



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas**



Departamento de Bioquímica y Alimentos

**Instituto de Ciencias
Bioquímica y Biología Molecular**

Tesis para obtener el título de Licenciatura Químico Farmacobiólogo

**"Detección de dipeptidil, leucina, fenilalanina, glicina, y valina
aminopeptidasas en células envejecidas de *Schizosaccharomyces
pombe*"**

Presenta:

pQFB. Mario Maciel Rodríguez

Director de tesis:

D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta

Asesor Interno:

D.C. Laura Morales Lara

Puebla Pue. Noviembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y contó con el apoyo de la RED PROMEP/SEP BUAP-CA-147. Bioquímica y Biología Molecular y con el apoyo VIEP-2013. CLAVE: ROMN-NAT-13-I y VIEP-2014. CLAVE: ROMN-NAT-14-G.

AGRADECIMIENTOS

Finalmente esta etapa ha culminado. Sin la ayuda de todas y de cada una de las personas que he tenido la suerte de conocer a lo largo de mi vida no hubiera sido posible.

Primero, agradeceré de todo corazón a mi familia... a mis padres que a pesar de la distancia siempre han estado presentes y que me acompañaron en esta aventura que significó mi carrera y que, de forma incondicional, me apoyaron y entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Agradezco de todo corazón a mi directora de tesis, Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta y a mi asesora de tesis Dra. Laura Morales Lara, por la paciencia y por haber hecho posible este trabajo.

Gracias también a mis compañeros de la BUAP, por brindarme su valiosísima ayuda y amistad desde el primer momento y siempre.

A mis compañeros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, que me acompañaron dando ánimo en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A mis amigos de hoy y siempre, con los que he compartido gran parte de mi vida, los que me acompañaron durante la carrera, los que he compartido gran parte de mi vida, los que me acompañaron desde la distancia... les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, cariño, amistad y la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Gracias por todo.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi madre Cecilia que estuvo siempre a mi lado brindándome su mano amiga dándome a cada instante una palabra de aliento para llegar a culminar mi profesión, ya que todo lo que soy y seré es gracias a ti madre Cecilia y a mi padre Agustín, por ser un ejemplo a seguir, a mis hermanas y hermano que fueron fuente importante, convirtiéndose en pilares fundamentales para mi formación profesional, una dedicatoria especial a mi directora de tesis la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, ya que gracias a sus consejos y llamadas de atención, me he convertido en una persona madura, responsable y con muchas ambiciones tanto personales como profesionales.

De todo corazón muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO DE REFERENCIA	4
2.1. La levadura como modelo de envejecimiento	4
2.2. Envejecimiento replicativo y cronológico	4
2.3. Proteólisis	7
2.3.1 Proteasas	7
2.3.2 Proteasas involucradas en el envejecimiento	9
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	12
6. OBJETIVOS PARTICULARES	12
7. DIAGRAMA DE TRABAJO	13
8. MATERIAL Y MÉTODOS	14
8.1 Material	14
8.2 Métodos	14
9. METODOLOGÍA	15
9.1 Obtención y crecimiento de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	15
9.2 Valoración del cultivo por microscopia óptica	15
9.3 Obtención del extracto enzimático soluble	15
9.4 Determinación de proteínas totales	16
9.5 Determinación de la actividad enzimática	17
10. RESULTADOS	19
10.1 Identificación de los cambios morfológicos durante el proceso de envejecimiento celular	19
10.2 Perfil de la actividad enzimática específica de las aminopeptidasas en relación con el envejecimiento celular	22
10.3 Perfil de actividad de enzimas específicas con menor actividad en los 30 días de estudio	31
10.4 Análisis de las actividades enzimáticas de las 5 proteasas evaluadas durante los 30 días de cultivo	32
11. DISCUSIÓN	35
12. COMENTARIO	37
13. CONCLUSIONES	37
14. SUGERENCIAS	37
15. BIBLIOGRAFIA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Datos estimados a partir de información del censo de población y vivienda.....	1
Figura 2. Estimación de mortalidad y nacimientos 1930-2050 en la población mexicana.....	2
Figura 3. Esquema de los modelos de envejecimiento en la levadura A. Envejecimiento replicativo. B. Envejecimiento cronológico.....	5
Figura 4. Esquema de la hidrólisis de proteínas o péptidos.....	8
Figura 5. Cultivo de <i>S. pombe</i> en los días de estudio 1 al 30, evaluación por microscópica óptica, A. Día 1, B. Día 2, C. Día 3, D. Día 4, E. Día 5, F. Día 10, G. Día 15 y H. Día 30. Enfoque 40x.....	20
Figura 6. Cultivo de <i>S. pombe</i> en los días de estudio 1 al 30, evaluación por microscopía óptica, A. Día 1, B. Día 2, C. Día 3, D. Día 4, E. Día 5, F. Día 10, G. Día 15 y H. Día 30. Enfoque 100x.....	21
Figura 7. Actividad de aminopeptidasas en el día 1 de cultivo celular. A) Determinación de la actividad enzimática usando sustratos (hidrólisis de p-NA del sustrato en color amarillo) Actividad de aminopeptidasas en el día 1 de cultivo celular B) Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405nm	23
Figura 8. Actividad de aminopeptidasas en el día 2 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	24
Figura 9. Actividad de aminopeptidasas en el día 3 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	25
Figura 10. Actividad de aminopeptidasas en el día 4 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	26
Figura 11. Actividad de aminopeptidasas en el día 5 de cultivo celular. A) Determinación de la actividad enzimática usando sustratos (hidrólisis de p-NA del sustrato en color amarillo) Actividad de aminopeptidasas en el día 5 de cultivo celular. B) Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	27
Figura 12. Actividad de aminopeptidasas en el día 10 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	28
Figura 13. Actividad de aminopeptidasas en el día 15 de cultivo celular. A) Determinación de la actividad enzimática usando sustratos (hidrólisis de p-NA del sustrato en color amarillo).....	29
Figura 14. Actividad de aminopeptidasas en el día 30 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm.....	30

Figura 15. Actividad enzimática específica de fenilalanina, glicina y valina aminopeptidasas en los días de estudio (mU/mg).....**31**

Figura 16. Gráfica global de la actividad enzimática específica de las 5 aminopeptidasas a lo largo del estudio.....**33**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Material empleado en este trabajo	14
Tabla 2. Equipo utilizado en este trabajo	14
Tabla 3. Concentraciones de albumina para la curva patrón	17
Tabla 4. Porcentaje de la actividad de las 5 aminopeptidasas. La actividad de leucina aminopeptidasa del día 1 se consideró como el 100%. En el día 5 inicia el envejecimiento celular en levaduras	33

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
DPA	dipeptidil aminopeptidasa
EDTA	ácido etilendiaminotetra-acético
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LAP	leucín aminopeptidasa
pNA	para-nitroanilida
ysp	yeast <i>Shizosacharomyces pombe</i>
Abs	absorbancia a 405 nm
Rc	restricción calórica
T	tiempo de reacción en minutos
ϵ	coeficiente de extinción molar de pNA que corresponde a 9900 cm ⁻¹ M ⁻¹
τ	paso de luz de la celda (1 cm)
0.001 L	volumen final de la muestra en la cual se mide la absorbancia

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción del individuo y su medio ambiente. En la búsqueda de marcadores de envejecimiento celular, probables blancos podrían ser los genes que codifican para aminopeptidasas que son enzimas proteolíticas que degradan el residuo N-terminal de los proteínas y péptidos. En este trabajo se abordó un aspecto poco estudiado de este proceso utilizando a la levadura *Schizosaccharomyces pombe* como sistema eucariota de estudio para analizar la actividad de las enzimas dipeptidil aminopeptidasa (alanina aminopeptidasa), leucina, fenilalanina, valina y glicina aminopeptidasas en células sometidas a envejecimiento cronológico. La cepa 972 de *S. pombe*, se cultivó por 1, 2, 4, 5, 10, 15 y 30 días, en condiciones de envejecimiento cronológico. La actividad de las enzimas se midió haciendo uso de sus respectivos sustratos unidos por un enlace peptídico a para-nitroanilida (-pNA), (Leu-pNA, Ala-Pro-pNA, Gly-pNA, Phe-pNA, Val-pNA). Los resultados obtenidos mostraron que la actividad enzimática de las aminopeptidasas evaluadas va aumentando progresivamente hasta el día 5. Después del día 5 se inicia el envejecimiento celular y disminuye la actividad de estas proteasas. Al día 30 se identificó que la actividad de las enzimas disminuyó, excepto para dipeptidil aminopeptidasa. El perfil de la actividad de las enzimas estudiadas mostró que fenilalanina, glicina y valina aminopeptidasas no presentaron actividad importante en células envejecidas, mientras que la actividad de dipeptidil aminopeptidasa se mantuvo a lo largo de la vida de la levadura con una actividad similar a la registrada el primer día. Fue interesante identificar que leucina aminopeptidasa cuya actividad también aumentó al 5º día, como dipeptidil aminopeptidasa; presentó disminución total de su actividad al día 30, lo que sugiere que esta enzima podría ser un buen candidato como marcador de envejecimiento celular, por lo que será de gran interés continuar estudiando su papel en el proceso de envejecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción del individuo y su medio ambiente. Podría también definirse como todas las alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a pérdidas funcionales y a la muerte. En el ser humano, es difícil determinar el momento en que éste proceso inicia, algunos autores consideran que se manifiesta a partir del momento de la máxima vitalidad, alrededor de los 30 años.

En la actualidad la esperanza de vida, en los países desarrollados es de 75 a 80 años gracias a los avances de la medicina preventiva y a los grandes progresos en la nutrición, cuando los fenómenos intrínsecos del crecimiento y del envejecimiento se desarrollan en un medio adecuado (Salgado y Guitten. 1990). El incremento en el promedio de vida del ser humano se ha reflejado en los sistemas de salud de muchos países, debido a que la atención médica a los adultos mayores ha aumentado (Rodes y Guardia, 1997). En México, se espera que la proporción de personas de 60 años se duplique para el año 2050 con respecto al año en curso 2014 (Figura 1).

