

ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE *EUPHORBIA PROSTRATA*, *AIT* Y *EUPHORBIA PEPLUS*, L

Por JUAN ROCA,
del Instituto de Biología.

El estudio de las proteasas vegetales tiene gran interés por la facilidad de obtención de las mismas y por la naturaleza de la acción que en muchos casos supera a la de las proteasas de origen animal. Por otra parte, ha sido demostrado, según Whiple, que las encimas proteolíticas hidrolizan prótidos y a la vez los sintetizan en virtud de un equilibrio dinámico, corroborado por Wastenep y Borsook, los que comprobaron que esas encimas pueden catalizar la síntesis de las uniones peptídicas de ciertos péptidos sintéticos, como la benzoil-1-leucina de 1-leucilanilida forma la benzoil-1-leucil-leucilanilida. Esa síntesis provocada por proteasas permite el estudio de varios factores que intervienen en la síntesis de los enlaces peptídicos así como las relaciones energéticas que intervienen en ella.

Si se altera la estructura química de uno de los grupos cercanos a la unión por donde se verifica la hidrólisis, ya no se verifica dicha hidrólisis por la proteasa y al mismo tiempo tampoco será capaz dicha proteasa de catalizar la unión del péptido.

Por otra parte la hidrólisis provocada por las proteasas es espontánea, pero la síntesis necesita acúmulo de energía que puede proporcionarse en varias formas.

La especificidad de las proteasas, como es bien sabido, se refiere a las cimasas que obran sobre substrato, cuyo enlace sobre el que actúan es específico sin tener en cuenta el número de aminoácidos o su naturaleza y de ahí que esas proteasas puedan obrar no sólo sobre substratos complejos o naturales, sino también sobre substratos sencillos, siempre que contengan los enlaces característicos de dicha acción por lo que la especificidad de esa clase de encimas se determina después de estudiar su acción sobre un gran número de substratos sintéticos cuya estructura puede modificarse convenientemente hasta conocer su verdadera acción.

Hacer actuar las proteasas sobre substratos sintéticos tiene la ventaja de que así puede verse si obra sobre los enlaces peptídicos del extremo de la cadena y, en ese caso, se tratará de aminopeptidasas si rompen la unión por el grupo amínico, o bien serán carboxipolipeptidasas si la rotura de la cadena se hace por el grupo carboxílico. Pero la separación de los componentes puede hacerse por los enlaces que están en el centro de la molécula, en cuyo caso se denominan endopeptidasas o proteasas las que verificarán la escisión peptídica por el grupo carboxílico o por el grupo imínico.

Sucede frecuentemente que un mismo extracto contiene varias enzimas que pueden ser proteasas, aminopeptidasas y carboxipolipeptidasas y, como sea difícil aislarlas, la única forma de demostrar su presencia será hacerlos obrar sobre diversos substratos y estudiar posteriormente su acción para ver los enlaces peptídicos que se escinden.

Los prótidos naturales, pueden contener, y de hecho contienen, centenares de moléculas de aminoácidos y cada aminoácido puede repetirse varias veces formando un patrón especial; la presencia con que se repite y el todo resultante determina las propiedades biológicas del prótido.

Para determinar la naturaleza de la acción encimática sobre un prótido es necesario conocer previamente la naturaleza de dicho prótido y se requiere, además, la identificación de los productos separados por hidrólisis, lo que es imposible actualmente. Pero, en realidad, podemos tener una clara orientación, si nos proponemos conocer tan sólo la actividad de las proteasas. En este caso, necesitamos tomar un substrato natural constante, usarlo siempre en las mismas condiciones y calcular la actividad por medio de algunas condiciones preestablecidas que pueden controlarse con relativa facilidad. Por eso, al usar la gelatina como substrato, le denominan algunos investigadores actividad gelatinásica.

Existen varios procedimientos para medir esa actividad; los más importantes son los siguientes: el de F. G. Lenox y W. J. Ellis fundado en la disminución de la viscosidad que ocurre en 10 minutos de incubación a 40°, usando una solución de gelatina al 6.67%, en el viscosímetro de Kock, Orthmann y Degenfelder.

El procedimiento de Lenox que viene a ser un procedimiento análogo al anterior en el que se mide la actividad en 2 minutos observada en el viscosímetro ideado por Lenox.

El micrométodo de Grace E. Pickford en el que se utilizan placas de gelatina en condiciones apropiadas.

El método del formol, de J. H. Northrop. El procedimiento aproximado de A. K. Balls, M. B. Mathock e I. W. Tucker.

