

## Estudio Preliminar de "Macrodontina", una Nueva Cisteinilproteinasas Aislada de Frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)

Adriana BRULLO, Rosana M. HILAL, Claudia L. NATALUCCI\* y Néstor O. CAFFINI\*

LIPROVE, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Casilla de Correo 711, 1900 La Plata, Argentina

**RESUMEN.** De los frutos semimaduros del "ihvirá" (*Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)) se ha logrado aislar y caracterizar parcialmente una proteasa sulfhidrúlica ("macrodontina") con actividad destacada entre pH 7 y 10. Las preparaciones parcialmente purificadas (precipitados acetónicos) son relativamente estables a temperaturas inferiores a 45 °C y no se alteran por congelamiento o liofilización. Una ulterior purificación por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose Fast Flow) permite detectar dos fracciones activas, que son bien resueltas por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75). Por electroforesis (SDS-PAGE) del precipitado acetónico se detectan seis fracciones proteicas (entre 14 y 67 kDa), pero el zimograma revela que sólo tres de ellas tienen actividad caseinolítica, de pesos moleculares de alrededor de 27, 30 y 54 kDa.

**SUMMARY.** "Preliminary Study of "Macrodontin", a New Cysteinylprotease isolated from Fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)". From immature fruits of *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms, known as "ihvirá" in the northeast of Argentina, has been isolated and partially characterized a sulfhydryl-protease highly active between pH 7 and 10. The acetonetic precipitates are quite stable at temperatures below 45 °C and not affected by freezing or liohylyzation. Anionic exchange chromatography (DEAE-Sepharose Fast Flow) affords two active fractions, both well resolved by gel filtration (Sephadex G-75). The electrophoretic pattern (SDS-PAGE) of the acetonetic precipitate shows six protein fractions, between 14 and 67 kDa, but the zymogram reveals the presence of three active fractions, of about 27, 30, and 54 kDa.

### INTRODUCCION

Las principales aplicaciones farmacológicas de las proteasas han estado relacionadas con el tratamiento de parasitosis intestinales, trastornos digestivos y procesos inflamatorios <sup>1</sup>. Más recientemente se ha comunicado una presunta acción citostática de bromelina <sup>2</sup> y el uso de quimopapaína en la terapéutica de las hernias de disco intervertebrales <sup>3</sup>.

**PALABRAS CLAVE:** Fitoproteasas, Proteinasas, Macrodontina, *Pseudananas macrodentes*, *Bromeliaceae*, Purificación de Enzimas.

**KEY WORDS:** Plant Proteases, Proteinases, Macrodontin, *Pseudananas macrodentes*, *Bromeliaceae*, Enzyme Purification.

\* Miembros de la Carrera del Investigador. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

Las *Bromeliaceae* constituyen una de las pocas familias de plantas superiores caracterizadas por poseer proteasas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias, razón por la cual muchas de sus especies han sido estudiadas en tal sentido. La representante más conspicua (a su vez la más usada en farmacoterapia) es la bromelina <sup>4</sup>, obtenida partir de tallos y frutos del ananá (*Ananas comosus* (L.) Merrill), pero también se han aislado y caracterizado proteasas de los frutos de *Bromelia pinguin* L.<sup>5,6</sup>, *B. plumieri* (*B. karatas*)<sup>7-9</sup>, *B. sylvestris*<sup>7,8</sup>, *B. hemispherica*<sup>7,8</sup>, *B. palmeri*<sup>7,8</sup>, *B. serra* Griseb.<sup>10</sup>, *B. balansae* Mez<sup>11</sup>, *B. hieronymi* Mez<sup>12</sup> y *B. lacintosa* Mart.<sup>13</sup>.

En el presente trabajo se comunica el aislamiento y caracterización parcial de "macrodotina", una enzima sulfhidrúlica obtenida a partir de frutos semimaduros de *Pseudananas macrodotes* (Morr.) Harms.

## MATERIALES Y METODOS

### **Material vegetal**

Se utilizaron frutos bien desarrollados pero no totalmente maduros de *Pseudananas macrodotes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*), conocido como "ihvirá". El material estudiado fue recolectado por el Dr. Aníbal G. Amat en mayo de 1993 en Santa Ana, Departamento de Candelaria (Pcia. de Misiones, Argentina), y conservado a -20 °C hasta su procesamiento.