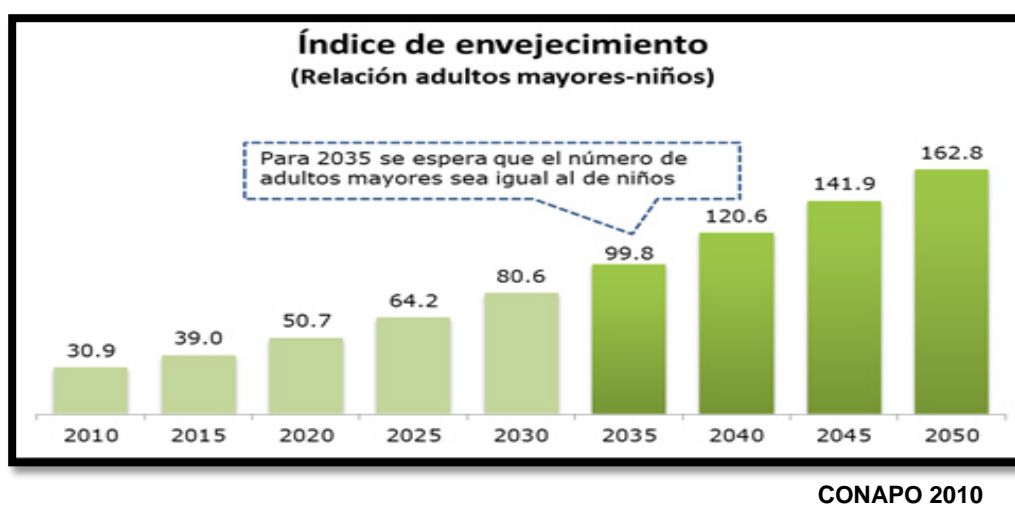


Figura 1. Datos estimados a partir de información del censo de población y vivienda.

México ha experimentado un proceso acelerado de transición demográfica, en la década de 1930 el índice de mortalidad junto con la persistencia de elevados niveles de natalidad, generó un periodo de elevado crecimiento demográfico en 1990. Posteriormente la natalidad disminuyó notablemente, para el año 2000 este indicador descendió a 21 nacimientos por cada mil habitantes (CONAPO, 2010). Se espera que la natalidad siga descendiendo hasta alcanzar 11 nacimientos y que la mortalidad llegue a 10.4 defunciones por cada mil habitantes en 2050 (Figura 2).

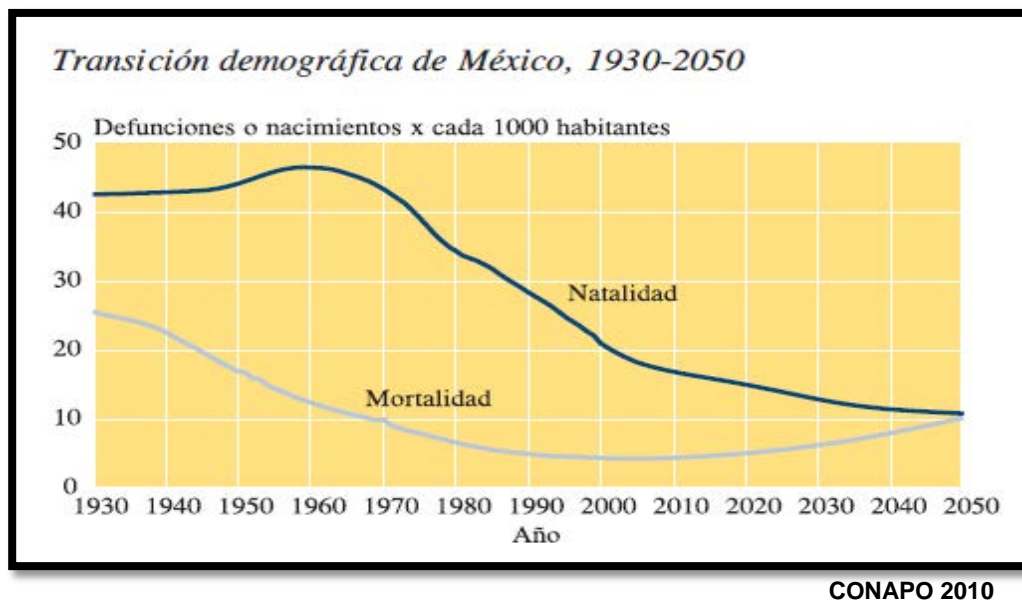


Figura 2. Estimación de mortalidad y nacimientos entre 1930-2050 en la población mexicana.

Los datos muestran la necesidad del estudio integral del proceso de envejecimiento para ofrecer estrategias en el control del envejecimiento así como de las complicaciones asociadas al mismo. Todas las células experimentan cambios por envejecimiento, tales como la pérdida en la capacidad de dividirse y de responder a estímulos ambientales. Una célula envejece cuando entra en un estado llamado senescencia.

La senescencia es la incapacidad para mantener la estructura, la integridad o el orden de las células; en células envejecidas se pierde la capacidad para responder a daño físico, químico o biológico (Instituto Nacional de Geriátría, 2010). A nivel molecular, el envejecimiento celular está directamente relacionado con cambios en la expresión de genes, algunos de los cuales son indispensables para el mantenimiento de la homeostasis celular (Bohr, y col 1998). En la búsqueda de probables marcadores de envejecimiento celular, se ha propuesto que los genes que codifican a proteasas, podrían jugar un papel crucial en el avance del envejecimiento, debido a su participación en importantes funciones para la célula tales como la maduración de proteínas, el recambio proteico, el plegamiento de proteínas y, la señalización intracelular, entre otros. En este trabajo, se inició el estudio de la actividad de un tipo de proteasas: las aminopeptidasas, usando células envejecidas de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*). La finalidad del trabajo fue encontrar una o varias enzimas que pudieran considerarse probables marcadoras de envejecimiento celular en eucariontes.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. La levadura como modelo de envejecimiento

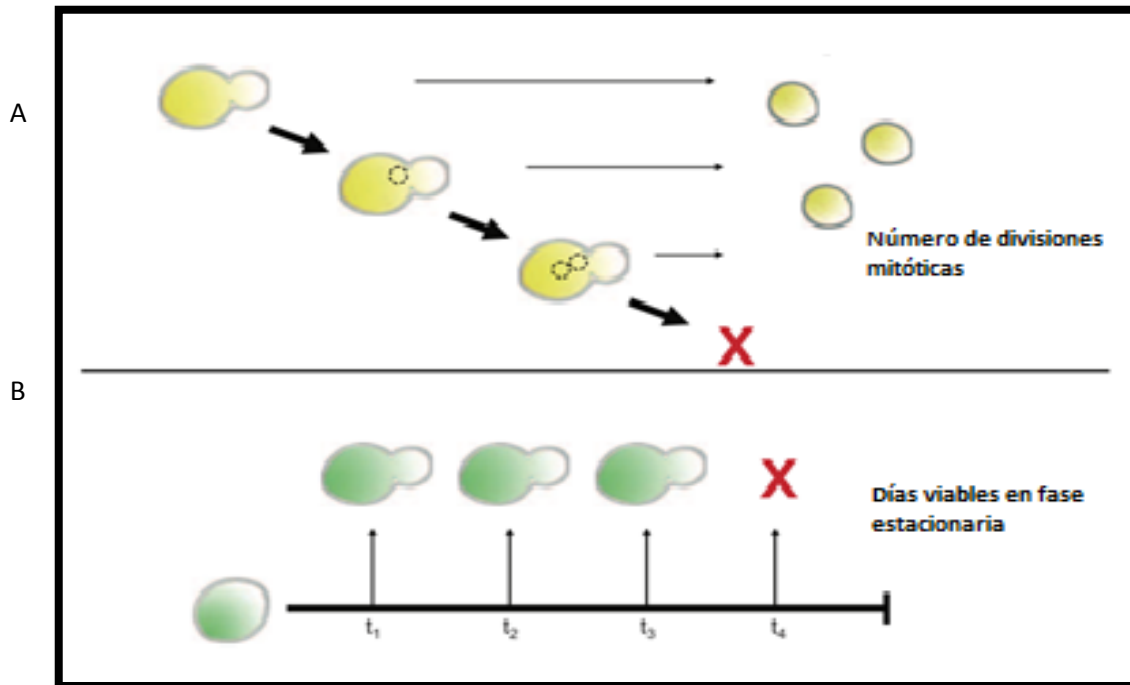
S. pombe también llamada "levadura de fisión", es un organismo unicelular eucariota con células de forma bacilar, que miden de 3 a 4 micrómetros de diámetro y 7 a 14 micrómetros de longitud. Su genoma es de aproximadamente 14.1 millones de pares de bases, con 4970 genes codificantes de proteínas (Wilhelm y cols, 2008). Se divide por fisión binaria. La levadura puede existir en estado haploide, aunque en condiciones de inanición, si existen los dos tipos sexuales (P y M), éstos forman un cigoto diploide que entra en meiosis para generar cuatro esporas haploides. Cuando las condiciones nutricionales y ambientales mejoran, estas esporas germinan para favorecer la proliferación de células haploides (Davey y cols. 1994).

S. pombe ha sido útil en el estudio de varios procesos en Biología Celular y Molecular, tal como la regulación del ciclo celular. Un estudio comparativo de genes entre *S. pombe* y *Homo sapiens* mostró que de un conjunto de 172 genes relacionados con enfermedades humanas, 23 están implicados en los mecanismos de reparación del daño del ADN, puntos de control del ciclo celular y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Por lo que el estudio de genes en *S. pombe* puede generar nuevo conocimiento que podría ser de utilidad en procesos comunes a todas las células eucariontes como el envejecimiento (Davey y cols. 1994).