Por último el de Willstatter y Waldschmidt-Leitz que ha sufrido diversas modificaciones, entre ellas la de Macrae. Nosotros hemos seguido este último procedimiento.

Euphorbia prostrata, Ait. Sólo dispusimos de muy pequeña cantidad de planta la que, una vez desmenuzada, se puso a macerar con agua destilada por 24 horas; se exprimió, filtró y trató con exceso de alcohol de 96°, hasta que no se formó más precipitado y se recogió éste en un filtro adecuado. El precipitado se trató por agua: sólo se disolvió una pequeña parte y se diluyó de tal modo que 1 c. c. equivale a 1 gramo de planta. El pH de la solución fué de 6.5.

Se vió en primer lugar el pH óptimo de acción sobre la gelatina y, según se desprende de la gráfica número 1, la mayor actividad se obtuvo a un pH de 8.

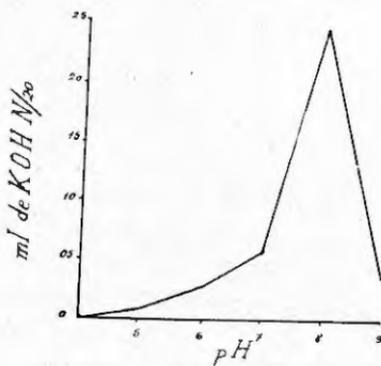


Fig. 1

La acción del KCN fué nula. No solamente no activó la acción de la proteasa sino que la inhibió por completo. La acción del ferricianuro de potasio a las concentraciones de 0.005, 0.010 y 0.015 M. fué nula.

La acción del yodo a la concentración de 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 y 0.010 M. fué insignificante.

Euphorbia peplus, L. Desmenuzada la planta se maceró con agua por 24 horas; se exprimió, filtró y trató el filtrado con alcohol etílico hasta concentración de 90% en que ya no se formó más precipitado. Separado el precipitado por filtración se maceró en agua y como resultó muy poco soluble se disolvió en solución diluida de NaCl: una pequeña parte se precipitó con solución saturada de sulfato de amonio; el precipitado dió las reacciones generales de coloración de prótidos. El res-

to se precipitó de nuevo por etanol de 96. El precipitado se maceró en agua por 24 horas a 5°, se filtró y diluyó con agua a un volumen tal que cada 0.5 ml. de extracto correspondiesen a un gramo de planta.

Para investigación de actividad proteolítica se siguió también, así como para su dosificación, el procedimiento de Wilstatter modificado por Macrae, esto es, titulando los grupos ácidos liberados en la gelatina por la acción enzimática, utilizando KOH N/20 en solución alcohólica y, como indicador, la timóptaleína en solución alcohólica al 0.5 %.

En la gráfica número 2, se observa el resultado de la acción del extracto de *Euphorbia peplus* a distintos pH. El pH óptimo es de 8.

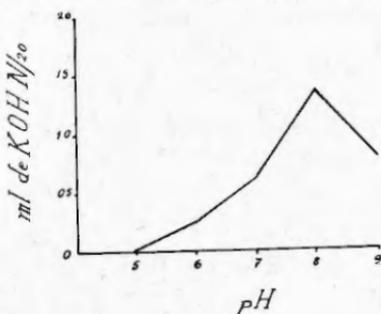


Fig. 2

En las gráficas que vienen a continuación se expresan los resultados de la acción del extracto sobre la gelatina previa acción del KCN. En todas esas gráficas se considera como 100 la actividad sobre gelatina obtenida cuando se hace obrar el extracto (0.5 ml.) sin que se añada agente de ninguna clase.

