peso molecular (fosforilasa b: 97,4 kDa; albúmina sérica: 66,2 kDa; ovoalbúmina: 45,0 kDa; anhidrasa carbónica: 31,0 kDa; inhibidor de tripsina: 21,5 kDa; lisozima: 14,4 kDa); **calle 2:** morrenaína o I; **calle 3:** morrenaína o II. (B) Densitograma de SDS-PAGE de morrenaína o I y morrenaína o II.

5.5.1.5.5. Puntos isoeléctricos

Mediante el análisis por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con gradiente de pH 3,0-10,0 puede observarse que tanto morrenáina o I como morrenáina o II presentan valores de pI superiores a 9,3.

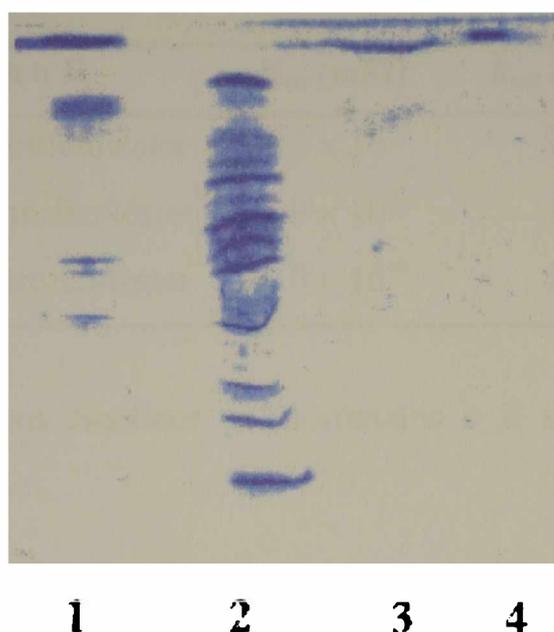


Figura 52. Isoelectroenfoque de morrenáina o I y morrenáina o II. 1: extracto crudo; 2: patrones de isoelectroenfoque (Sigma), Amilogucosidasa (3,50); Inhibidor de Tripsina (4,55); β -lactoglobulina A (5,20); Anhidrasa carbónica B, bovina (5,85); Anhidrasa carbónica B, humana (6,55); Mioglobina, banda ácida (6,85); Mioglobina, banda básica (7,35); Lentil lectina, ácida (8,15); Lentil lectina, media (8,45); Lentil lectina, básica (8,65); Tripsinógeno (9,30); 3: morrenáina o I; 4: morrenáina o II.

5.5.1.5.6. Parámetros cinéticos

Morrenáina o II fue la proteasa seleccionada para realizar las determinaciones de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} . Los sustratos sintéticos utilizados para estos ensayos fueron los mismos que para morrenáina b II (N - α -CBZ-Ala- p -nitrofeniléster, N - α -CBZ-Asp- p -

nitrofeniléster y N- α -CBZ-Gly-*p*-nitrofeniléster), a fin de comparar los resultados obtenidos en ambos casos. El análisis de los resultados se realizó con el programa Sigma Plot, usando regresión lineal para el cálculo de las velocidades iniciales. Una vez conocidas las velocidades iniciales se determinaron los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} ; para esto se usó el mismo programa y se asumió que la cinética sigue el mecanismo del estado estacionario propuesto por Haldane.

Morrenáina o II	K_m (mM)	k_{cat} (seg ⁻¹)	k_{cat}/K_m (seg ⁻¹ M ⁻¹)
N- α -CBZ-Ala- <i>p</i> -nitrofeniléster	4.3×10^{-5}	7.3	1.7×10^8
N- α -CBZ-Asp- <i>p</i> -nitrofeniléster	4.9×10^{-6}	1.7	3.5×10^8
N- α -CBZ-Gly- <i>p</i> -nitrofeniléster	2.0×10^{-5}	2.0	9.9×10^7

Tabla 13. Parámetros cinéticos de morrenáina o II sobre N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos.

5.5.1.5.7. Estabilidad de morrenáina o II en solventes orgánicos

Dado que una posible aplicación de las proteasas estudiadas podría ser la síntesis de péptidos bioactivos en medios no convencionales, resulta indispensable como parte de su caracterización conocer la estabilidad en estos medios. La preparación enzimática pura disuelta en buffer Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0 que corresponde al pH de óptima actividad caseinolítica se mezcló con el solvente (N,N-dimetilformamida, cloroformo ó n-heptano) en proporciones distintas, dependiendo del solvente utilizado.

5.5.1.5.7.1. Estabilidad en sistemas monofásicos

En la figura 53 puede observarse el comportamiento de morrenáina o II en N,N-dimetilformamida al 30%. Como puede apreciarse la enzima no es muy estable en este medio ya que pierde un 60% de su actividad original luego de estar 10 minutos en contacto con el solvente; sin embargo a partir de los 10 minutos y hasta la hora se estabiliza, conservando la misma actividad residual.

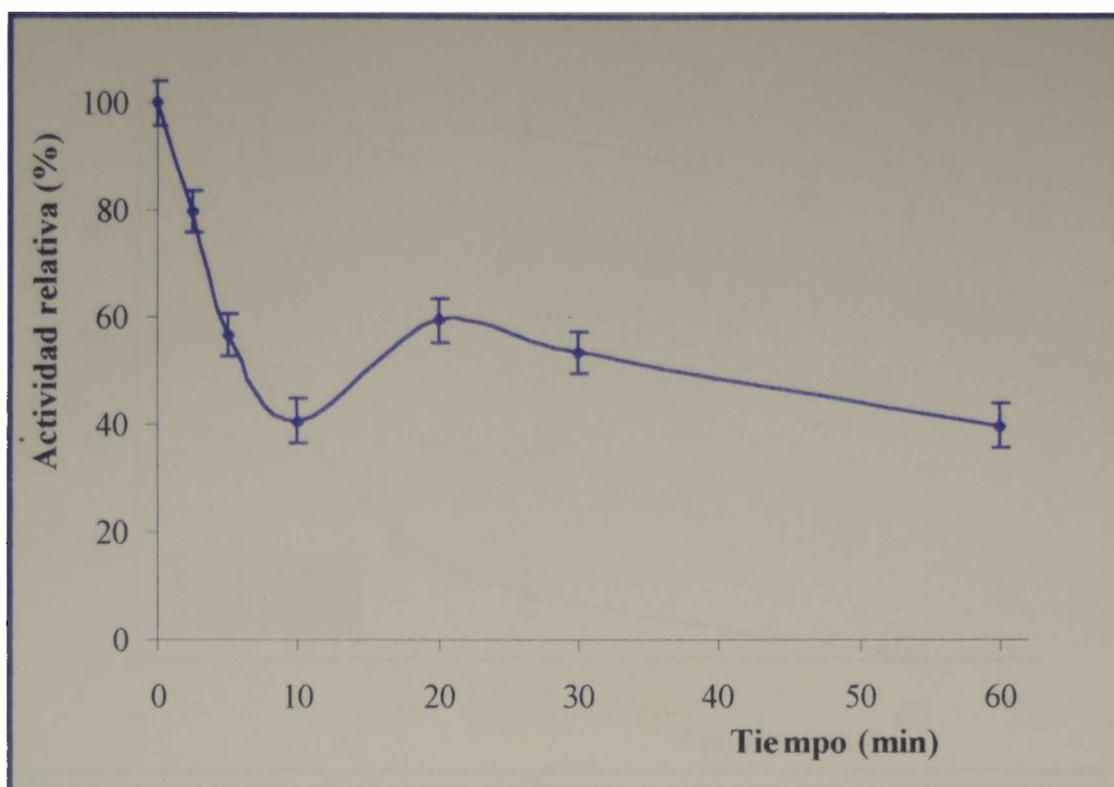


Figura 53. Estabilidad de morrenáina o II en N,N-dimetilformamida.

5.5.1.5.7.2. Estabilidad en sistemas bifásicos al 50%

La estabilidad de la enzima en medios heterogéneos conteniendo cloroformo y n-heptano se muestra en la figura 54. Morrenáina o II manifiesta un comportamiento diferencial frente a ambos solventes. En presencia de n-heptano resulta muy estable reteniendo prácticamente un 80 % de la actividad inicial luego de una hora de incubación, en tanto que frente a cloroformo comienza a perder actividad rápidamente, tornándose muy inestable y completamente inactiva luego de permanecer una hora en contacto con dicho solvente.