*P. macrodotes* es una planta terrestre, estolonífera, provista de numerosas hojas arrosetadas, largas y armadas de aguijones en los márgenes y ápices. Los frutos (sincarpios) son de menor tamaño que el ananá (10 a 15 cm de largo), amarillentos cuando maduran, aromáticos y comestibles, aunque fibrosos, y las hojas y estolones suministran fibra textil <sup>14</sup>.

### **Obtención del extracto crudo**

Todas las etapas de extracción y purificación se llevaron a cabo a 0-4 °C. Los frutos congelados (50 g) se trozaron y procesaron durante 1 min en una trituradora doméstica en presencia de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6 (250 ml) conteniendo cisteína y EDTA 5 mM. El triturado se filtró sobre una gasa doble para eliminar los restos vegetales y se centrifugó a 6.000 g durante 30 min.

### **Precipitación acetónica fraccionada**

Al extracto crudo obtenido en el paso anterior se le adicionó lentamente 1 vol de acetona fría (-20 °C) y se centrifugó a 6.000 g durante 30 min, desechando el precipitado. Al sobrenadante se le agregaron dos volúmenes de acetona y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado obtenido se redisolvió en agua destilada y se liofilizó, previa eliminación de los restos de acetona por aplicación de vacío.

### **Determinación de la actividad caseinolítica**

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 1,1 ml de solución de caseína (tipo Hammarsten) al 1%, conteniendo cisteína 12 mM y 0,1 ml de solución de la enzima, ambas en buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0. La reacción fue llevada a cabo

a 37 °C y detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5%, luego de lo cual los tubos fueron centrifugados a 4.000 g durante 20 minutos, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm. Para expresar la actividad proteolítica se definió una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica,  $U_{cas}$ ), que corresponde a la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones de ensayo.

### **Determinación del contenido de proteínas e hidratos de carbono solubles**

El contenido total de proteínas fue determinado por el método de Bradford<sup>15</sup>, usando seroalbúmina bovina como estándar. En todos los procedimientos cromatográficos la concentración de proteína se estimó por medida de la absorbancia directa a 280 nm.

El contenido de hidratos de carbono se determinó por el método de Dubois *et al.*<sup>16</sup>.

### **Efecto del pH sobre la actividad proteolítica**

Para obtener el perfil de pH se utilizó caseína en las condiciones antes indicadas, preparada en soluciones 0,1 M de los siguientes buffers: MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS<sup>16</sup> en un rango de pH 5,5 a 10,0.

### **Estabilidad térmica**

Con el objeto de determinar el efecto de la temperatura sobre la preparación enzimática, soluciones de las mismas fueron mantenidas durante 5, 10, 20, 40, 60, 90 y 120 minutos a 17 °C, 37 °C, 45 °C y 65 °C y luego se midió la actividad caseinolítica residual.

### **Cromatografía de intercambio iónico**

El liofilizado redissuelto en agua destilada se sembró en una columna de DE-AE-Sepharose Fast Flow (1,5 cm x 30 cm), se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0,0 - 0,4 M) en buffer Tris-ClH 0,05 M (pH 8,0) a una velocidad de flujo de 17 cm.h<sup>-1</sup> y se recolectaron fracciones de 2,2 ml. La actividad caseinolítica fue determinada luego de 10 min de incubación a 37 °C.

### **Cromatografía de exclusión molecular**

El contenido de los tubos correspondientes a la principal fracción proteolítica se reunió y precipitó con 3 volúmenes de acetona. El precipitado redissuelto en agua se sembró en una columna de Sephadex G-75 (1,5 cm x 30 cm), eluyendo con buffer Tris-ClH 0,2 M (pH 8,0) a una velocidad de flujo de 9,4 cm.h<sup>-1</sup>. La actividad caseinolítica fue determinada luego de 10 min de incubación a 37 °C.

### **Electroforesis y zimograma**

El precipitado acetónico redissuelto en agua se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)<sup>18</sup>. El electroforetograma obtenido fue posteriormente puesto en contacto con un gel de agarosa recubierto superficialmente con caseína e incubado a 60 °C durante 60 min a efectos de detectar las fracciones proteolíticamente activas<sup>19</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los frutos de "ihvirá" estudiados pesan entre 300 y 350 g. El extracto crudo contiene 0,98 mg de proteínas, 9,83 mg de azúcares y una actividad caseinolítica equivalente a 10,73 U<sub>cas</sub> por gramo de frutos. Dado el elevado contenido de azúcares y la presencia de pigmentos, el extracto crudo fue sometido a una purificación inicial por tratamiento con distintas cantidades de acetona, de acuerdo al procedimiento descrito en un trabajo anterior<sup>20</sup>.