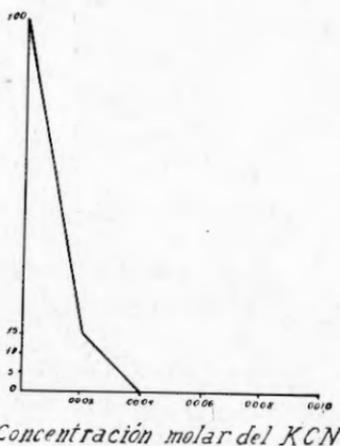
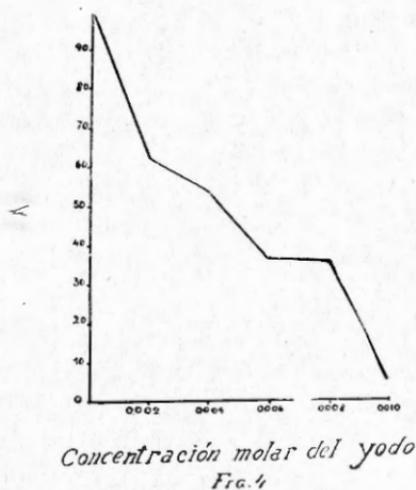
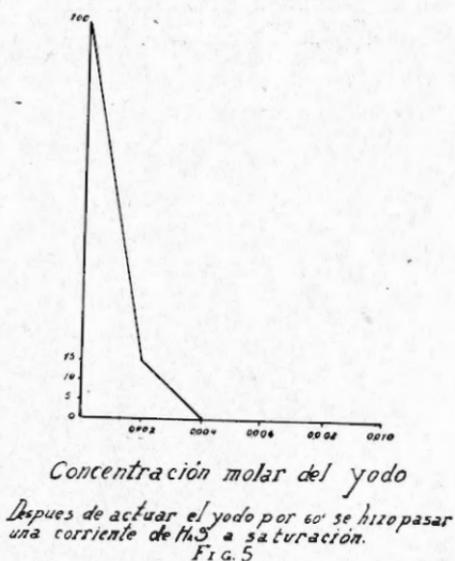


Fig. 3

Se deduce que el KCN inactiva la acción de la proteasa.

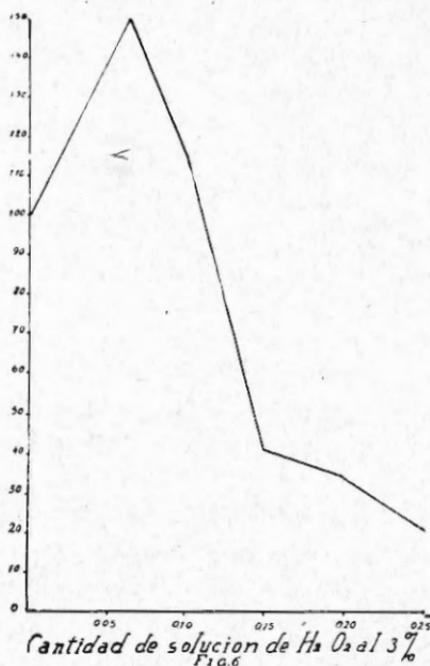


El yodo modifica profundamente la actividad proteolítica de la cimasa sin que llegue a nulificarla por completo.

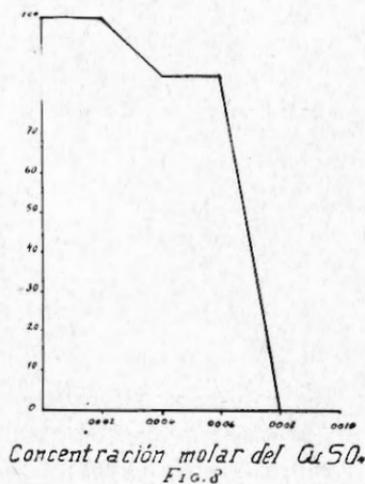
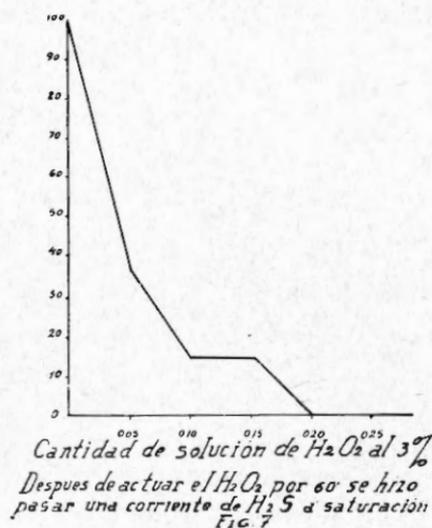


Esta gráfica difiere profundamente de la anterior; la acción del yodo se nulifica lo que parece permitir la suposición de que el yodo se combina con la cimasa a semejanza de lo que sucede en algunas pro-

teasas animales. De ahí que al reducirse el yodo previamente ya no puede combinarse con la proteasa y se obtiene el resultado de la gráfica número 5.



Esta gráfica y la siguiente se parecen a las 4 y 5 con la única diferencia de que al principio se observa un gran aumento en la actividad



de la proteasa pero luego disminuye rápidamente y al final es enteramente análoga a la acción del yodo.