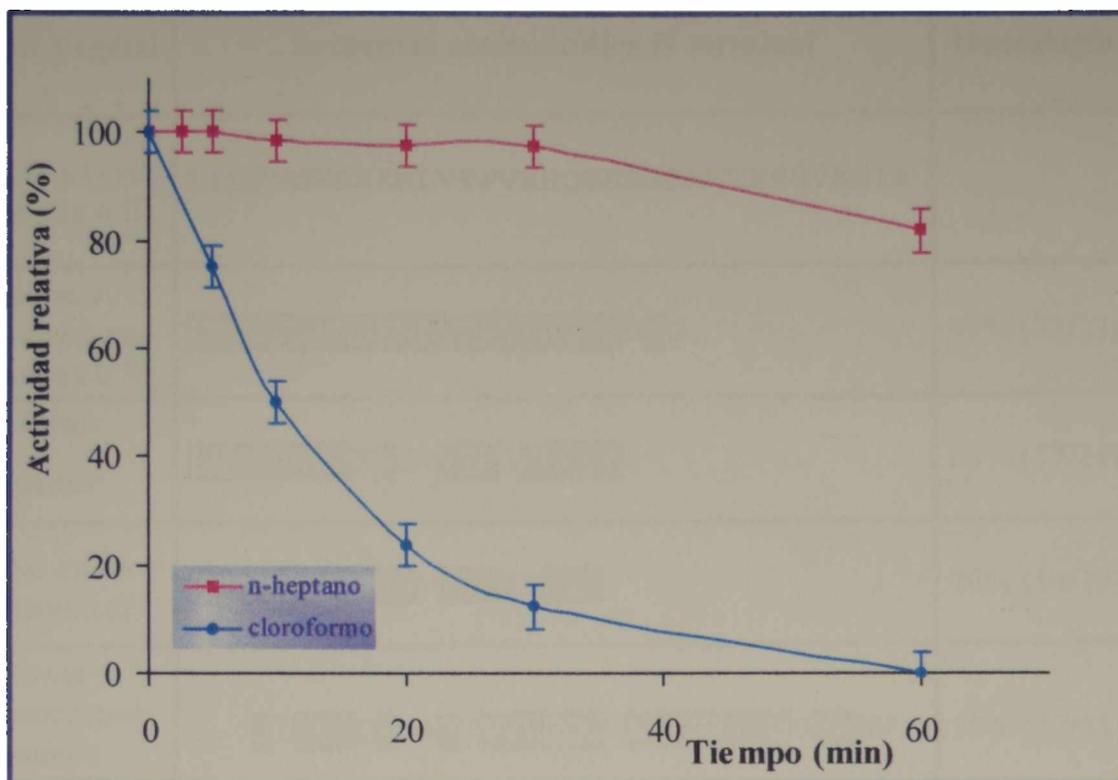


Figura 54. Estabilidad de morrenina o II en cloroformo y en n-heptano.

5.5.1.5.8. Secuencia aminoácida N-terminal de morrenina o II

La secuencia aminoácida N-Terminal de morrenina o II realizada según la degradación de Edman fue comparada con la secuencia N-terminal de morrenina b II y de otras proteasas cisteínicas (Tabla 14).

Material Vegetal	Secuencia aminoacídica N-terminal	Homología	Referencias
<i>Morrenia odorata</i> (morrenaina o II)	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKXGSXWTFSAVASIX		
<i>Morrenia brachystephana</i> (morrenaina b II)	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKKG	95% (22/23)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> (2001)
<i>Asclepias fruticosa</i>	LPDSVDWREKGVVFPIRNQ GK	80% (17/21)	Trejo <i>et al.</i> (2000)
<i>Asclepias syriaca</i> (asclepaina a)	LPNSIDWRQKNVVFPIKNQ GK	70% (14/20)	Lynn <i>et al.</i> (1980b)
<i>Carica candamarcensis</i> (cysteine proteinase I)	...SIDWRQKGA VTPVRNQGSXGSXWTFSSVA AV	70% (22/31)	Walreavens <i>et al.</i> (1993)
<i>Asclepias syriaca</i> (asclepaina b)	LPNEVDWRKNGVVFPIRNQ GQ	66% (14/21)	Lynn <i>et al.</i> (1980b)
<i>Brassica napus</i>	LPVSVDWRKKGA VTPPIK DQGLCGSCWAFSAVA AI	64% (22/34)	Noh & Amasino (1999)
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSVDWRKKGA VSPVK NQGQCGSCWAFSTVA AV	64% (22/34)	Ye & Varner (1993)
<i>Carica papaya</i> (caricaína)	LPENVDWRKKGA VTPVRH QGSCGSCWAFSTIVTV	64% (22/34)	Dubois <i>et al.</i> (1988)
<i>Oryza sativa</i>	LPESVDWREKGA VAPVK NQGQCGSCWAFSAVSTV	61% (21/34)	Watanabe <i>et al.</i> (1991)
<i>Carica candamarcensis</i> (cysteine proteinase III)	PE SIDWRKKGA VTPVK NQGSXGSXWAFSTIVTV	60% (20/33)	Walreavens <i>et al.</i> (1993)
<i>Araujia hortorum</i> (araujaína h II)	VPDSIDWREKDA VLP I RNQ GQXG	60% (14/23)	Obregón <i>et al.</i> (2001)

Tabla 14. Comparación de la secuencia aminoacídica N-terminal de morrenaina o II con otras endopeptidasas vegetales.

***Discusión
y
Conclusiones***

En el presente trabajo se estudiaron, tanto desde el punto de vista botánico como fitoquímico dos especies del género *Morrenia* (*Asclepiadaceae*) que crecen en forma espontánea en la provincia de Santa Fe, Argentina: *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley.

Se realizó además un rastreo etnobotánico que aporta datos sobre el empleo vernáculo de las especies estudiadas, ya que los resultados obtenidos permiten reconocer drogas al estado crudo.

La arquitectura foliar de estas especies no fue descrita hasta el presente. Del análisis realizado se puede concluir que responden a un esquema único de vascularización: gruesa, densa, actinódroma y presentan terminaciones vasculares con traqueidas prosenquimáticas dispuestas en forma paralela. Sí se observan, en cambio, diferencias en la venación última marginal, ya que en *Morrenia brachystephana* Griseb. es incompleta y en *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley es ojalada.

El estudio de las epidermis con MEB aportó nuevos datos micromorfológicos sobre los depósitos de ceras epicuticulares, las que junto con la cutícula, que es gruesa y estriada, son mecanismos efectivos para reducir la transpiración cuticular, lo que concuerda con lo expresado por (Haberlandt, 1965).

Los estomas predominantemente de tipo rubiáceo, tal como habían sido descriptos por Solereder (1908) y Metcalfe & Chalk (1950) están presentes en ambas epidermis, levemente hundidos con respecto a las células vecinas y protegidos por rebordes externos gruesos y protuberantes de apertura angosta.

Las hojas muestran una estructura bilateral, con hipodermis hacia la epidermis adaxial y cuerpos grasos en el mesófilo tal como había sido citado por Metcalfe & Chalk (1950) para el género *Morrenia*, sin hacer mención de especies.

La estructura de los tallos no muestra diferencias en las especies estudiadas, las que presentan como carácter notable ya citado por Solereder (1908) para la familia *Asclepiadaceae* la formación temprana de súber, además contienen colénquima, parénquima en empalizada y fibras blandas agrupadas.

El parénquima cortical en la raíz que fuera reportado por Metcalfe & Chalk (1950) para *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley también se encuentra en *Morrenia brachystephana* Griseb.

Las especies estudiadas presentan caracteres xeromorfos en el sentido que se le da a ese término en los trabajos de Fahn & Cutler (1992) los que les permiten enfrentarse a las condiciones del medio en que viven.

El patrón de origen y desarrollo de los laticíferos ramificados no articulados en *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley es típico de los reportados para otros géneros de *Asclepiadaceae* por Giordani (1978) en que cada inicial proviene de células meristemáticas que están ya diferenciadas en el embrión.

La presencia de un anillo casi completo de iniciales en el nudo cotiledonar, que consta de 26 o 27 células en las especies del género *Morrenia* corresponde al mismo patrón que Mahlberg (1961) observó en embriones de *Nerium oleander* (*Apocynaceae*).