2.2. Envejecimiento replicativo y cronológico

Los primeros estudios de envejecimiento en levadura se realizaron con *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) desde hace más de 50 años. Esta levadura se divide por mitosis asimétrica. Con el tiempo la célula madre experimenta un deterioro progresivo, acumula daños al ADN, agregados de proteínas dañadas, hasta envejecer y finalmente perder su capacidad de gemación, hecho que se conoce como envejecimiento replicativo, que representa

el número de gemaciones que experimentan antes de morir (Figura 3.A). Existe otro tipo de envejecimiento llamado envejecimiento cronológico (Figura 3.B), el cual se refiere, al tiempo en que las levaduras logran sobrevivir en fase estacionaria sin cambiar de medio de cultivo (Kaeberlein y col, 2007).



Kaeberlein y col. 2007

Figura 3. Modelos de envejecimiento en la levadura. A. Envejecimiento replicativo. B. Envejecimiento cronológico.

Los dos mecanismos resultan de enorme interés, puesto que organismos más complejos como el humano experimentan los dos tipos de envejecimiento descritos en levaduras. Ambos tipos de envejecimiento, han contribuido al descubrimiento de diversos genes que alteran la longevidad, así como vías de señalización que participan en el envejecimiento de eucariontes superiores (Guarente y Kenyon, 2000). Las levaduras también han facilitado el estudio de varios procesos celulares relacionados con el envejecimiento como el estrés oxidativo, que en el humano provoca un desequilibrio relacionado con varias enfermedades como Parkinson y el Alzheimer (Madera. 2002)

En *S. pombe* también se han descrito los dos tipos de envejecimiento mencionados. Los estudios sobre la fase estacionaria en la levadura de fisión son escasos respecto a la gran cantidad de información disponible para *S. cerevisiae*. (Parrella y Longo, 2010).

En *S. pombe* se ha estudiado el envejecimiento cronológico relacionado con la disminución de la fuente de glucosa. Se sabe que durante la fase logarítmica las células se dividen mitóticamente y crecen de forma exponencial consumiendo los nutrientes. Cuando la glucosa empieza a ser limitante las células dejan de fermentar para respirar pero, contrariamente a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, *S. pombe* no es capaz entonces de respirar el etanol producido durante la fermentación puesto que su metabolismo no incluye el ciclo del glioxalato, indispensable para esta función. Cuando no queda glucosa en el medio las células dejan de dividirse y entran en fase estacionaria, adquiriendo las características morfológicas típicas de esta condición y la capacidad de sobrevivir en un estadio latente durante un tiempo. Una condición de escasez de glucosa llamada restricción calórica (RC) es la única condición no genética que se conoce como capaz de alargar la esperanza de vida, hecho que se ha confirmado en levaduras, nematodos, ratones y células de mamífero (Kaeberlein y col. 2007).

La RC promueve la inactivación de rutas que señalizan la presencia de nutrientes como la ruta TOR (Powers y col. 2006) y las rutas de las quinasas Pka1 y Sck2 (Roux y cols. 2009). En esta levadura se ha descrito que existe un límite de restricción calórica pues la disminución de glucosa hasta 0.5% en el medio de cultivo produce un estrés para la célula (Seoane. 2012).

Por otro lado, en *S. pombe* la escasez de nitrógeno provoca la detención del ciclo celular en la fase G1 siendo posible que la levadura active el proceso de conjugación y la entrada en meiosis si están presentes a la vez los dos tipos sexuales de células haploides (Ayoub y col. 1999). Experimentalmente, se han estudiado varios aspectos del envejecimiento cronológico en *S. pombe*, mediante su cultivo en medio rico (YE) o en medio mínimo (EMM). El medio rico tiene una fuente de carbono muy abundante, la cual se compone de un extracto de levadura

(5 g/L) y glucosa al 2-3%, mientras que el medio mínimo solo tiene glucosa al 2%. Los análisis han mostrado que el envejecimiento cronológico se retarda cuando las células crecen en medio EMM. En este trabajo se utilizó el medio EMM puesto que permite analizar la actividad de aminopeptidasas en células que experimentan envejecimiento cronológico (Fabrizio y Longo, 2008).

2.3. Proteólisis

Durante el proceso proteolítico, una proteína es degradada parcialmente en péptidos o completamente hasta aminoácidos por enzimas proteolíticas, Hayes (2005) menciona que la proteólisis tiene varias funciones para la célula, entre ellas destaca:

- La eliminación de metionina del extremo N-terminal tras la traducción.
- La eliminación de las secuencias señal de péptidos.
- La separación de proteínas virales que se traducen desde un ARN mensajero policistrónico.
- La digestión de proteínas de los alimentos como fuente de aminoácidos como la tripsina, la quimotripsina, las carboxipeptidasas y la elastasa.
- La conversión de proteínas inactivas (proenzimas, zimógenos, pre-hormonas) en sus formas funcionales.
- La degradación de ciclinas y otras proteínas requeridas para la progresión en el ciclo celular.

2.3.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas fundamentales en el control de una gran variedad de procesos fisiológicos. Su acción está regulada por inhibidores endógenos y son responsables de la modulación de diversas proteínas, hormonas y neurotransmisores de naturaleza peptídica como resultado de la hidrólisis selectiva de ciertos fragmentos de su estructura (Figura 4) (Delgado y cols. 2004).

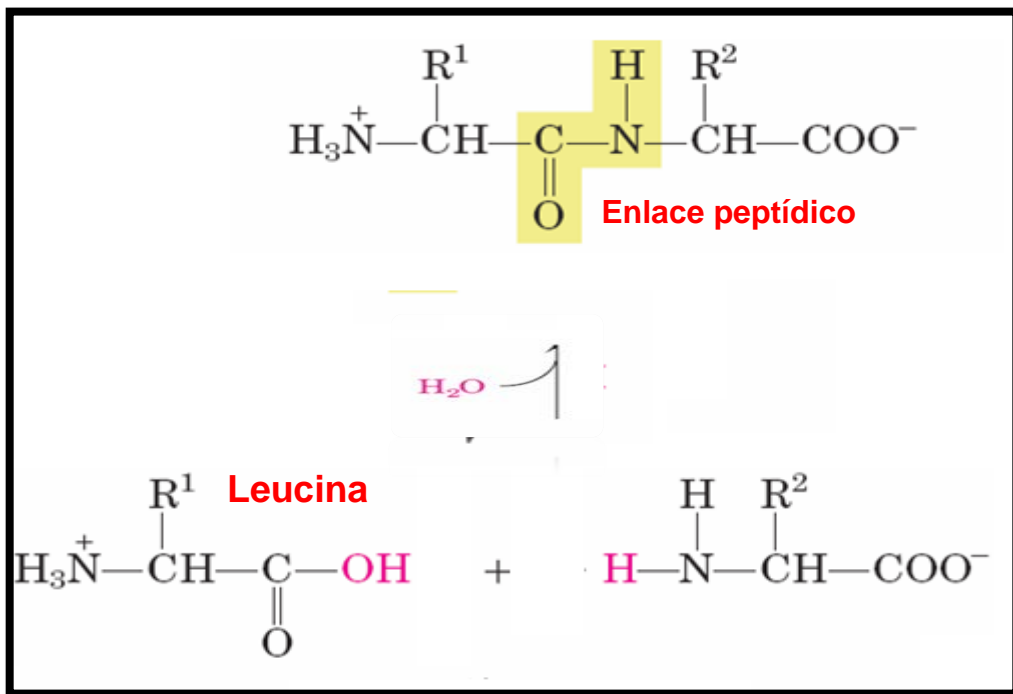


Figura 4. Esquema de la hidrolisis de proteínas o péptidos.

Las proteasas se clasifican en exoproteasas cuando hidrolizan enlaces a partir del extremo N y C-terminal y endoproteasas cuando actúan sobre enlaces internos (Delgado y cols. 2004). A su vez, las exoproteasas se subdividen en aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las carboxipeptidasas son proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos desde el extremo C-terminal de proteínas o péptidos, en seres humanos, animales y plantas, existen varios tipos de carboxipeptidasas (Son y col, 1999). Las primeras carboxipeptidasas estudiadas fueron las implicadas en la digestión de los alimentos. Algunas proteasas de este tipo ayudan a madurar las proteínas o regular los procesos biológicos. Las carboxipeptidasas también funcionan en la cicatrización de heridas, la reproducción y muchos otros procesos (Son y col, 1999). En este trabajo se estudió la actividad de proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos a partir del extremo N-terminal de proteínas (Hayes. 2005).

2.3.2 Proteasas involucradas en el envejecimiento

Diversos grupos de investigación han abordado el estudio molecular del envejecimiento. Un estudio realizado en 2007, abordó el cambio en la expresión de 8932 genes en 16 tejidos como una función de la edad en ratón los cuales fueron comparados con datos obtenidos de células humanas envejecidas (Zahn y col. 2007).

Algunos tejidos mostraron grandes diferencias transcripcionales en ratones, lo que sugiere que estos tejidos pueden contribuir considerablemente al envejecimiento del organismo. La comparación del perfil de genes entre humano y ratón determinó una correlación general entre la expresión de genes relacionada con la edad. El conjunto de genes cuya expresión incrementa con la edad en ratones, también aumenta en los seres humanos.