En este trabajo preliminar nos concretamos a señalar el hecho de que en dos plantas hemos encontrado proteasas de acción intensa sobre prótidos. No nos hemos propuesto estudiar la naturaleza de su acción proteolítica y por lo tanto su acción sobre determinados enlaces. En las consideraciones preliminares hemos visto que eso sólo puede hacerse con substratos sintéticos variados, pero la acción sobre substratos naturales nos permite, sin embargo, por comparación con otras proteasas ya conocidas, establecer ciertas características particulares de acción que tienen gran interés biológico.

Las proteasas vegetales se dividen actualmente en dos grupos: en el primer grupo se incluyen las que obran a la manera de la papainasa, esto es, que son activadas por acción de agentes reductores, se inactivan por agentes oxidantes, obran generalmente a un pH ácido, aunque algunas veces obran también a un pH de 7, pero nunca en medio alcalino. Pertenecen a este grupo la ficina, bromelina y mexicaina, aparte de la mencionada anteriormente.

Se clasifican en el segundo grupo las proteasas vegetales que no son activadas por agentes reductores; por otra parte son inactivadas por metales pesados y por algunos agentes oxidantes; obran a un pH de 8, o sea en medio francamente alcalino, como la huraina de *Hura crepitans*, solanaína de *Solanum eleagnifolium* y euforbaína de *Euphorbia lathyris*.

Indudablemente las proteasas de *Euphorbia prostrata* y *Euphorbia peplus*, estudiadas en este trabajo pertenecen al segundo grupo. Por la pequeña cantidad de material de que dispusimos no nos ha sido posible estudiar la acción anticoagulante y el efecto sobre nemátodos. Sin embargo, su comportamiento en presencia de agentes reductores, sustancias oxidantes así como con metales pesados coinciden con todas las características de la proteasas vegetales pertenecientes al segundo grupo.

CONCLUSIONES

- I. La *Euphorbia prostrata* y la *Euphorbia peplus* contienen proteasas.
- II. Ambas proteasas obran a un pH óptimo de 8.
- III. Las dos proteasas son inactivadas por agentes reductores.
- IV. Son inactivadas por metales pesados.
- V. Son inactivadas casi completamente por agentes oxidantes.

BIBLIOGRAFIA

- CASTAÑEDA A., GABARRÓN F. F. Y BALCÁZAR M.—“On a new protease from *Pileus mexicanus*”. *Science*. 96-365. (1942.)
- CASTAÑEDA A., BALCÁZAR M. Y GABARRÓN F. F.—“Sobre la actividad proteolítica de *Euphorbia cerifera*”. *Anales de la Esc. Nal. de Cien. Biol.* III-65. (1943.)
- FRUTON J. S.—“Enzymic hydrolysis and synthesis of peptide bonds.” *Currents in Biochemical Research*. 123. (1946.)
- GREEN D. E.—Biochemistry from the standpoint of enzymes. *Currents in Biochemical Research*. 149. (1946.)
- GREEN D. E.—“Enzymes and trace substances”. *Advances in Enzymology*. 1-177. (1941.)
- LENOX F. G. and ELLIS W. J.—“Euphorbaine. Protease separated from the latex of *Euphorbia lathyris*.” *The Bioch. Jour.* 39-465. (1945.)
- MAX BERGMANN and FRUTON J. S.—“The Specificity of proteases.” *Advances in Enzymology*. 63, T. 1. (1941.)
- MAX BERGMANN.—“A Classification of proteolytic enzymes.” *Advances in Enzymology*. II-49. (1942.)
- MARVIN J. JOHNSON and BERGER J.—“The enzymatic properties of peptidases.” *Advances in Enzymology*. II-69. (1942.)
- SÁNCHEZ MARROQUÍN Y GABARRÓN F. F.—“Acción de la papína y mexicana sobre el fibrinógeno.” *Anales de la Esc. Nal. de Cien. Biol.* IV-181. (1945.)
- PICKFORD G. E.—“Micro methods for the detection of proteases.” *Science*. 80-317. (1934.)
- SCHMIDT E.—*Química Farmacéutica*. III-1097.
- TAUBER H.—*Enzyme Technology*. (1943.)
- VAN SLYKE D.—“The kinetics of hydrolytic enzymes and their bearing on methods for measuring enzyme activity.” *Advances in Enzymology*. II-39. (1942.)
- WERNER G. JAFFE.—“Huraiine.” *The Jour. of Biol. Chem.* 149-1. (1943.)