Los estudios de Milanez (1952) y Milanez & Neto (1956) sobre el desarrollo de laticíferos en dos especies de *Euphorbia* describen a los laticíferos como estructuras multicelulares que surgen por lisis de las paredes de células vecinas que trae como resultado la incorporación de protoplasma y agregación de núcleos; en contraste con estas observaciones y coincidiendo con Mahlberg (1993) en este trabajo se demuestra que las paredes de los laticíferos están aisladas y que el protoplasma multinucleado resulta de repetidas cariocinesis no seguidas de citocinesis. No se sugiere la fusión de células ni la anastomosis entre laticíferos adyacentes.

Durante su desarrollo subsecuente las ramificaciones de estas células penetran intrusivamente a lo largo de la lámina media entre las células adyacentes llegando al interior de los cotiledones y a las inmediaciones de ambos meristemas, resultando esto coincidente con lo observado en *Nerium oleander* (Mahlberg, 1961, 1963) y en *Euphorbia marginata* (Mahlberg *et al.*, 1968).

Son escasos los antecedentes referidos a la ultraestructura de laticíferos en *Asclepiadaceae*. Sólo se pueden mencionar los trabajos en *Asclepias syriaca* (Wilson *et al.*, 1978) y *Asclepias curassavica* (Giordani, 1978), que resultan similares a los datos obtenidos en los estudios realizados con microscopio electrónico de transmisión en laticíferos embrionales tanto de *Morrenia brachystephana* Griseb. como de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley, ya que no tienen una larga vacuola central sino que presentan un citoplasma denso, de aspecto meristemático, rico en ribosomas y que encierra numerosas vesículas originadas en el sistema de endomembranas integrado por el retículo endoplasmático y el

complejo de Golgi, las que se unen y constituyen vacuolas autofágicas que rodean parte del citoplasma que puede ser lisado y culminan originando una larga vacuola axial, lo que nos permite concluir que es una secreción granulocrina (Marty, 1978; Mauseth, 1988). Los núcleos son esféricos y el citoplasma que rodea a la vacuola axial contiene todas las organelas usuales.

En cuanto al aspecto bioquímico, la investigación se focalizó en la detección *in situ* de las enzimas proteolíticas presentes en el látex contenido en los tubos laticíferos y en el posterior aislamiento, purificación y caracterización de las mismas.

En tal sentido, se detectó la presencia de proteasas en cortes frescos de tallo, tanto longitudinales como transversales, mediante el uso de técnicas histoquímicas específicas, comprobándose en ambos casos que las mismas se localizan en el interior de los tubos laticíferos que se extienden desde el floema hacia el parénquima cortical llegando incluso hasta la epidermis, lo que justificaría la propuesta de actuar como defensa para la planta del ataque de herbívoros. Cabe destacar que en este sentido no existen estudios previos.

En ambas especies del género *Morrenia* se observó que tanto las preparaciones enzimáticas crudas, provenientes de la centrifugación del látex recolectado en un medio buffer con protectores adecuados, como los precipitados acetónicos poseen una elevada actividad caseinolítica que se incrementa notoriamente en presencia de cisteína 12mM como activador enzimático. Asimismo, en todos los casos la actividad enzimática fue inhibida por agentes bloqueantes de grupos -SH, propiedad que sumada al efecto activador de la cisteína sugiere que las proteasas que se encuentran presentes en el látex de ambas *Morrenias* son cisteínicas (Barrett 1998).

Las preparaciones enzimáticas crudas manifiestan mayor actividad proteolítica a valores de pH alcalinos y una relativa estabilidad térmica, manteniendo las propiedades digestivas aún después de haber sido sometidas a temperaturas moderadas y altas durante un período de tiempo de 2 horas. *Morrenia brachystephana* Griseb. resultó ser la proteasa más estable ya que retiene el 90% de su actividad inicial a 50°C y el 65% a 70°C, en tanto que *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley si bien es muy estable a 50°C y a 60°C aún mantiene un 70% de actividad residual, a 70°C pierde el 80% de sus propiedades enzimáticas.

El extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. presenta menor contenido de azúcares libres y mayor cantidad de proteínas que el extracto crudo de *Morrenia odorata*

(Hook. et Arn.) Lindley; sin embargo este último posee un 25% más de actividad específica expresada en Ucas/mg de proteínas, característica ésta que se pone en evidencia tanto en las reacciones histoquímicas como en los zimogramas de los correspondientes extractos crudos.

Los ensayos de actividad enzimática realizados con sustratos sintéticos del tipo N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos pusieron en evidencia la capacidad endoesterásica de las preparaciones enzimáticas estudiadas. El extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. manifestó mayor preferencia por los N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina y lisina. Por su parte el extracto crudo de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley prefirió como sustratos los derivados de los aminoácidos hidrofóbicos leucina e isoleucina.

Cuando los extractos crudos de ambas especies fueron analizados mediante isoelectroenfoque se comprobó que la mayoría de las proteínas presentes en los mismos enfocan a valores de pH elevados y mediante los correspondientes zimogramas se observó que las proteasas presentan pI superiores a 9,3. Este comportamiento fue previamente observado en las proteasas aisladas a partir de látex de otras especies de *Asclepiadaceae* como en *Asclepias glaucescens* (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991), *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001) y *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al.*, 2000).

Mediante procedimientos de purificación que incluyen precipitación acetónica fraccionada, cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular se lograron purificar a homogeneidad las proteasas contenidas en los extractos crudos. En ambos casos fueron dos las proteasas aisladas, a las que se denominaron morrenáina b I y morrenáina b II en el caso de *Morrenia brachystephana* Griseb. y morrenáina o I y morrenáina o II en el de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley. Los nombres para las nuevas peptidasas son propuestos de acuerdo a la nomenclatura tradicional utilizada para denominar a las proteasas obtenidas a partir de látex de miembros de la familia *Asclepiadaceae* (Rodríguez-Romero & Hernández-Arana, 1998).

De acuerdo al esquema de purificación del extracto crudo de *Morrenia brachystephana* Griseb. puede concluirse que morrenáina b II fue la principal fracción proteolítica purificada con un rendimiento del 40,4%, ya que si bien morrenáina b I también muestra una significativa actividad, presenta un rendimiento del 28,3%. No obstante, el grado de purificación que se logra en ambas proteasas no es muy elevado: 1,24 y 1,53 veces,

respectivamente, probablemente debido a que las mismas constituyen la mayoría de las proteínas de látex.

En el caso de *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley también la principal fracción con actividad enzimática purificada resultó ser la fracción II (morrenaina o II), con un rendimiento del 60% y que a su vez es mayor que morrenaina b II. Por su parte, el rendimiento de morrenaina o I es bastante inferior (11,2%) pero con muy buena actividad específica. Las veces de purificación lograda en ambas proteasas también es baja aunque superior a las proteasas de *Morrenia brachystephana* Griseb. Es de destacar además que tanto morrenaina o I como morrenaina o II son mucho más activas que las correspondientes morrenaina b I y morrenaina b II. Morrenaina o I es 1,4 veces más activa que morrenaina b I y morrenaina o II es prácticamente 3,5 veces más activa que morrenaina b II.

En relación al pH, las proteasas analizadas en el presente trabajo muestran actividad óptima en un amplio rango comprendido entre pH 7,5 y 10,5. Morrenaina o II manifestó un comportamiento similar a morrenaina b II, ambas muestran mayor actividad caseinolítica a pH 10,0 presentando sus perfiles de pH más desplazados hacia el extremo alcalino en relación a morrenaina b I y morrenaina o I, respectivamente. Otras endopeptidasas cisteínicas, como ananaina (Rowan & Buttle, 1994), caricaína (Taylor *et al.*, 1994) y asclepaina (Brockbank & Lynn, 1979) también presentan un amplio rango de pH óptimo, pero más centrado alrededor de pH neutro. Los perfiles de pH de las morrenainas revelan gran similitud con los obtenidos para otras proteasas cisteínicas de la familia *Asclepiadaceae*, tales como asclepaina, proveniente de *Asclepias syriaca*, que mostró máxima actividad con caseína alrededor de pH 7,5 (Brockbank & Lynn, 1979); araujiaina h I, aislada del látex de *Araujia hortorum*, que exhibió máxima actividad dentro del rango de pH 8,0-9,5 (Priolo *et al.*, 2000) y una proteasa purificada a partir de látex de *Asclepias fruticosa*, que mostró máxima actividad caseinolítica en el rango de pH 8,0 y 10,5 (Trejo *et al.*, 2000).