Las proteínas que se modificaron mayoritariamente están relacionadas con las siguientes actividades:

- Actividad de proteína quinasa dependiente de ciclina
- Unión a esteroides
- Actividad peroxisomas
- Metabolismo de carbono
- Actividad translocasas
- Actividad liasas
- **Actividad aminopeptidasas**
- Detención del ciclo celular
- Catabolismo lipídico
- Transporte de hierro
- Respuesta inflamatoria
- Inhibidor de endopeptidasas
- Receptores transmembranales
- Actividad de citoquinas

La expresión de los genes implicados en la detención del ciclo celular tiende a aumentar con la edad, lo que está relacionado con la pérdida de la capacidad de proliferar. En forma interesante, el análisis demostró que las aminopeptidasas son enzimas que modifican su expresión en células envejecidas, lo cual es destacable debido a su gran importancia en distintos procesos metabólicos esenciales para el

correcto funcionamiento celular. Por lo que, las aminopeptidasas podrían ser excelentes marcadores biológicos del envejecimiento. Sin embargo, su función en el envejecimiento tendrá que ser analizado a detalle (Zahn y col. 2007). La revisión del papel de las aminopeptidasas en el envejecimiento demostró que es un aspecto poco estudiado del envejecimiento celular es el perfil de proteasas que se desregulan con el proceso. En la levadura de gemación *S. cerevisiae* se describió a Kex2 como una proteasa relacionada con el envejecimiento (Ladds y Davey. 2000). En *S. pombe*, la proteasa Krp 1, es homóloga a Kex2 de *S. cerevisiae*. Krp1 es una serin-endopeptidasa de tipo 1 dependiente de Ca^{2+} que madura proteínas secretorias en el extremo carboxilo de los motivos Lys-Arg y Arg-Arg. Krp1 es un miembro de la familia de las kexinas (Zhou y col. 1999). Las kexinas están implicadas en el procesamiento de una gran variedad de proteínas. La actividad de krp1 es esencial para la viabilidad celular. Kex1 es una proteasa que está involucrada en la muerte celular de la levadura inducida por una alteración de la N-glicosilación, por ácido acético, y parece estar involucrada en el envejecimiento cronológico, lo que sugiere que Kex1 juega un papel importante en la muerte celular de la levadura. La interrupción de KEX1 disminuye la actividad caspasa, la acumulación de ROS, retarda la fragmentación de las mitocondrias, y conduce a un mejor crecimiento y a la supervivencia de las células (Kerr. 2002). En *s. pombe* no hay estudio sobre su participación en el envejecimiento por lo que, en este trabajo se analizó el perfil de actividades enzimáticas de dipeptidil aminopeptidasa, leucina, metionina, fenilalanina, glicina y valina aminopeptidasa en células sometidas a envejecimiento cronológico.

3. JUSTIFICACIÓN

Desde el siglo pasado, México ha experimentado un proceso de transición demográfica debido a los avances en la medicina, el acceso a los sistemas de salud, a la educación y la mejora en las condiciones generales de vida, lo cual ha favorecido el aumento del grupo de adultos mayores en nuestra sociedad, muchos de ellos afectados por enfermedades crónico degenerativas. El paulatino envejecimiento de la población mexicana exige el conocimiento de estrategias terapéuticas encaminadas a mejorar la calidad de vida de los humanos, basados en la información de los mecanismos que gobiernan el envejecimiento celular. Dado que el envejecimiento es un proceso altamente conservado entre especies, en este trabajo se estudió un aspecto del envejecimiento en la levadura *S. pombe*, analizando un aspecto poco estudiado del mismo, la actividad de las enzimas dipeptidil aminopeptidasa, leucina, metionina, fenilalanina, valina y glicina aminopeptidasas en células sometidas a envejecimiento cronológico, con el fin de proporcionar información acerca de su actividad en células jóvenes y envejecidas de la levadura *S. pombe*, los resultados de este estudio podrían relacionar a las proteasas estudiadas con el envejecimiento celular en humanos.

4. HIPÓTESIS

En el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe* se incrementa la actividad enzimática de dipeptidil, leucina, fenilalanina, glicina, y valina aminopeptidasa.

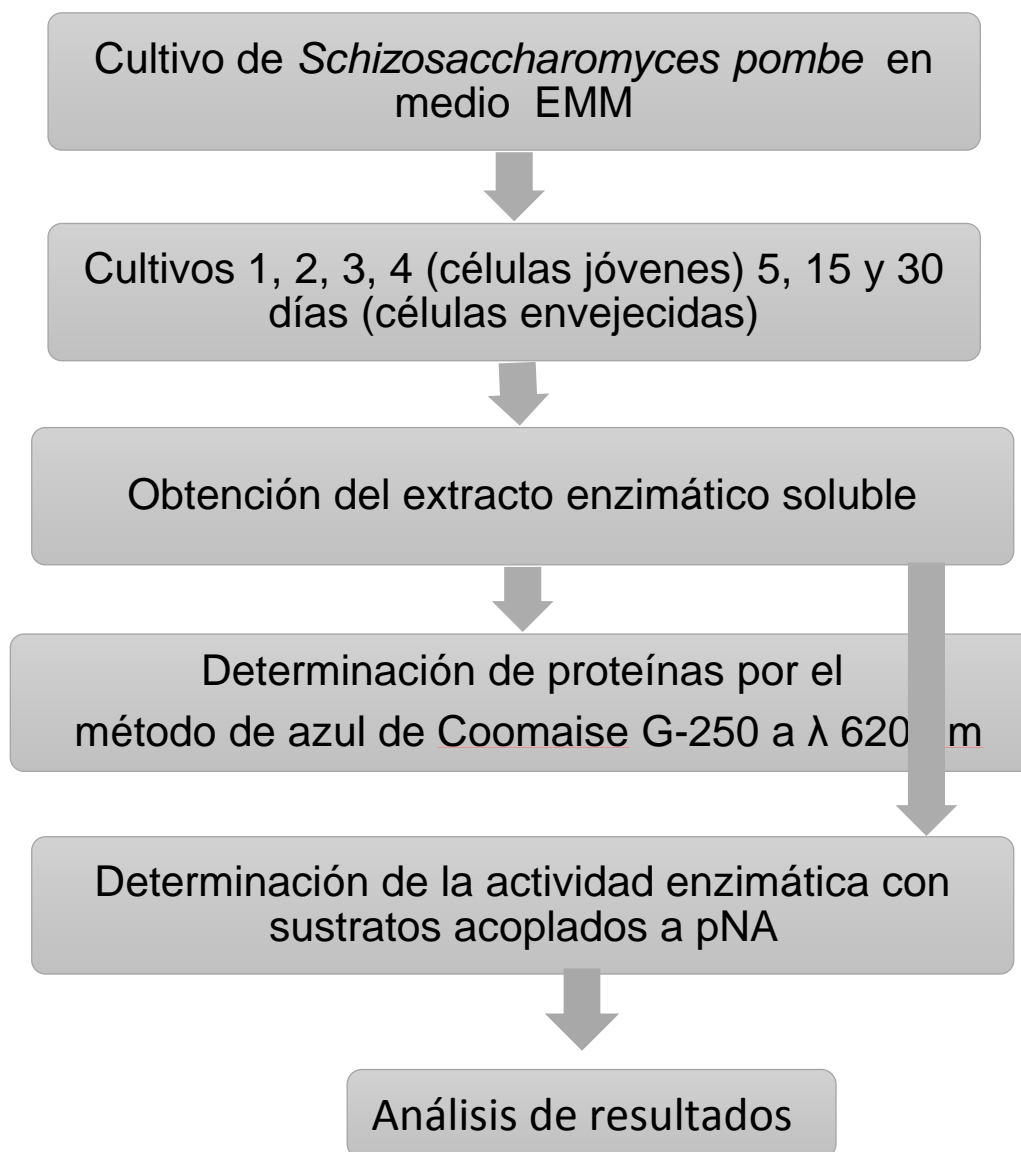
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad enzimática de dipeptidil, leucina, fenilalanina, glicina, y valina aminopeptidasa en células envejecidas de *Schizosaccharomyces pombe*

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar cultivos envejecidos de *S. pombe* entre 5 y 30 días para su comparación con cultivos jóvenes de 1 a 4 días.
2. Identificar la actividad enzimática de dipeptidil, leucina, fenilalanina, glicina, y valina aminopeptidasa en cultivos envejecidos de levadura.

7.-DIAGRAMA DE TRABAJO



8.-MATERIAL Y MÉTODOS

El material necesario para cada determinación y material adicional que se empleó, se especifica en la tabla 1:

Tabla 1. Material empleado.

Material	Volumen
Tubos eppendorf	500 µl, 1 ml y 2 ml
Micropipetas	0.1-2 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
Puntas estériles	0.1-2 µl, 2-100 µl y 100-1000 µl
Perlas de vidrio (0.5 de diámetro)	
Tubos Falcón	15 ml

El material biológico empleado es la cepa silvestre de *Schizosaccharomyces pombe 972h-*, el cual fue proporcionado por el cepario del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del ICUAP.

El equipo que se empleó se especifica en la tabla 2.

Tabla 2. Equipo utilizado.

Equipo	Marca	Modelo
Autoclave	AESA	CV30
Balanza digital	Radwag	As 220/c2
Baño termostático de bloque Seco	LABNET	ENDURO 10.5
Centrifuga	Spectrafuge 24D	5804 R
Fuente de poder	LABNET	ENDURO 250
Vortex	MRC	Genie 2
Microscopio	Nikon	YS2-H
Espectrofotómetro	Shimadzu	TCC-240A
Estufa de cultivo	BG	M00E22
Incubadora orbital	AMEREX	705
Campana de flujo laminar	Nuaire	

9. METODOLOGÍA

9.1. Obtención y crecimiento de *Schizosaccharomyces pombe* 972 h- (cepa silvestre)

La cepa 972 h⁻ de *S. pombe* fue cultivada en medio YE, a partir de una muestra almacenada a -80 °C. Inicialmente se sembró un precultivo, el cual se incubó por 24 horas a 29 °C con agitación constante (185 rpm); cuando este alcanzó una densidad óptica de 3-4.0 a 600 nm se tomó una alícuota para sembrar por estría una placa con medio YE y se dejó incubando 4 días a 29 °C hasta el crecimiento de colonias. Posteriormente se sembró un precultivo en caldo EMM (Edimburgo medio mínimo), el cual se incubó a 30 °C durante 24 horas, a 29 °C con agitación constante (185 rpm), del precultivo se prepararon los cultivos de 1, 2, 4, 5, 10, 15 y 30 días, a partir del 5° día se tuvieron las condiciones de envejecimiento cronológico.