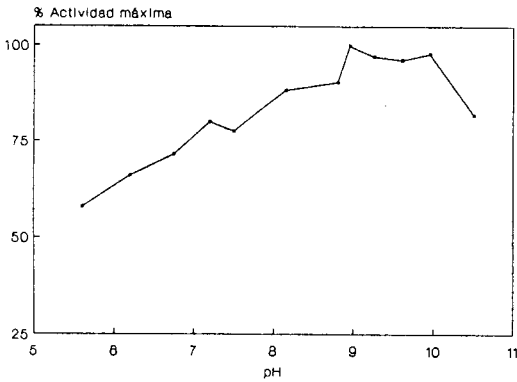
La Tabla 1 muestra los resultados del tratamiento acetónico. El agregado de un volumen de solvente orgánico genera un precipitado (P-1) que contiene el 34,9% de las proteínas presentes en el extracto crudo, pero casi desprovistas de actividad proteolítica (3,9% de la actividad inicial) y el 17,8% de los glúcidos extraíbles de los frutos. El agregado de otro volumen de acetona al sobrenadante obtenido al separar P-1 produce un segundo precipitado (P-2), menos rico en proteínas (10,3%) pero con elevada actividad proteolítica (40,4 % de la actividad inicial) y con menor contenido de azúcares (6,8%). Al agregar un tercer volumen de acetona al sobrenadante obtenido luego de separar P-2 se consigue un tercer precipitado (P-3) con mayor contenido en proteínas que el anterior (16,2%) pero con menor actividad proteolítica (28,3 % de la actividad inicial) y con ínfimo contenido de azúcares (0,6%).

El análisis de estos resultados definió el esquema inicial de purificación. Dado que la actividad caseinolítica de P-1 es despreciable, el mismo fue desechado. P-2 es el que posee la mayor actividad específica, en tanto que P-3, si bien con menor actividad específica, retiene más de la cuarta parte de la actividad del extracto crudo, por lo que finalmente se decidió seguir el procedimiento indicado en Materiales y Métodos, que permite obtener un precipitado acetónico (P-2 + P-3) que contiene un 26,5% de las proteínas y un 68,7% de la actividad inicial, con sólo un 7,4% de los glúcidos, lo que implica un grado de purificación de 2,6 veces.

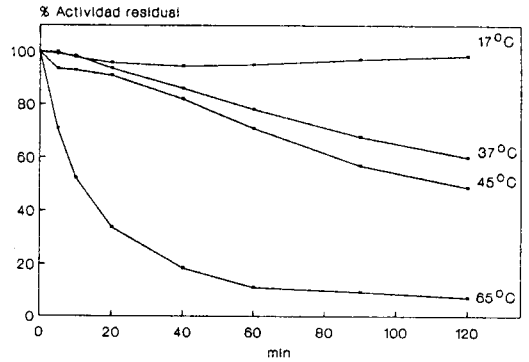
El agregado de cisteína al medio de reacción mejora sensiblemente la actividad caseinolítica de la enzima, siendo máxima cuando la concentración de cisteína es de 12 mM. Por su parte ni el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ni el EDTA afectan la actividad de la enzima, hechos que revelarían que la misma pertenece al grupo de las cisteinil-proteasas.

Muestra	Glúcidos (mg/ml) (%)		Proteínas (mg/ml) (%)		Actividad (Ucas/ml) (%)		Actividad específica
Extracto crudo	2,73	100,0	0,272	100,0	2,928	100,0	10,76
P-1	0,49	17,8	0,095	34,9	0,114	3,9	1,2
P-2	0,19	6,8	0,028	10,3	1,182	40,4	42,21
P-3	0,02	0,6	0,044	16,2	0,828	28,3	18,82
P-2 + P-3	0,21	7,4	0,072	26,5	2,010	68,7	27,92