Respecto a la estabilidad térmica, morrenaina b II resulta ser muy estable aún a temperaturas elevadas (70°C) durante 1 hora de incubación, en tanto que morrenaina b I se inactiva rápidamente, reteniendo un 40% de su actividad inicial luego de 15 minutos de incubación a 70°C y solamente un 10% luego de 60 minutos. Por su parte morrenaina o I y morrenaina o II presentan un comportamiento similar, ambas son bastante estables a temperaturas moderadas y se hacen inestables a 70°C, aunque en menor medida que las

proteasas de *M. brachystephana* Griseb.

En todas las proteasas estudiadas en este trabajo la actividad caseinolítica se incrementa continuamente con el aumento de la temperatura y con el tiempo, aún hasta los 60 minutos y 70 °C, temperatura a la cual se inactivan la mayoría de las enzimas (Dixon & Webb, 1979). Un comportamiento similar fue observado previamente en araujiaina h I. La acción de la temperatura podría inducir la autodigestión de las proteasas o bien la degradación de las mismas. Sin embargo, en estos casos el efecto térmico actuaría aumentando la velocidad de ruptura del sustrato, predominando sobre los otros efectos. Este comportamiento sugiere que las proteasas estudiadas en presencia de exceso de sustrato hidrolizan otras proteínas y no se autodigieren.

Las cuatro proteasas purificadas resultaron homogéneas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Las masas moleculares de morrenaina b I y morrenaina b II son muy similares: 25,5 y 26,0 kDa, respectivamente. Lo mismo ocurre con *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley, en la que puede advertirse que morrenaina o I tiene una masa molecular de 27,0 kDa y morrenaina o II de 28,0 kDa. En ambos casos la fracción I es de menor masa molecular que la fracción II. Los valores de masas moleculares obtenidos son del mismo orden que los registrados para otras peptidasas cisteínicas de *Asclepiadaceae* estudiadas: *Asclepias syriaca* presenta proteasas de M_r 21,000 y 23,000 (Brockbank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980a, 1980b); de *Asclepias glaucescens* se obtuvo una proteasa de M_r 23,000 (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991); las cuatro calotropinas aisladas de *Calotropis gigantea* tienen masas moleculares comprendidas entre 23,0 y 27,0 kDa (Abraham & Joshi, 1979a, 1979b; Pal & Sinha, 1980); las tres peptidasas purificadas del látex de *Araujia hortorum* presentan masas moleculares del orden de 23,0 y 25,0 kDa (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001) y la peptidasa extraída de *Asclepias fruticosa* de 26 kDa (Trejo *et al.*, 2000).

Los puntos isoeléctricos de las cuatro proteasas purificadas son superiores a 9,3, lo que indica que todas ellas son de naturaleza básica, resultando con carga neta negativa solamente a valores de pH muy elevados, en tanto que a pH neutro la carga neta de las mismas será positiva; esta característica coincide con datos previos obtenidos para otros géneros de la familia *Asclepiadaceae* (Priolo, *et al.*, 2000).

Para estudiar la especificidad de las peptidasas cisteínicas, el principal requisito es

utilizar sustratos sintéticos pequeños en lugar de grandes sustratos proteicos a fin de evitar las complejas interacciones entre la cadena polipeptídica y la enzima y los diversos modelos patrones de clivaje (Ménard & Storer, 1998). Mediante el uso de sustratos sintéticos del tipo N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos se estudió la actividad endoesterolítica y la especificidad de sustrato de las morrenainas. Además de su actividad proteolítica, las morrenainas exhibieron actividad esterolítica al igual que otras proteasas cisteínicas como papaína (Glazer & Smith, 1971) y bromelaina (Silverstein, 1974). Los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} fueron determinados para morrenaina b II y morrenaina o II con los derivados de alanina, glicina y ácido aspártico, observándose en ambos casos un comportamiento muy diferente. Morrenaina b II mostró mayor eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) con el derivado de glicina y morrenaina o II con el derivado de ácido aspártico. Estos sustratos resultaron excelentes para morrenaina o II (valores de k_{cat}/K_m en el rango de 10^7 - 10^8 , con buena afinidad y rápido recambio). Por otra parte, los derivados de alanina y glicina pueden ser considerados muy buenos sustratos para morrenaina b II (valores de k_{cat}/K_m en el orden de 10^5).

En medios no convencionales morrenaina b II resulta muy estable en un sistema monofásico conteniendo N,N-dimetilformamida al 30% manteniendo un 80% de la actividad caseinolítica inicial luego de permanecer 60 minutos en este medio con agitación suave y constante. También manifiesta elevada estabilidad en un sistema heterogéneo con 50 % de n-heptano en el cual retiene un 70% de actividad residual luego de 60 minutos de incubación. No presenta el mismo comportamiento en presencia de cloroformo al 50% ya, que a los 20 minutos de contacto pierde más de un 50% de actividad y a los 60 minutos prácticamente se inactiva en forma total. Por su parte, morrenaina o II no es tan estable en solventes orgánicos, ya que con N,N-dimetilformamida retiene sólo el 40% de actividad luego de 60 minutos. En presencia de cloroformo el comportamiento es muy similar al de morrenaina b II y con n-heptano es estable aún luego de 60 minutos de incubación. Este comportamiento hace presumir que estas enzimas, al igual que ficina y papaína, constituyen fuentes promisorias para ser utilizadas como biocatalizadores en la síntesis de péptidos en medios no convencionales y en determinadas condiciones (Mitin *et al.*, 1984; Monter *et al.*, 1991).

De acuerdo a la secuencia aminoacídica N-terminal determinada para morrenaina b II y morrenaina o II, puede observarse que ellas tienen un grado de homología del 95% pero no son idénticas. También presentan una elevada homología con otras proteasas vegetales

cisteínicas y en mayor grado con las pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae*. El N-terminal de morrenaína b II mostró un grado de identidad superior al 60% con otras proteasas tales como las aisladas de *Zinnia elegans*, *Oryza sativa*, cisteína proteinasa III y IV de *Carica candamarcensis*, papaya proteinasa Ω de *Carica papaya* y las peptidasas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*. Las endopeptidasas que presentan mayor grado de homología con morrenaína o II son la proteinasa I aislada de *Carica candamarcensis* (70%), caricaína II de *Carica papaya* y el precursor de la cadena β de orizaína proveniente de *Oryza sativa*. Es de destacar la elevada identidad de ambas morrenainas con asclepaína a y b, peptidasas aisladas de *Asclepias syriaca*, otro miembro de la familia *Asclepiadaceae* (Lynn *et al.*, 1980b).

El análisis de las secuencias aminoacídicas N-terminales de morrenaína b II y morrenaína o II, revela que la posición de algunos aminoácidos (Pro-2, Pro-15, Lys-10, Val-13, Gly-23 y Trp-26 en la secuencia más larga), así como algunos motivos (SVDWRKK y NQG y FS en la cadena más larga) se conservan notablemente, lo que sugiere que ambas proteasas probablemente comparten un gen ancestral con proteasas cisteínicas obtenidas de especies vegetales no relacionadas taxonómicamente.

Las cuatro proteasas estudiadas presentan propiedades bioquímicas muy similares (pH óptimo, masas moleculares, comportamiento con la temperatura). A pesar de ello, morrenaína b II y morrenaína o II, seleccionadas para su mayor caracterización difieren en la preferencia que manifiestan por sustratos sintéticos del tipo N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de aminoácidos, en los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} , en la eficiencia catalítica dada por la relación k_{cat}/K_m y, a pesar de tener un 95% de homología en la secuencia aminoacídica N-Terminal, son diferentes en su composición aminoacídica y muy similares a otras proteasas cisteínicas vegetales, incluyendo papaína que es considerada como el arquetipo de la familia a la cual pertenecen las asclepaínas hasta ahora estudiadas y a la que obviamente deberían pertenecer las morrenainas.

Estos estudios se encuentran altamente justificados ya que en términos económicos las enzimas proteolíticas representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial, incluidas todas las de origen vegetal, animal o microbiano, es por ello que se proponen como futuras líneas de trabajo:

- continuar con los estudios ultraestructurales de laticíferos en otras especies a fin de corroborar o no el modelo de Marty que explica el origen vacuolar y diagramar un plan de

inmunización para obtener respuestas secundarias de alta afinidad utilizando como antígeno las fracciones de morrenaína b II y morrenaína o II purificadas para lograr una inmunocitocalización de las proteasas.