9.2. Valoración del cultivo por microscopia óptica

Para valorar el crecimiento celular de *Schizosaccharomyces pombe* 972h⁻ se realizó el seguimiento del cultivo por microscopia de contraste de fases por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 30 días en las condiciones expuestas en el apartado 9.1.

9.3. Obtención del extracto enzimático soluble

Los métodos de rompimiento celular y obtención del extracto enzimático soluble fueron establecidos por trabajos precedentes en el laboratorio (Márquez, 2005). Las levaduras jóvenes (1, 2, 3 y 4 días) y en condiciones de envejecimiento celular (5, 10, 15 y 30 días de incubación en medio EMM), se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con agua estéril centrifugando en las condiciones antes señaladas. El paquete celular se resuspendió en 60 µL de buffer de Zimolyasa con 0.2 mg de Zimolyasa 20-T (Zymo Research) y se incubó a 37 °C durante 1:30 hrs. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a 4

°C para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en 200 µL de Tris/HCL 5 mM pH 7 y perlas de vidrio (0.5 de diámetro) en la mitad de volumen de la suspensión celular. El rompimiento celular se produjo por agitación mecánica en vórtex durante 15 minutos (30 segundos agitando vigorosamente y 30 segundos en hielo). Después se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y se depositó el sobrenadante en un tubo estéril. A la mezcla del paquete celular y perlas se le adicionaron 200 µl más de Tris/HCl 5 mM pH 7 y se repitió el procedimiento en el vórtex (30 segundos agitando vigorosamente y 30 segundos en hielo), se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y se juntó el sobrenadante con el anterior. El sobrenadante resultante (extracto enzimático soluble) se colocó en otro tubo estéril y se utilizó para la determinación de actividad enzimática y proteínas totales.

9.4. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales en los extractos crudos se realizó por el método de Lowry modificado, el uso de la técnica se basa en la reacción de la proteína con el cobre en condiciones básicas y en la reducción del fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo para la tirosina y el triptófano de la proteína. La modificación consistió en la adición de 1% de SDS que permitió una mejor solubilización de las proteínas, favoreciendo la exposición de los residuos aminoacídicos mencionados. Para la cuantificación proteica se construyó una curva patrón de calibración utilizando albumina bovina como estándar. Para la determinación de proteínas totales se realizó una mezcla con 10 µL de muestra (extracto soluble), teniendo como volumen final 1 ml. Se agregó a tubos respectivamente día 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 30. Los 10 µl de extracto crudo más 490 µl de agua y se les adiciono 500 µl de Azul de Coomassie G-250 a cada uno. Se agito en el vórtex 3-4 min, se dejó a temperatura ambiente 10 min en total oscuridad. Para la curva patrón se realizó la misma mezcla descrita anteriormente, con las cantidades de albúmina que se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Concentraciones de albúmina para la curva patrón.

Albúmina (μg)	Albúmina ($\mu\text{L}1:10$)	Agua estéril (μL)
0	0	300
10	10	290
20	20	280
30	30	270
40	40	260
50	50	250
100	100	200

Al término del tiempo de incubación, se midió la absorbancia de todas las muestras incluyendo la curva patrón a 660 nm en el espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu).

9.5. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de leucina, dipeptidil aminopeptidasa, fenilalanina, glicina y valina-aminopeptidasas evaluadas en este trabajo, se determinó haciendo uso de sus respectivos sustratos acoplados a para-nitroanilida (-pNA), (Leu-pNA, Ala-Pro-pNA, Gly-pNA, Phe-pNA y Val-pNA de Sigma-Aldrich), los cuales se prepararon en agua destilada a una concentración de 10 mM y se almacenaron en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 500 μl , conteniendo 100 μl del extracto soluble de los diferentes días de análisis en células jóvenes y envejecidas (día 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30), en seguida se adicionaron 125 μl de Tris/HCl 200 mM a pH 7, 50 μl de sustrato acoplado a pNA) y se aforó con agua estéril a un volumen final de 500 μl . La mezcla de reacción para las enzimas leucina y dipeptidil aminopeptidasa se complementó con 1 mM de MnCl_2 y CaCl_2 , respectivamente. Las reacciones enzimáticas se dejaron en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la aparición de una coloración amarilla. Al término de la incubación se adicionó una mezcla de paro compuesta por 500 μl de ZnSO_4 al 5% y 100 μl de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al 7.5%, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm en una microcentrifuga y se midió la absorbancia del sobrenadante a 405 nm en el

espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu). En el presente trabajo se analizaron los perfiles de actividad de cinco aminopeptidasas. Inicialmente se planteó la detección de metionina aminopeptidasa, la cual no se pudo determinar debido a que ya no se comercializa el sustrato en México.

La actividad enzimática se determinó considerando que una unidad corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un nanomol de pNA en un minuto, bajo las condiciones antes citadas.

Para establecer las unidades enzimáticas se utilizó la siguiente fórmula:

$$mU(\text{nmol}/\text{min}) = \frac{Abs}{t \times \epsilon \times \tau} \times 0.001 \times 10^9$$

La actividad específica se determinó según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica (nmol}/\text{min}/\text{mg}) = \frac{mU}{mg \text{ de proteínas}}$$

10. RESULTADOS

10.1. Identificación de los cambios morfológicos durante el proceso de envejecimiento celular

La valoración de la morfología de la levadura *S. pombe* en los cultivos, se realizaron por microscopía en los días 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 30. En las figuras 5(A-D) y 6(A-D) se muestran a las levaduras jóvenes en los días 1 al 4, en las cuales se observa el crecimiento típico con la morfología bacilar propia de la levadura, una población totalmente homogénea, alargada y grande. Para la figura 5.E y 6.E, que corresponde al día 5 donde inicia el envejecimiento celular, se observaron cambios en la morfología, en algunas células se presentó la pérdida de la forma de bacilo, y disminuyó el tamaño, eran más pequeñas, por lo que se identificó una población más heterogénea que probablemente tenía afectaciones en la pared celular. En las figuras 5(F-H) y 6(F-H), que representan a los días 10, 15 y 30, respectivamente, se observaron mayores cambios en la morfología, la mayor parte de la población se observó más pequeña sin forma definida de bacilo, algunas parecían células muertas, fue una población heterogénea.

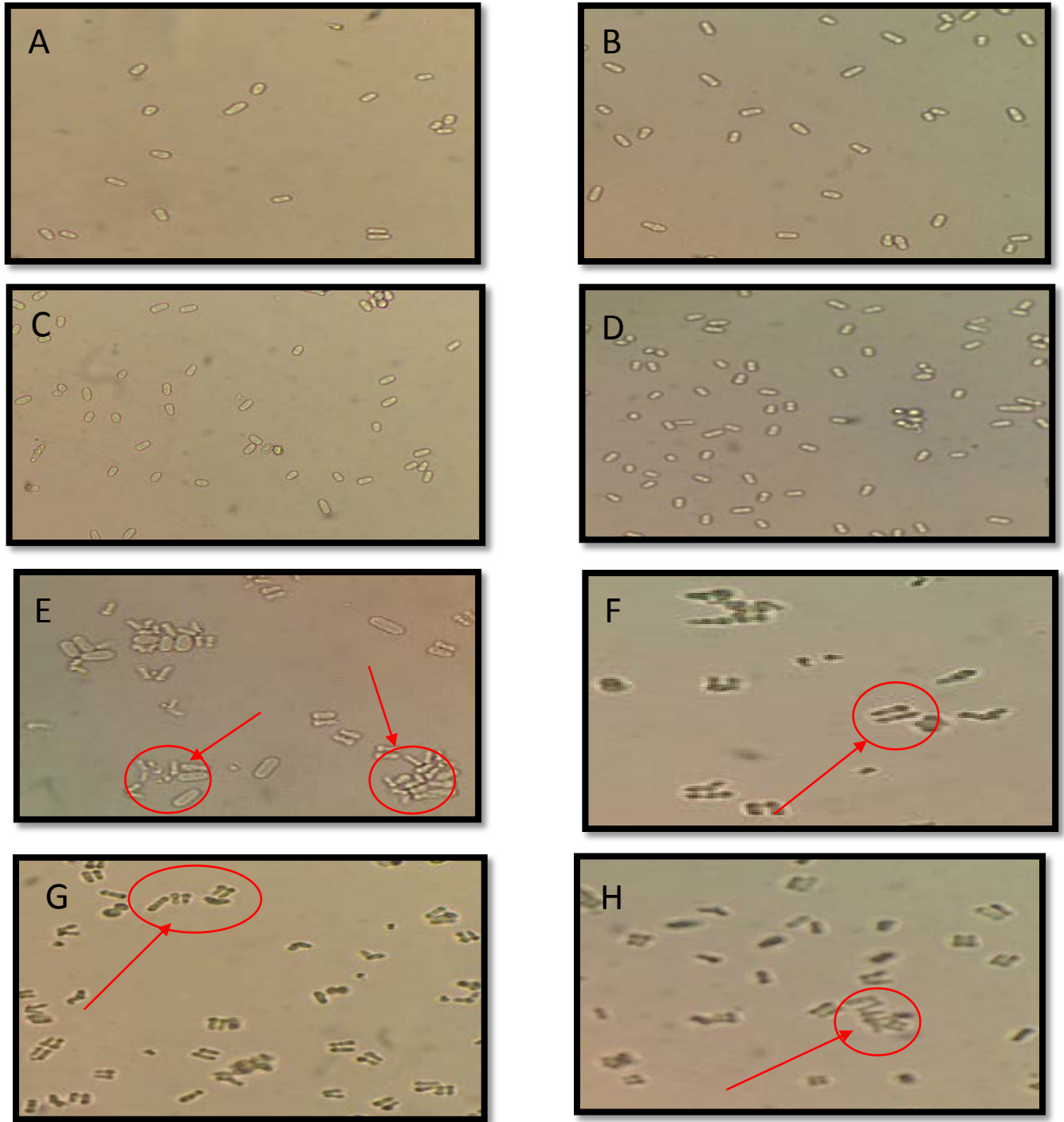


Figura 5. Cultivo de *S. pombe* en los días de estudio 1 al 30, evaluación por microscópica óptica, A. Día 1, B. Día 2, C. Día 3, D. Día 4, E. (A a E, corresponden a células jóvenes). Día 5, F. Día 10, G. Día 15 y H. Día 30. (F a H, corresponden a células envejecidas). Enfoque 40x.