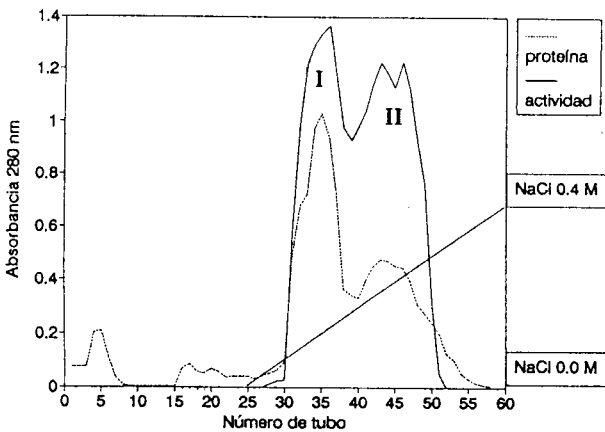
**Tabla 1.** Resultados de la precipitación acetónica fraccionada del extracto crudo (ver detalles en el texto).



**Figura 1.** Efecto del pH sobre la actividad caseinolítica de la enzima parcialmente purificada. La misma fue ensayada a distintos valores de pH, medidos en la mezcla de reacción, durante 5 minutos a 37 °C. Cada valor resulta de promediar 5 determinaciones y las experiencias fueron repetidas dos veces.



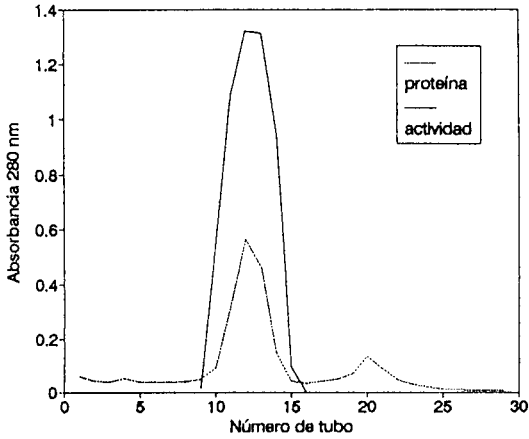
**Figura 2.** Estabilidad térmica de la enzima parcialmente purificada. Las muestras fueron preincubadas a las temperaturas indicadas durante tiempos variables, determinando la actividad caseinolítica residual a 37 °C durante 5 minutos. Cada valor resulta de promediar 5 determinaciones y las experiencias fueron repetidas dos veces.



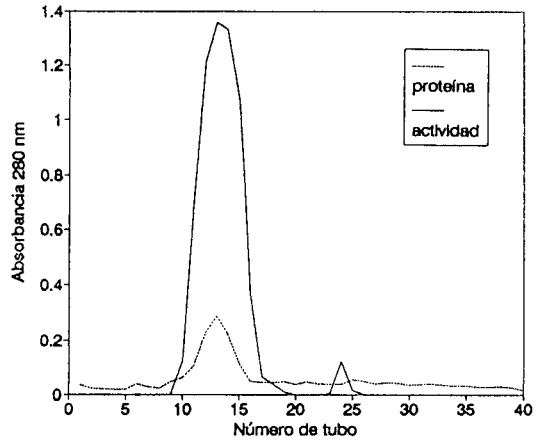
**Figura 3.** Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephadex Fast Flow) de la enzima parcialmente purificada (ver detalles en el texto)

El perfil de pH de la enzima parcialmente purificada se muestra en la figura 1. Se observan valores superiores al 85% de la actividad máxima entre pH 8 y 10, aunque a pH fisiológico la actividad es considerablemente elevada (65 a 80% del valor máximo). La estabilidad térmica de esta preparación está representada en la figura 2. La enzima resulta ser bastante termoestable, ya que al cabo de 1 hora a 45 °C mantiene un 70% de la actividad inicial. Por otra parte, ensayos adicionales han demostrado que tanto el congelamiento como la liofilización no afectan significativamente la actividad enzimática.

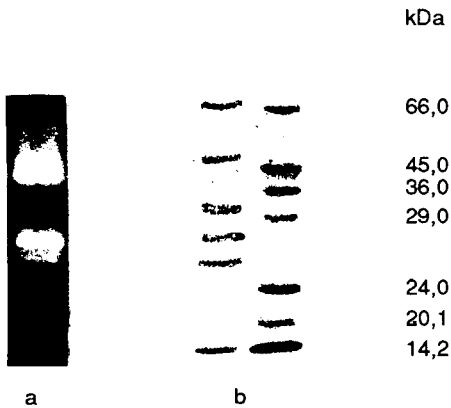
La figura 3 muestra los resultados obtenidos al someter el liofilizado redissuelto del precipitado acetónico a cromatografía de intercambio aniónico. No existen proteínas con actividad proteolítica de pI superior a 8 y durante la aplicación del gradiente salino eluyen dos fracciones activas cuando la concentración de cloruro de sodio es 0,12 M (Fracción I) y 0,23 M (Fracción II), respectivamente.