- continuar con el aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de especies pertenecientes a otros géneros de las *Asclepiadaceae* a los fines de encarar estudios quimiotaxonómicos.

Referencias

-
- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979a). Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. *Biochim. Biophys. Acta* **568**: 111-119.
- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979b). Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. II. Physico-chemical properties of Calotropain-FI and FII. *Biochim. Biophys. Acta* **568**: 120-126.
- Adams, C.A. & R.W. Rinne (1981). The occurrence and significance of dispensable proteins in plants. *New Phytol.* **89**: 1-6.
- Adams, C.W.M. & N.A. Tuquan (1961). The histochemical demonstration of proteases by a gelatin- silver film substrate. *J. Histochem. Cytochem.* **9**: 469.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Anderson, J.W. (1968). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* **7**: 1973-1988.
- Archer, B.L. (1976). Hevamine, a crystalline basic protein from *Hevea brasiliensis* latex. *Phytochemistry* **22**: 633.
- Arenas, P. (1981). Etnobotánica Lengua Maskoy. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires, pp: 278-282.
- Arenas, P. (1983). Nombres y usos de las plantas por los indígenas Maká del Chaco Boreal. *Parodiana* **2** (2): 131-229.
- Arima, K., T. Uchikoba, H. Yonezawa, M. Shimada & M. Kaneda (2000). Cucumisins like protease from the latex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* **53**: 639-644.
- Arnon, R. (1970). Papain. *Methods Enzymol* **19**: 226-244.
- Arribére, M.C., N.S. Priolo, A.A. Cortadi, M.P. Bettioli & N.O. Caffini (1996). Isolation, Purification and partial characterization of a new protease from the latex of fruits of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*). *Acta Farmacéutica Bonaerense* **15** (3): 169-176.
- Arribére, M.C., A.A. Cortadi, M.A. Gattuso, M.P. Bettioli, N.S. Priolo & N.O. Caffini (1998). Comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases. *Phytochem. Anal.* **9**: 1-7.
- Arribére, M.C., S.E. Vairo Cavalli, N.S. Priolo, N.O. Caffini, M. Gattuso & A.A. Cortadi (1999). Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*). *Acta Horticulturae* **501**: 259-268.

-
- Ascenzi, P., G. Sleiter & E. Antonini (1983). Effect of N-substituents on the alkaline hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters of L- α -alanine, α -glycine and β -alanine. *Gazzetta Chimica Italiana* **113**: 859-861.
- Baillon, H (1891). *Histoire Des Plantes*. Tome X Librairie Hachete & Cie, Paris, pp: 221-303.
- Baines, B.S. & K. Brocklehurst (1982). Characterization of papaya peptidase A as a cysteine proteinase of *Carica papaya* L. with active-centre properties that differ from those of papain by using 2,2'-dipyridyldisulphide and 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as reactivity probes. *Biochem. J.* **205**: 205-211.
- Barragán, B.E., M.T. Cruz, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1985). Proteinases of mexican plants. XI. Asclepain g from the latex of *Asclepias glaucescens*. *Rev. Latinoameri. Quím.* **16** (2): 117-119.
- Barrett, A.J., A.A. Kembhavi, M.A. Brown, H. Kirschcke, C.G. Knight, M. Tamai & K. Hanada (1982). L-*trans*-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201**: 189-198.
- Barrett, A., N.D. Rawlings & J.F. Woessner (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, pp: 3,571,1554.
- Belozersky, A., Ya.E. Dunaevsky & N. Voskoboyikova (1990). Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat *Fagopyrum esculentum* seeds. *Biochem. J.* **272**: 677-682.
- Bergman, M. & W.F. Ross (1936). Proteolytic enzymes (VIII). *J.Biol. Chem.* **114**: 717-726.
- Bhalla, P., M. Sing & R. Knox (1986). Application of cytochemical methods for the detection and localization of plant proteolytic enzymes. *En Plant Proteolytic Enzymes*, (Dalling, M., Ed.), Vol. I CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 41-63.
- Björk, I. & K. Ylinenjärvi (1990). Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinase actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* **29**: 1770-1776.
- Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interactions of plant with other organisms. *En Plant Proteolytic Enzymes*, (M.J. Dalling, ed.), Vol. I CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 68-96.
- Bond, H.M. & D.J. Bowles (1983). Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates. *Plant Physiol.* **72**: 345-370.
- Boodle, L. (1916). A method of macerating fibres. *Royal Bot. Gard. Kew Bull. Micellaneous Inf.* **4**, pp: 108-110.

-
- Boyde, H., E. Bailey, S. Jones & A. Tamarin (1977). Dimensional Changes During Specimen Preparation for Scanning Electron Microscopy. *Scanning Electron Microscopy Vol. I*, pp: 507-518.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brockbank, W.J. & K.R. Lynn (1979). Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). *Biochim. Biophys. Acta* **578**: 13-22.
- Brocklehurst, K., B.S. Baines & M.P. Kierstan (1981). Papain and other constituents of *Carica papaya* L.. *Top. Enzyme Fermentation Biotechnol.* **5**: 262-335.
- Brocklehurst, K. & E. Salih (1983). Nomenclature of papaya proteinases. *Biochem. J.*, **213**: 559.
- Brown, R. (1811). On the *Asclepiadeae*, a natural order of plants separated from the *Apocynae* of Jussieu. *Mem. Wernerian Nat. Hist. Soc.* **1**: 12-78. Reproducido en 1867 en *Miscellaneous Bot. Works of R. Brown II*: 193-247, en *Darwiniana* **23** (2-4): 368.
- Buvat, R (1989). Ontogeny, all differentiation and structure of vascular plants. Springer-Verlag, Berlín, pp: 533-557.
- Caffini, N.O., C.L. Natalucci, N.S. Priolo & M.S. Buttazzoni (1989). Nuevas preparaciones enzimáticas proteolíticamente activas de posible aplicación en procesos industriales. *SAFYBI* **29**: 2773-2780.
- Caffini, N.O., Arribére, M.C. & N.S. Priolo (1990). Desarrollo de un equipo sencillo para la realización simultánea de reacciones enzimáticas en sistemas de dos fases. *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 183-185.
- Carpenter, D.C. & F.E. Lovelace (1943). The Isoelectric Point of Asclepain. *J. Amer. Chem. Soc.* **65**: 2364-2365.
- Castro, M. (1986). Anatomía del fruto de *Araujia hortorum* E. Fourn. (*Asclepiadaceae*). *Parodiana* **4** (2): 195-203.
- Cesti, P., F. Francalanci & M. Foa (1986). Catalisis Enzimatica in Solvente Organico. *La Chimica e la Industria* **68**: 11-15.
- Chakrabarti, C., S. Biswas, S. Kundu, M. Sundd, M.V. Jagannadham & J.K. Dattagupta (1999). Crystallization and preliminary X-ray analysis of ervatamin B and C, two thiol proteases from *Ervatamia coronaria*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* **55** (5): 1074-1075.

-
- Cohen, A. (1977). A Critical Look at Critical Point Drying, Theory, Practice and Artefacts. Scanning Electron Microscopy Vol. I, pp: 525-536.
- Cohen, A. (1979). Critical Point Drying - Principles and Procedures. Scanning Electron Microscopy Vol. II, pp: 303-323.
- Cohen, L.W., C. Fluharty & L.C. Dihel (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene* **48**: 219-227.
- Cohen, L.W., C. Fluharty & L.C. Dihel (1990). Synthesis of papain in *Escherichia coli*. *Gene* **88**: 263-267.
- Cordeiro, M., P.E. Brodelius & S.M. Pais (1998). Cyprosin". En Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 839-842.
- Cronquist, A. (1968). The Evolution and classification of Flowering Plants. Ed. Houghton Mifflin Company, Boston, pp: 284-286.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, pp: 851-882.
- Cronquist, A. (1988). The Evolution and Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden, pp: 224, 417-420, 512.
- Curotto, E., G. González, S. O Reilly & G. Tapia (1989). Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*. *FEBS Lett.* **243**: 363-365.
- D'Alessandro A. (1915). El Tasi. Galactógeno ideal. *Semana Médica* **27**: 1-24.
- D'Ambrogio, A. (1986). Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur, Argentina, pp: 18-33, 60-63.
- Dalkin, K., S. Marcus & D. J. Bowles (1983). Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on concanavalin A. *Planta* **157**: 531-535.
- de Amorín, A., H.R. Borba, J.P. Carauta, D. Lopes & M.A. Kaplan (1999). Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J. Ethnopharmacol.* **64**: 255-258.
- Dekeyser P.M., S. De Smedt, J. Demeester & A. Lauwers (1994). Fractionation and purification of the thiol proteinases from papaya latex. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **651** (1): 203-208.
- Denker, H. (1974). Protease substrate film test. *Histochemistry* **38**: 331.
- Dixon, M. & E. Webb (1979). Enzymes. Academic Press, New York, pp: 164-169.