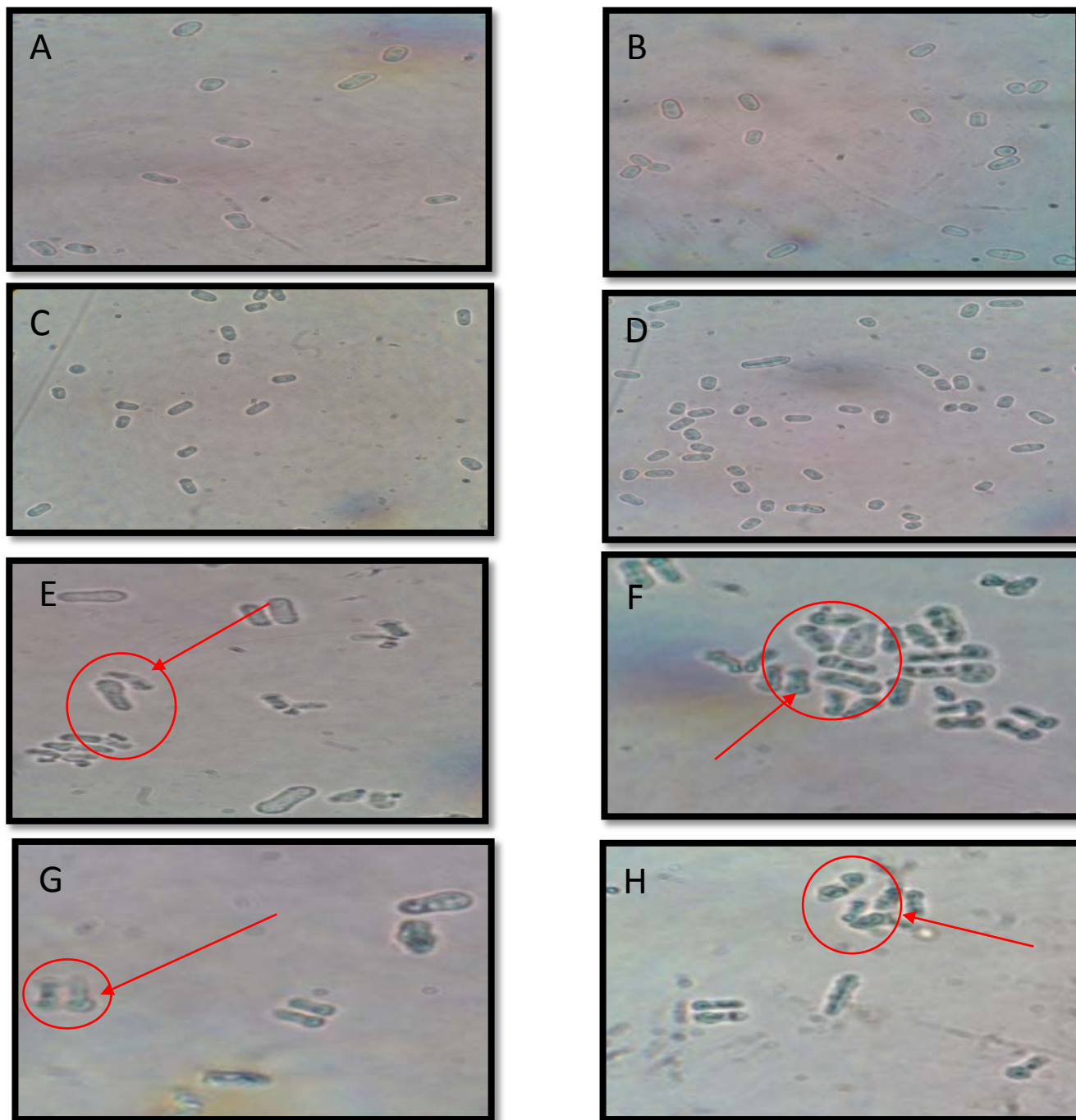


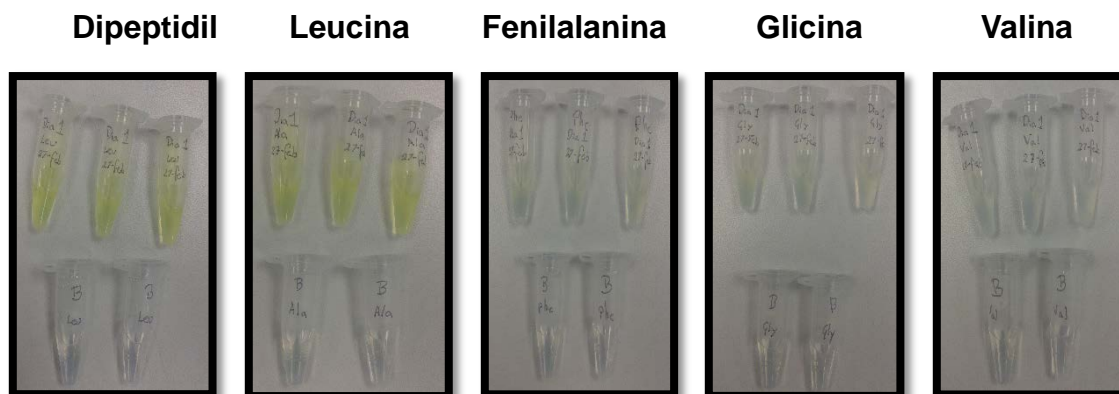
Figura 6. Cultivo de *S. pombe* en los días de estudio 1 al 30, evaluación por microscopía óptica, A. Día 1, B. Día 2, C. Día 3, D. Día 4, E. (A a E, corresponden a células jóvenes). Día 5, F. Día 10, G. Día 15 y H. Día 30. (F a H, corresponden a células envejecidas). Enfoque 100x.

Los resultados de la evaluación por microscopia óptica, permitieron observar el fenotipo asociado al envejecimiento de la levadura. Por lo que a continuación se analizó la actividad enzimática de proteasas relacionada con estos cambios morfológicos.

10.2. Perfil de la actividad enzimática específica de las aminopeptidasas en relación con el envejecimiento celular

En el presente trabajo se estudió el perfil de actividad de cinco aminopeptidasas, los resultados obtenidos se describen a continuación. En el día de crecimiento de la levadura *S. pombe* la enzima con mayor actividad de hidrólisis de -pNA fue leucina aminopeptidasa (21.55 mU/mg) (Figura 7A). Para el análisis del resto de las proteasas estudiadas, este valor se consideró como el 100% de actividad en todos los días analizados. La segunda enzima con una actividad alta el primer día de cultivo fue dipeptidil aminopeptidasa, con un 90% de actividad (19.57 de mU/mg). Las enzimas fenilalanina y glicina aminopeptidasas, tuvieron una actividad del 20%. Mientras que valina aminopeptidasa fue la enzima con menor actividad en el día 1, solo presentó un 7% de actividad (Figura 7B).

A



B

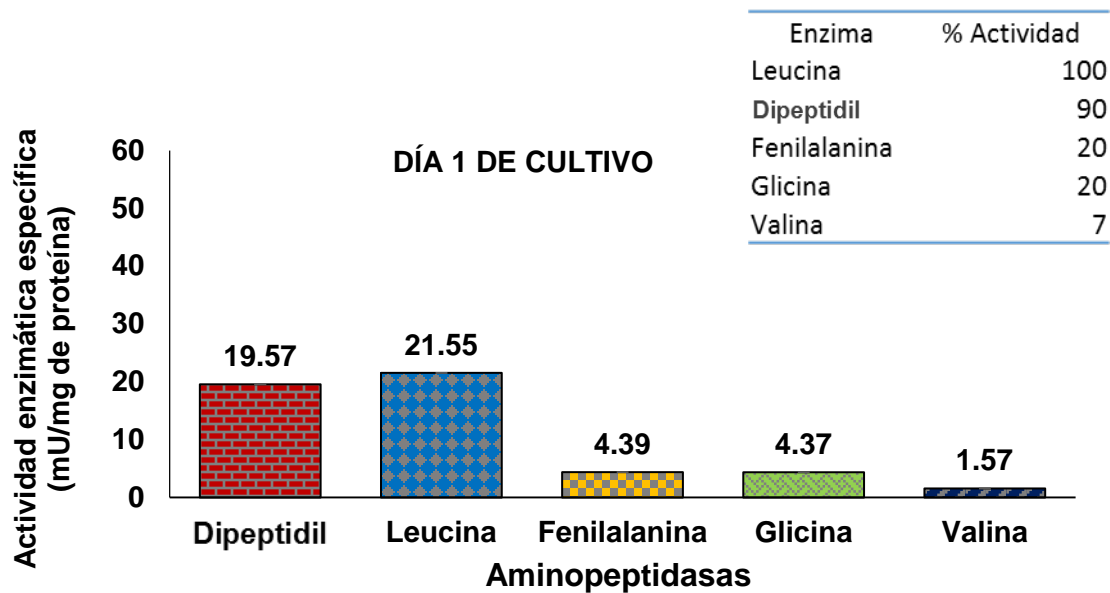


Figura 7. Actividad de aminopeptidasas en el día 1 de cultivo celular. A) Ensayos realizados con los sustratos Leu-pNA, Ala-Pro-pNA, Gly-pNA, Phe-pNA y Val-pNA cuya hidrólisis produce una coloración amarilla. Se muestra para cada ensayo el triplicado y los 2 tubos de la parte inferior son los controles realizados por duplicado. B) Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de a leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. (La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes).