**Figura 4.** Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) de la Fracción I (ver detalles en el texto)



**Figura 5.** Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) de la Fracción II (ver detalles en el texto)



**Figura 6.** Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de la enzima parcialmente purificada (b) y zimograma de la misma (a). Se utilizaron los siguientes patrones de peso molecular (Sigma): a-lactalbúmina bovina (14,2 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de conejo (36 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y albúmina bovina (66 kDa).

Al someter la Fracción I a cromatografía de exclusión molecular se obtiene una única fracción con actividad enzimática, en tanto que cuando se hace lo propio con la Fracción II se advierte la presencia de una fracción principal y de una segunda casi imperceptible, de mayor peso molecular (Figuras 4 y 5).

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) del precipitado acetónico revela la presencia de seis bandas proteicas, de pesos moleculares entre 14 y 67 kDa. De ellas sólo tres demuestran poseer actividad caseinolítica, detectable a través de un zimograma: una banda principal de alrededor de 54 kDa, una segunda de 30 kDa y una banda menor de 27 kDa (Figura 6).

**Agradecimientos.** Al Dr. Aníbal G. Amat (Universidad Nacional de Misiones, Argentina), por la recolección y determinación del material estudiado. El presente trabajo ha recibido apoyos del CONICET (PID-BID 1119), Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y Departamento Científico del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Caffini, N.O., L.M.I. López, C.L. Natalucci y N.S. Priolo (1988) *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 195-213
2. Batkin, S., S.J. Taussing y J.Szekerczes (1988) *J.Cancer Res. Clin. Oncol.* **114**: 507-8
3. Degema, T.R., S. Swedenberg, S.L. Johnson, M. Madison y D.S. Bradford (1992) *J. Bone Joint Surgery* **74A**: 831-8
4. Cooreman, W.M., S. Scharpé, J. Demeester y A. Lauwers (1976) *Pharm. Acta Helv.* **51**: 73-97
5. Toro-Goyco, E., A. Maretzki y M. L. Matos (1968) *Arch. Biochem. Biophys* **126**: 91-104
6. Toro-Goyco, E., I. Rodríguez-Costas y H. Ehrig (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **622**: 151-9
7. Cruz, M.T., M. del C. Oliver, L.M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1974) *Rev. Latinoamer. Quím.* **5**: 18-25
8. Hernández Arana, A., A. Rodríguez Romero, M.T. Cruz y Victoria y L.M. del Castillo (1983) *Rev. Latinoamer. Quím.* **14**: 95-8
9. Montes, C., M. Amador, D. Cuevas y F. Córdoba (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**: 17-24
10. Caffini, N.O., C.L. Natalucci, N.S. Priolo y M.S. Buttazzoni (1988) *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 9-14
11. Natalucci, C.L., N.S. Priolo, N.O. Caffini y L.M.I. López (1988) *Acta Farm. Bonaerense* **7**: 179-85
12. Priolo, N.S., L.M.I. López, M.C. Arribére, C.L. Natalucci and N.O. Caffini (1991) *Acta Alimentaria* (Budapest) **20**: 189-96
13. Priolo, N.S., M.S. Buttazzoni, N.O. Caffini y C.L. Natalucci (1986) *Acta Farm. Bonaerense* **5**: 159-64
14. Castellanos, A. (1945) "Bromeliaceae", en "Genera et species plantarum argentina-rum" (H.R. Descole, dir.), G. Kraft Ltda., Buenos Aires, Argentina, III, págs. 137 y 157
15. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
16. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith (1956) *Anal. Chem.* **28**: 350-6
17. Good, N.E. y S. Izawa (1972) *Meth. Enzymol.* **24**: 53-68
18. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**: 680-5.
19. Westergaard, J.L., C. Hackbarth, M.W. Treuhart y R.C. Roberts (1980) *J. Immunol. Meth.* **34**: 167-75
20. López, L.M.I., C.L. Natalucci y N.O. Caffini (1989) *Acta Farm. Bonaerense* **8**: 179-85