-
- Domínguez, J. (1903). Datos para la Materia Médica. Tomo I. Ed. La Semana Médica. Buenos Aires, pp: 184-187.
- Domínguez, J. (1928). Contribución a la Materia Médica Argentina. Ed. Peuser, Buenos Aires, pp: 116.
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen & B.G. Wolthers (1968). Structure of papain. *Nature* **218**: 929-932.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28** (3): 350-356.
- Dubois, T., T. Kleinschmidt, A.G. Schnek, Y. Looze & G. Braunitzer (1988). The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. II. Primary structure of proteinase Omega. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* **369** (8): 741-754.
- Dunn, B.M. (1989). Determination of protease mechanism. En *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*, (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, pp: 63-65.
- Dussourd, D. (1993). Foraging with Finesse: Caterpillar Adaptations for Circumventing Plant Defenses. En *Caterpillars: Ecological and Evolutionary constraints on foraging*, Chapman and Hall, New York, pp: 92-131.
- Endress, M. (2000). A revised classification of the *Apocynaceae* s.l.. *The Botanical Review* **66** (1): 1-56.
- Englund, P.T., T.P. King, L.C. Craig & A. Walti (1968). Studies on Ficin I. Its isolation and characterization. *Biochemistry* **7**: 163-175.
- Esau, K (1965). Anatomía vegetal. Ediciones Omega, Barcelona, pp: 340-365.
- Fahn, A (1979). Secretory tissues in plants. Academic Press, Londres, pp: 223-243.
- Fahn, A & D. Cutler (1992). Xerophytes. Gebrüder Borntraeger, Berlin, pp: 10-14.
- Farmacopea Nacional Argentina, 1º edición (1898). Ministerio de Bienestar Social, Argentina, pp: 446-448.
- Filipov, A. (1997). La farmacopea natural en los sistemas terapéuticos de los indígenas Pilagá. *Parodiana* **10** (1-2): 35-74.
- Fratello, B. (1968). Enhanced interpretation of tissue protease activity by use of photographic color film as a substrate. *Stain Technol* **43**: 125.
- Giordani, R. (1978). Cellular autophagy and differentiation of non articulated laticifers of an Asclepiade. *Biol. Cell.* **33** (3): 253-260.

-
- Glazer, A.N. & E.L. Smith (1971). Papain and other plant proteolytic enzymes. En *The enzymes* (P.D. Boyer, ed.), Academic Press, New York, vol. **III** pp: 501.
- Greenberg, D.M. & T. Winnick (1940). Plant proteases II. pH-activity curves. *J. Biol. Chem.* **135**: 775-780.
- Good, N.E. & S. Izawa (1972). Hidrogen ion buffers. *Methods in Enzymology* **24**: 53-68.
- Haberlandt, G. (1965). *Physiological plant anatomy* 4ta. Ed. Today & Tomorrow's Book Agency, New Delhi, pp: 5.
- Hall, J.L. & C. Hawes (1991). *Electron Microscopy of Plants Cells*. Ed. Academic Press, London, New York, pp: 32-64.
- Hara, I. & H. Matsubara (1980). Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin. V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds. *Plant Cell Physiol.* **21**: 219-232.
- Hartley, B.S. (1960). Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
- Hickey, L. (1974). Clasificación de la Arquitectura de las hojas de Dicotiledóneas. *Bol. Soc. Arg. Bot* **16** (1-2): 1-26.
- Hieronymus, J. (1882). *Plantae diaphoricae florum argentinæ*. *Bol. Acad. Nac. Cs. Córdoba* **IV** (IV): 370-371.
- Holmgren, P.K., N.H. Holmgren & L.C. Barnett (1990). *Index Herbariorum. Part I: The Herbaria of the World*. New York Botanical Garden, Bronx, pp: 452.
- Hussain, S.S. & G. Lowe (1970). The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues, and the buried cysteine residue in Ficin. *Bioche. J.* **117**: 333-340.
- Ipohorski, M & M. Marrapodi (1981). Interpretación de Imágenes en Microscopía Electrónica de Barrido. Comisión Nacional de Energía Atómica Argentina, pp: 1-51.
- Ipohorski, M. & N. Marccone (1985). Microanálisis Dispersivo en Energía en el Microscopio Electrónico de Barrido. Comisión Nacional de Energía Atómica Argentina, pp: 1-21.
- Jaffé, W.G. (1943). Hurain, a new plant protease from *Hura crepitans*. *J. Biol. Chem.* **149**: 1-7.
- Jaziri, M., T. Kleinschmidt, V. Walreavens, A. G. Schnek & Y. Looze (1994). Primary structure of CC-III, the glycosylated cysteine proteinase from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375** (6): 379-385.
- Johansen, D.(1940). *Plant microtechnique*. Ed. Mc. Graw Hill, New York, pp: 184-202.

-
- Jones, I.K. & A.N. Glazer (1970). Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases ("ficins") of *Ficus glabrata* latex. *J. Biol. Chem.* **245**: 2765-2772.
- Jussieu, A.L. (1789). Gen. Plant.: 143-151. En *Darwiniana* **23** (2-4): 368.
- Kamphuis, I.G., K.H. Kalk, M.B.A. Swarte & J. Drenth (1984). Structure of papain refined at 1.65Å resolution. *J. Mol. Biol.* **179**: 233-256.
- Kaneda, M. & N. Tominaga (1975). Isolation and characterization of a proteinase from sarcocarp of melon fruit. *J. Biochem. (Tokyo)* **78**: 1287-1296.
- Kaneda, M. & N. Tominaga (1977). *Phytochemistry* **16**: 345.
- Kaneda, M., A. Sobue, S. Eida & N. Tominaga (1986). *J. Biochem.* **99**: 569.
- Kaneda, M. & T. Uchikoba (1994). Protease from the sarcocarp of *Trichosantes bracteata*. *Phytochemistry* **35**: 583-586.
- Kaneda, M., H. Yonesawa & T. Uchikoba (1995). Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**: 215-222.
- Kervinen, J. (1998). Aspartic Peptidases. En Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 836-839.
- Khan, I.U. & L. Polgár (1983). Purification and characterization of a novel proteinase, chymopapain S. *Biochim. Biophys. Acta* **760**: 350.
- Kimmel, J.R. & E.L. Smith (1957). The properties of papain. *Adv. Enzymol.* **19**: 267-334.
- Klibanov, A.M. (1986). Enzymes that work in organic solvent. *Chemtech.* **16**: 354-359.
- Kortt, A.A., S. Hamilton, E.C. Webb & B. Zerner (1974a). Ficins (EC 4.22.3.). Purification and characterization of the enzymatic components of the latex of *Ficus glabrata*. *Biochemistry* **13**: 2023-2028.
- Kortt, A.A., J.A. Hinds & B. Zerner (1974b). On the specificity and pH dependence of ficin-catalyzed hydrolyses. Some comparisons with bromelain specificity. *Biochemistry* **13**: 2029-2037.
- Kramer, D.E. & J.R. Whitaker (1964). *Ficus* enzymes II. Properties of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* variety Kadota. *J. Biol.* **239**: 2178-2183.
- Kundu, S., M. Sundd & V.J. Medicherla (2000). Purification and Characterization of a stable Cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 171-179.