Para el día 2 (Figura 8), la proteasa leucina-aminopeptidasa, aumentó su actividad un 20% aproximadamente comparada con el día 1 (25.41 mU/mg) y fue la enzima con actividad mayor. En el caso de dipeptidil aminopeptidasa, su actividad aumentó un 15% respecto al día 1 con un 90% de actividad. Para el caso de las enzimas fenilalanina y glicina aminopeptidasas ocurrió lo contrario ya que disminuyeron su actividad, en el caso de fenilalanina disminuyó un 15% de actividad (3.73 mU/mg) mientras que glicina aminopeptidasa disminuyó un 27 % de su actividad, dejándola con 3.19 mU/mg. Para valina aminopeptidasa disminuyó un 12 % de actividad con respecto al día 1, siendo este el 5% de la actividad total con 1.38 de mU/mg.

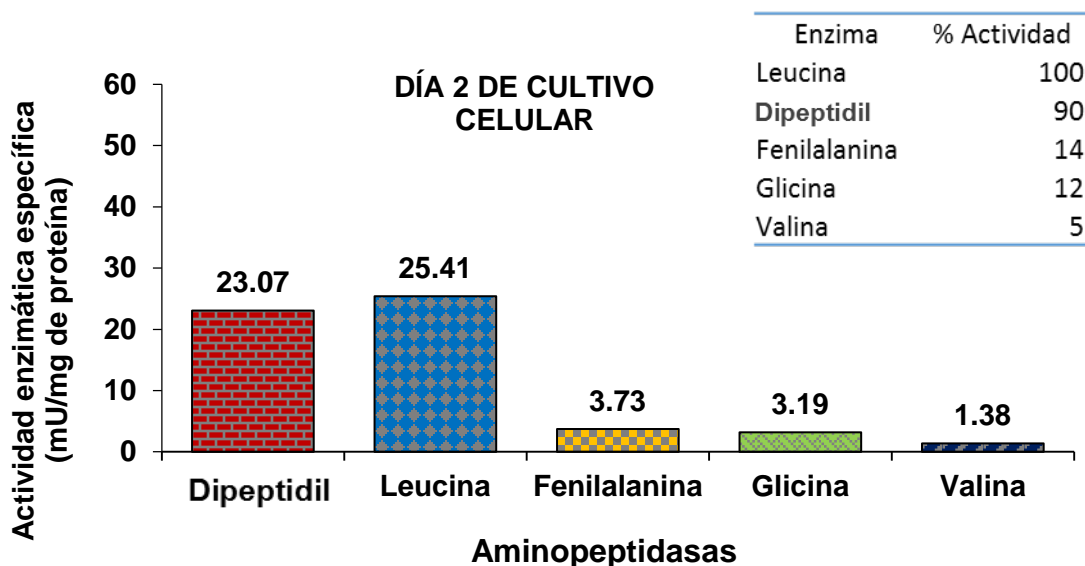


Figura 8. Actividad de aminopeptidasas en el día 2 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. (La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes).

En el día 3 (Figura 9), la enzima leucina aminopeptidasa registró un incremento del 18 % de actividad respecto al día 2, la actividad enzimática específica fue de 30 mU/mg. Respecto a la enzima dipeptidil aminopeptidasa, se observó un aumento del 20 % de actividad comparada con el día 2 y un 92 % de actividad con respecto a leucina aminopeptidasa. Para el caso de fenilalanina aminopeptidasa se presentó un aumento del 50% en la actividad enzimática con respecto al día 2, siendo esta la enzima que aumentó su actividad más que las 5 aminopeptidasas, con 5.7 de mU/mg. Para el caso de glicina aminopeptidasa también aumentó un 56% su actividad con respecto al día 2, quedando con 5 mU/mg de actividad. Para el caso de valina aminopeptidasa, no hubo cambio, solo un 3% menos de actividad con respecto al día 2, con 1.34 mU/mg. Siendo esta enzima la que no mostró cambios respecto a las demás proteasas.

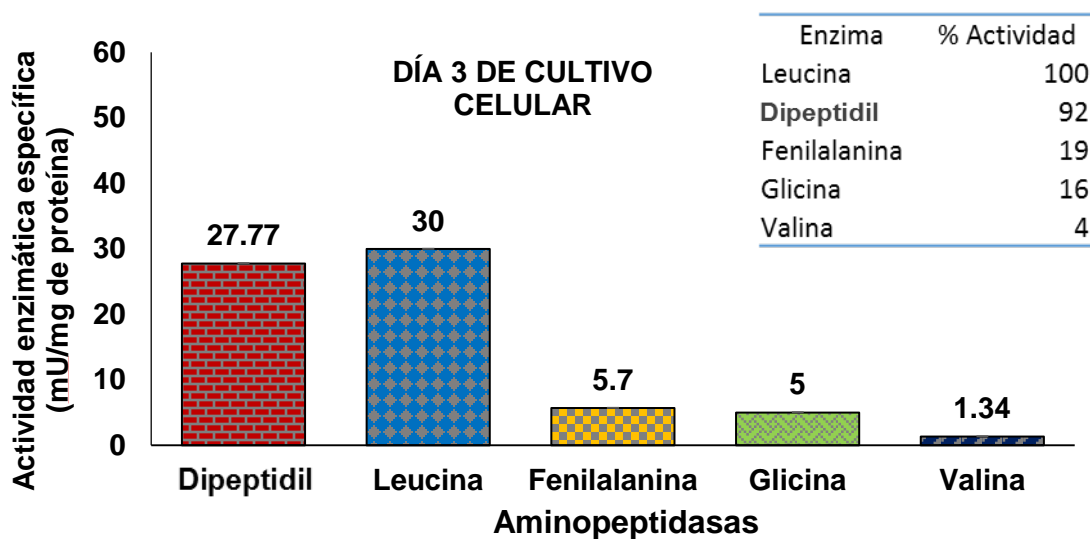


Figura 9. Actividad de aminopeptidasas en el día 3 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. (La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes).

En el día 4 (Figura 10), nuevamente la enzima leucina fue la de mayor de actividad enzimática específica con 31.8 mU/mg. Para el caso de dipeptidil aminopeptidasa, presentó una mínima disminución del 2% de su actividad con respecto al día 3 (27.038 mU/mg). Para fenilalanina y glicina aminopeptidasas se presentó una disminución del 20% de su actividad con respecto al día anterior, con 4.46 y 4.4 mU/mg de actividad. Y finalmente para valina aminopeptidasa se presentó un aumento del 32% con 1.77 8 mU/mg de actividad enzimática específica.

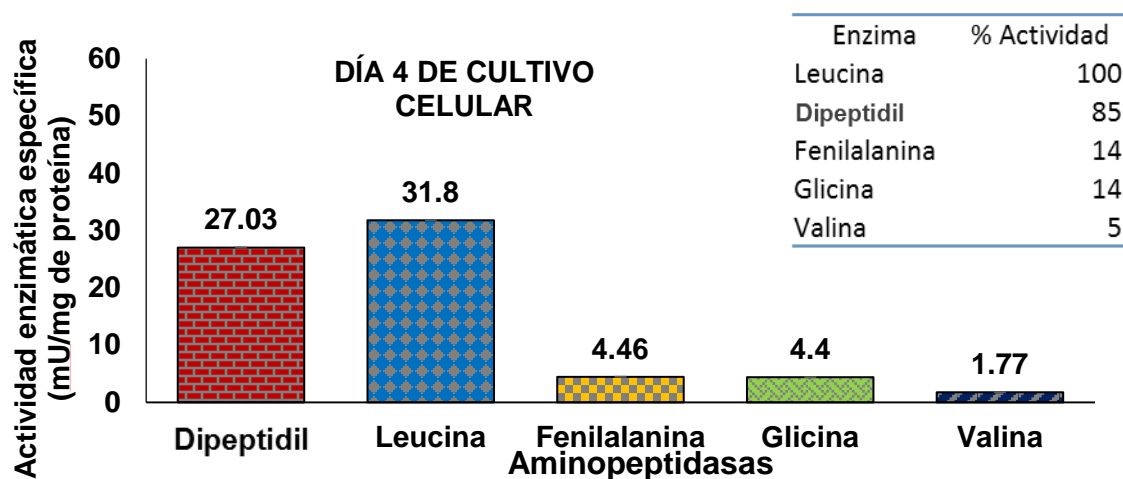
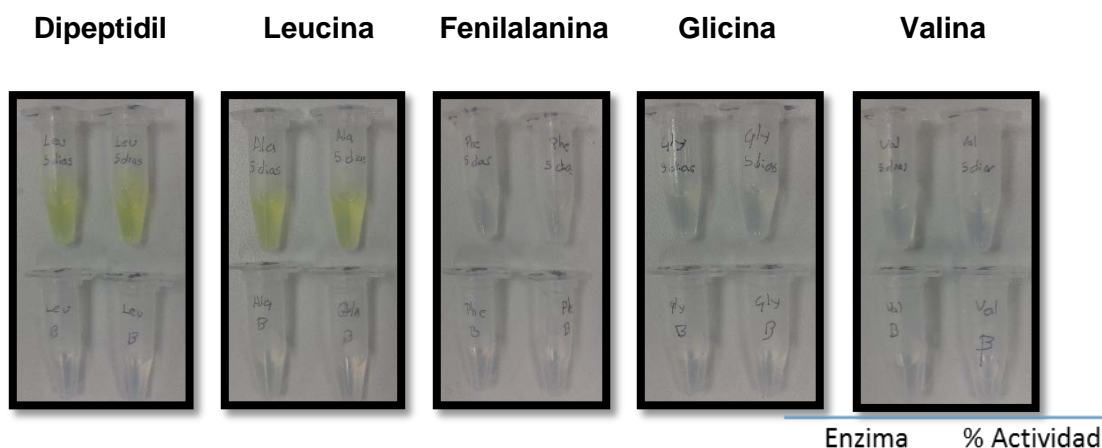


Figura 10. Actividad de aminopeptidasas en el día 4 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes.