-
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lifchitz, A. (1985). Plantas Medicinales Ed. Kier Buenos Aires, pp: 189.
- Lillo, M. (1919). Las Asclepiadáceas Argentinas. *Physis* **IV**: 410-437.
- Lillo, M. (1921). Las Asclepiadáceas de la República Argentina. *Physis* **V**: 112-117.
- Lindley, J. (1847). *Veg. Kind.*: 623. En Genera et Species Plantarum Argentinarum Tomus II-Pars Unica. *Asclepiadaceae* exposuit T. Meyer, Instituti Michaelis Lillo, Universitatis Nationalis Tucumanensis, pp: 1.
- López, L.M.I., C.L. Natalucci, N.O. Caffini & E. Curotto (1993). Isolation and partial characterization of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* ("osage orange") fruits. *Acta Alimentaria* **22** (2): 131-142.
- López, L.M.I., C.L. Natalucci, N.S. Priolo, M.C. Arribére & N.O. Caffini (1994). Proteasas de plantas superiores II. Ficina (EC3.4.22.32). *Acta Farm. Bonaerense* **13** (2): 123-131.
- López, L.M.I. (1995). Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de látex de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (*Moraceae*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Loomis, W.D. & J. Battaile (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**: 423-438.
- Lynn, K.R. & M. Yaguchi (1979). N-Terminal homology in three cysteinyl proteinases from *Papaya* latex. *Biochim. Biophys. Acta* **581**: 363-364.
- Lynn, K.R., W.J. Brockbank & N.A. Clevette (1980a). Multiple forms of the asclepains, cysteinyl proteases from milkweed. *Biochim. Biophys. Acta* **612**: 119-125.
- Lynn, K., M. Yaguchi & C. Roy (1980b). Homologies of the N-terminal sequences of Asclepains and Papain. *Biochimica et Biophysica Acta* **624**: 579-580.
- Lynn, K.R. (1983). Definition of the site of reactivity of the ancestral protease of the papain type. *Phytochemistry* **22**: 2845-2847.
- Lynn, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1985). Ficine E, a serine protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* **25**: 1559-1561.
- Lynn, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1986). Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **25**: 2279-2282.

-
- Lynn, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1988). Proteases of *Euphorbiaceae*. *Phytochemistry* **27**: 45-50.
- Mahlberg, P. (1959). Karyokinesis in the non-articulated laticifers of *Nerium oleander* L.. *Phytomorphology* **9**: 110-118.
- Mahlberg, P. (1961). Embryogeny and histogenesis in *Nerium oleander* L.II. Origin and Development of the non-articulated laticifers. *Am. J. Bot.* **48**: 90-99.
- Mahlberg, P. (1963). Development of non-articulated laticifers in seedling axis of *Nerium oleander* L.. *Bot. Gaz.* **124**: 224-231.
- Mahlberg, P. & P. Sabharwal (1968). Origin and early development of nonarticulated laticifers in embryos of *Euphorbia marginata*. *Am. J. Bot.* **55** (3): 375-381.
- Mahlberg, P. (1993). Laticifers: An historical perspective. *The Botanical Review* **59** (1): 1-23.
- Malme, G. (1909). Über die Asclepiadaceen-Gattungen *Araujia* Brotero und *Morrenia* Lindley. *Arkiv För Botanik Band* **8** (1): 1-30.
- Mantell, S.H., J.A. Mathews & R.A. McKee (1985). Principles of plant biotechnology. Blackwell Sci. Pub., Oxford pp: 207-212.
- Martínez Crovetto, R. (1964). Estudios Etnobotánicos I. Nombres de plantas y su utilidad, según los indios tobas del este del Chaco. *Bonplandia* **1**: 279-333.
- Martínez Crovetto, R. (1981). Las plantas utilizadas en Medicina Popular en el NO de Corrientes (R.A.). *Miscelánea* N° **69**, Fundación Miguel Lillo: 87.
- Marty, F. (1978). Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (2): 852-856.
- Marzocca, A. (1997). Vademecum de Malezas Medicinales de la Argentina, Indígenas y Exóticas. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, pp: 282-283.
- Mauseth, J. (1988). Plant Anatomy. Vol. I The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc, pp: 141-161.
- Mc Donald, J. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem. J.* **17**: 773-785.
- Ménard, R. & A. Storer (1998). Papain. En Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 555-557.
- Mercer, E. & M. Birbeck (1972). Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos. Ed. Blume, Madrid, pp: 4-35.

-
- Metcalf, C.R. & L. Chalk (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol. II Clarendon Press, Oxford, pp: 917-925.
- Meyer, T. (1944). *Asclepiadaceae*. En H.R. Descole. *Gen. Spec. Plant. Argent.* 2: 1-273.
- Meyer, T. (1950). *Asclepiadaceae argentinenses novae aut criticae*, IV. *Lilloa* 23: 49-60.
- Meyer, T. (1970). *Asclepiadaceae argentinenses novae aut criticae*, V. *Lilloa* 33: 71-84.
- Meyer, T. (1977). *Asclepiadáceas*. En T. Meyer, *Flora Ilustrada de la Provincia de Tucumán* 1: 139-271.
- Meyer, T. & N. Bacigalupo (1979). *Asclepiadaceae*. En A. Burkart, *Flora Ilustrada de Entre Ríos-Argentina*. Colección Científica del INTA, 6 (5): 103-147.
- Milanez, F. (1952). Sobre os núcleos dos laticíferos de *Euphorbia phosphorea* Mart. *Rodriguésia* 15: 163-175.
- Milanez, F. & H. Neto (1956). Origem dos laticíferos do embrião de *Euphorbia pulcherrima*, Willd. *Rodriguésia* 18: 351-395.
- Mitchel, R.E., I.M. Chaiken & E.L. Smith (1970). The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. *J. Biol. Chem.* 245 (14): 3485-3492.
- Mitin, Yu.V., N.P. Zapevalova & E.Yu. Gorbunova (1984). Peptide synthesis catalyzed by papain at alkaline pH values. *Int. J. Peptide Protein Res.* 23: 528-534.
- Monter, B., B. Herzog, P. Sthele & P. Fürst (1991). Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 14: 183-191.
- Moreau, T. & H. Choplin (2000). Prolysis, <http://delphi.phys.univ.tours.fr/Prolysis>.
- Moutim, V., L.G. Silva, M.T.P. Lopes, G. Wilson Fernandes & C.E. Salas (1999). Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Science* 142: 115-121.
- Mutlu, A. & S. Gal (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum* 105: 569-576.
- Noh, Y.S. & R.M. Amasino (1999). Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* 41 (2): 195-206.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1984). *Enzyme Nomenclature* (1984). Academic Press, New York-London, pp: 330-366.

-
- O'Braien, T. & M. Mc Cully (1981). The study of plant structure principles and selected methods. Ternmarcarphi Pty Ltd. Melbourne, Australia, pp: 5.1-5.14.
- Obregón, W., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N. Caffini & N. Priolo (2001). Two New Cysteine Endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* Fruits. *Journal of Protein Chemistry* **20** (4): 317-325.
- Ogundipe, O. (1993). Studies of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F.: The anatomy of stem. *Phytomorphology* **43** (3-4): 147-152.
- Pal, G. & N.K. Sinha (1980). Isolation, crystallization, and properties of Calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **202** (2): 321-329.
- Perelló, M., M.C. Arribére, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2000). Proteolytic enzymes from the latex of *Ficus pumila* L. (*Moraceae*). *Acta Farm. Bonaerense* **19** (4): 257-262.
- Peterson, G.L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Roserbrough, Far and Randall. *Anal. Biochem* **100**: 201-220.
- Pires, E. (1998a). Cardosin A. En Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 843-844.
- Pires, E. (1998b). Cardosin B. En Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 844-846.
- Pontiroli, A (1983). *Asclepiadaceae*. En A. Cabrera, Flora Provincia de Jujuy. Colección Científica del INTA **13** (8): 116-175.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L. López & N. Caffini (2000). Isolation and Characterization of a Cysteine protease from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. *Journal of Protein Chemistry* **19** (1): 39-49.
- Ragonese, A. & R. Martínez Crovetto (1947). Plantas indígenas de la Argentina con frutos o semillas comestibles. Ministerio de Agricultura de la Nación, pp: 201-202.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**: 205-218.
- Robbins, B.H. (1930). A proteolytic enzyme in ficin, the antihelminthic principle of leche de higuerón. *J. Biol. Chem.* **87**: 251-257.
- Robbins, B.H. & P.D. Lamson (1934). Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and related trees. *J. Biol. Chem.* **106**: 725-728.
- Robinson, G.W. (1975). Isolation and characterization of papaya peptidase a from commercial chymopapain. *Biochemistry* **14**: 3695-3700.

-
- Rodríguez-Romero, A. & A. Hernández-Arana (1998). Asclepain. En *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J.F. Woessner eds., Academic Press, London, pp: 576-578.
- Roland, J.C. & B. Vian (1991). General preparation and staining of thin sections in Electron Microscopy of Plant Cells. Ed. Hall, J.L. & C. Hawes, Academic Press, London, pp: 1-64.
- Roth, I. (1977). Fruits of Angiosperm., *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Band 10, Teil 1. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, pp: 99, 120.
- Rowan, A.D. & D.J. Buttle (1994). Pineapple cysteine endopeptidases. *Methods Enzymol* **224**: 555-568.
- Rudenskaya, G., E. Bogdanova, L. Revina, B. Golovkin & V. Stepanov (1995). Macluralisin- a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta* **196**: 174-179.
- Rudenskaya, G.N., A.M. Bogacheva, A. Preusser, A.V. Kuznetsova, Ya. E. Dunaevsky, B.N. Golovkin & V.M. Stepanov (1998). Taraxalisin- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb. s.l.. *FEBS Letters* **437**: 237-240.
- Salvesen, G. & H. Nagase (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. En *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*, R.J. Beynon & J.S. Bond, eds., IRL Press, Oxford, pp: 83-84.
- Sarath, G., R.S. de la Motte & F. Wagner (1989). Protease assay methods. En *Proteolytic Enzymes, a Practical Approach*, R.J. Beyon & J.S. Bond, eds. IRL Press, Oxford, pp: 27.
- Schechter, I. & A. Berger (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-162.
- Schulz, A.G. (1937). Las asclepiadáceas del territorio del Chaco. Argentina, *Lilloa* **1**: 347-391.
- Sengupta, A., D. Bhattacharya, G. Pal & N.K. Sinha (1984). Comparative studies on calotropins DI and DII from the latex of *Calotropis gigantea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**: 17-25.
- Sgarbieri, V.C., S.M. Gupte, D.E. Kramer & J.R. Whitaker (1964). *Ficus* enzymes. I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. *J. Biol. Chem.* **239**: 2170-2177.
- Silverstein, R.M. (1974). The assay of the bromelains using N-CBZ-L-lysine-*p*-nitrophenylester and N-CBZ-L-glicine-*p*-nitrophenylester as substrates. *Analytical Biochem.* **62**: 478-484.

-
- Solereder, H. (1908). Systematic anatomy of the Dicotyledons. Vol. II Clarendon Press, Oxford, pp: 534-537.
- Soraru, S & B. Bandoni (1978). Plantas de la Medicina Popular Argentina. Ed. Albatroz, Buenos Aires, pp: 27-29.
- Strittmater, C. (1973). Nueva Técnica de diafanización. *Bol. Soc. Arg. Bot.* **15** (1): 126-129.
- Strittmater, C. (1979). Modificación de una técnica de coloración Safranina Fast Green. *Bol. Soc. Arg. Bot.* **18** (3-4): 121-122.
- Strittmater, C. (1980). Coloración con Violeta de Cresyl. *Bol. Soc. Arg. Bot.* **19** (12): 273-276.
- Sugiura, M. & M. Sasaki (1974). Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Horaishi. V. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S). *Biochim. Biophys. Acta* **350**: 38-47.
- Summer, I., A. Vaughan, R. Eisenthal, R. Pickersgill, A. Owen & P. Goodenough (1993). Kinetic analysis of papaya proteinase omega. *Biochimica et Biophysica Acta* **1164**: 243-251.
- Sundd, M., S. Kundu, G.P. Pal & J.V. Medicherla (1998). Purification and characterization of a highly stable cysteine protease from the latex of *Ervatamia coronaria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** (10): 1947-1955.
- Swarupanandan, K., J. Mangaly, T.K. Sonny, K. Kishorekumar & S. Chand Basha (1996). The subfamilial and tribal classification of the family *Asclepiadaceae*. *J. Linn. Soc. Bot.* **120**: 327-369.
- Syu, W.J., S.H. Wu & K.T. Wang (1983). Purification of papain by affinity chromatography. *J. Chromatogr.* **262**: 346-351.
- Tablero, M., R. Arreguín, B. Arreguín, M. Soriano, R.I. Sánchez, A. Rodríguez Romero & A. Hernández-Arana (1991). Purification and characterization of multiple forms of Asclepain g from *Asclepias glaucescens* H.B.K.. *Plant Sci.* **74**: 7-15.
- Taylor, M.A.J., K.C. Baker, I.F. Connerton, N.J. Cummings, G.W. Harris, I.M. Henderson, S.T. Jones, R.W. Pickersgill, I.G. Sumner, J. WarWicker & P.W. Goodenough (1994). An unequivocal example of cysteine proteinase activity affected by multiple electrostatic interactions. *Prot. Eng.* **7**: 1267-1276.
- Toursarkissian, M. (1980). Plantas Medicinales de la Argentina. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp: 12.
- Trejo, S., L. López, C. Cimino, C. Natalucci & N. Caffini (2000). Purificación y caracterización de una nueva endopeptidasa a partir del látex de *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*). *Revista Latinoamericana de Química* **28**: 218, Suplemento Especial.

-
- Uchikoba, T., H. Yonezawa & M. Kaneda (1995). Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease. *J. Biochem.* **117**: 1126-1130.
- Uhlig, H. (1998). Industrial Enzymes and their applications. Jhon Wiley & Sons Ed., pp: 146-151.
- Umezawa, H. (1976). Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Meth. Enzymol.* **45**: 678-695.
- Vairo Cavalli, S., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N. Caffini & N. Priolo (2001). Comparison of Two Cysteine Endopeptidases from Latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*). *Biol. Chem.* **382**: 879-883.
- Van Steveninck, R. & Van Steveninck, M. (1991). Microanalysis in Electron Microscopy of Plant Cells. Ed. Hall, J.L. & C. Hawes, Academic Press, London pp: 415-456.
- Vernet, T., J. Chatellier, D.C. Tessier & D.Y. Thomas (1993). Expression of functional papain precursor in *Saccharomyces cerevisiae*: rapid screening of mutants. *Protein Eng.* **6**: 213-219.
- Vierstra, R.D. (1996). Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* **32**: 275-302.
- Wallis, T.E. (1965). Manual de Farmacognosia. Ed. Continental, México, pp: 138.
- Wallis, T.E. (1968). Microscopía Analítica., Ed. Acribia, España, pp: 253-254.
- Walreavens, V., M. Jaziri, J. van Beeumen, A.G. Schnek, T. Kleinschmidt & Y. Looze (1993). Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374** (7): 501-506.
- Walreavens, V., M.C. Vandermeers-Piret, A. Vandermeers, P. Gourlet & P. Robberecht (1999). Isolation and primary structure of the CC-I papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biol. Chem.* **380** (4): 485-488.
- Watanabe, H., K. Abe, Y. Emori, H. Hosoyama & S. Arai (1991). Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J. Biol. Chem.* **266** (25): 16897-16902.
- Westergaard, J.L., C. Hackbarth, M.W. Treuhaft & R.C. Roberts (1980). Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *J. Immunol. Meth.* **34**: 167-175.
- Williams, D.C., V.C. Sgarbieri & J.R. Whitaker (1968). Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant Physiol.* **43**: 1083-1088.

-
- Williams, D.C. & J.R. Whitaker (1969). Multiple molecular forms of *Ficus glabrata* ficin. Their separation and relative physical, chemical, and enzymatic properties. *Plant Physiol.* **44**: 1574-1583.
- Willmer, C. (1986). Los estomas. Ed. Librería Agropecuaria, Buenos Aires, pp: 13-35.
- Wilson, K. & P. Mahlberg (1978). Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (*Asclepiadaceae*). *Am. J. Bot.* **65**: 98-109.
- Wilson, K., C. Nessler & P. Mahlberg (1976). Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development. *Am. J. Bot.* **63**: 1140-1144.
- Winnick, T., A.R. Davis & D.M. Greenberg (1940). Physicochemical properties of the proteolytic enzyme from the latex of the milkweed, *Asclepias speciosa* Torr. some comparisons with other proteases. *J. Gen. Physiol.* **23**: 275-288.
- Ye, Z. & J. Varner (1993). Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Mol. Biol.* **30** (6): 1233-1246.
- Zuloaga, F. & O. Morrone (1999). Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Dicotyledoneae. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* **74**: 78-98.

Abreviaturas

EC	Enzyme Commission del NC-IUBMB.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético (sal sódica).
k_{cat}	constante catalítica.
kDa	kilo Dalton.
K_m	constante de Michaelis.
LP	luz polarizada.
MEB	microscopio electrónico de barrido.
MET	microscopio electrónico de transmisión.
MO	microscopio óptico.
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida.
PVDF	Difluoruro de polivinilo.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION

A...

Fecha 12-11-07

Inv. # inv. 56985