El análisis de la actividad en el día 5 de cultivo que se ha reportado de inicio del envejecimiento en la levadura *S. pombe* se observó un incremento importante en las actividades de leucina y dipeptidil aminopeptidasa (Figura 11-A), siendo leucina la que registró un aumento del 57% de actividad específica con respecto al día 4, mientras que para dipeptidil aminopeptidasa, el aumento fue del 54% con respecto al día 4. La enzima fenilalanina aminopeptidasa solo presentó 4.76 mU/mg de actividad. En el caso de glicina aminopeptidasa se determinó un 4.28 mU/mg de actividad enzimática específica. Para valina aminopeptidasa la actividad aumentó 55% con respecto al día 4, quedando en 2.74 mU/mg de proteína de actividad específica (Figura 11B).

A



B

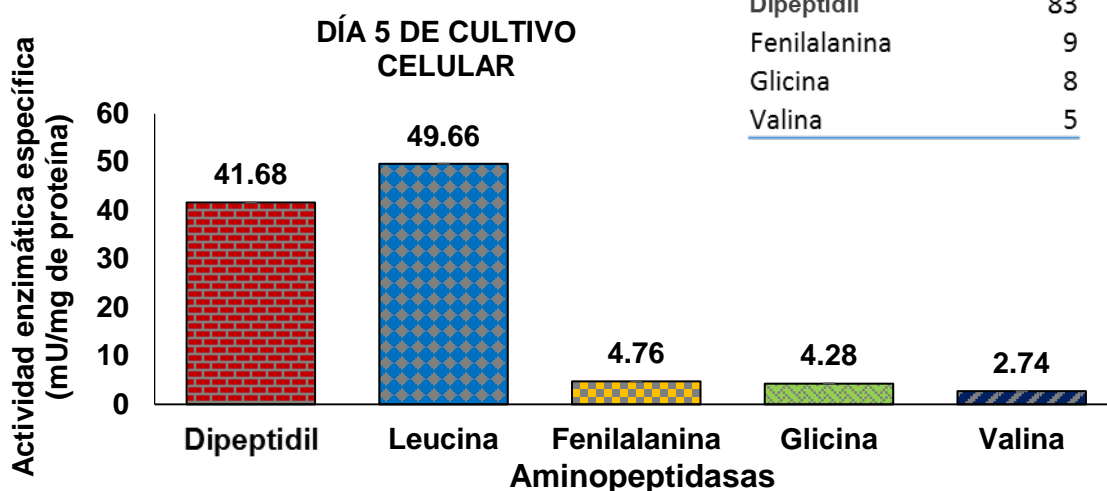


Figura 11. Actividad de aminopeptidasas en el día 5 de cultivo celular. A) Ensayos realizados con los sustratos Leu-pNA, Ala-Pro-pNA, Gly-pNA, Phe-pNA y Val-pNA cuya hidrólisis produce una coloración amarilla. Se muestra para cada ensayo el triplicado y los 2 tubos de la parte inferior son los controles realizados por duplicado. B) Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes.

Para el día 10 (Figura 12) el perfil de actividad identificado para las enzimas se modificó, de forma importante puesto que la enzima con mayor actividad fue dipeptidil aminopeptidasa, aunque respecto al día 5 su actividad disminuyó un 53% (21.84 de mU/mg) pero registró un 320% de actividad respecto a leucina aminopeptidasa. Para esta última, la actividad disminuyó un 87% con respecto al día 5, con solo 6.82 mU/mg de actividad. Fenilalanina aminopeptidasa, también

disminuyó el 80% de su actividad, comparada con el día 5. En el caso de glicina la disminución fue menor del 50% mientras que para la enzima valina aminopeptidasa también presentó una disminución del 78% con 0.61 mU/mg de actividad.

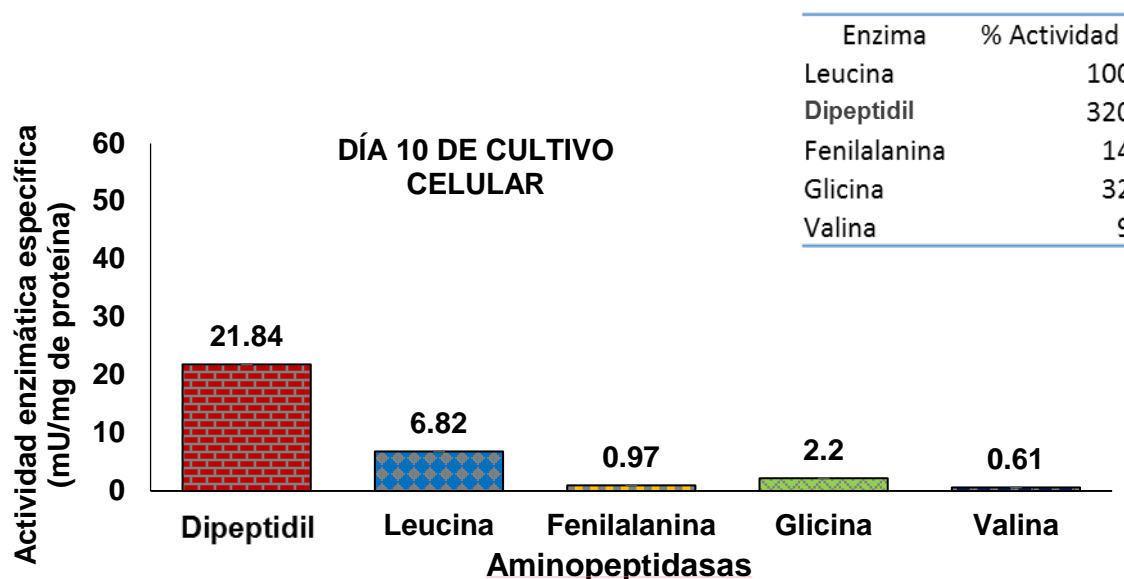


Figura 12. Actividad de aminopeptidasas en el día 10 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes.

En el día 15 (Figura 13) las actividades más altas fueron las de dipeptidil aminopeptidasa que aumentó un 17% respecto al día 10, con 25.46 de actividad y 325% de aumento de actividad específica respecto a leucina aminopeptidasa que registró solo 7.82 mU/mg de actividad. Para fenilalanina aminopeptidasa presento un aumento del 65% con respecto al día 10, con 1.61 de actividad enzimática específica. Para glicina aminopeptidasa la actividad fue de 2.26 mU/mg de actividad. Por último, la proteasa valina aminopeptidasa tuvo solo 0.8 mU/mg de actividad.

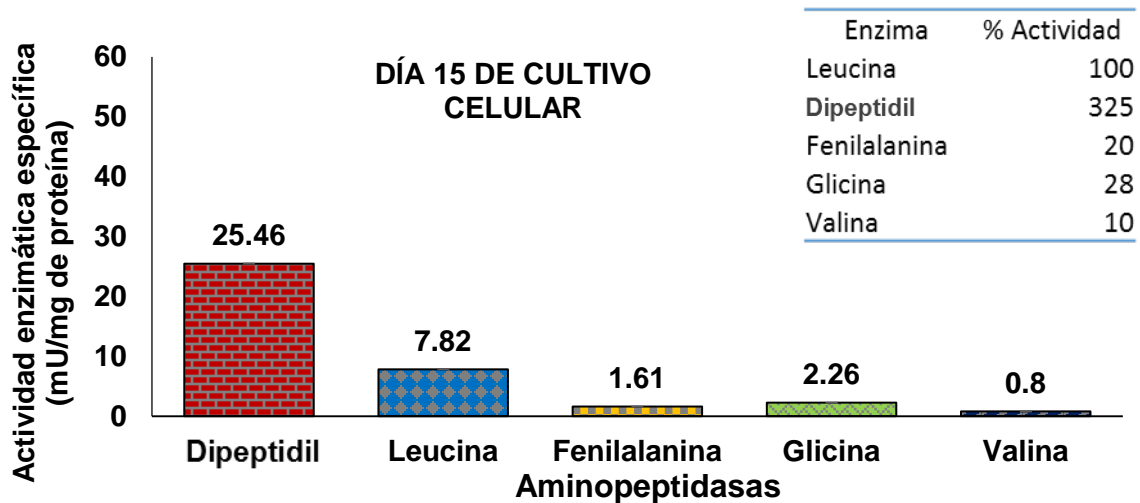


Figura 13. Actividad de aminopeptidasas en el día 15 de cultivo celular. B) Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes.

Para el día 30 (Figura 14) que fue el último día de estudio, disminuyeron cuatro de las enzimas estudiadas. La proteasa con actividad mayor fue dipeptidil aminopeptidasa, que fue similar a la del día 15, aunque disminuyó un 5% respecto al día 15, observando solo 23.3 mU/mg de actividad teniendo un aumento del 1370 % con respecto a leucina aminopeptidasa, cuya actividad disminuyó un 80% con respecto al día 15, solo 1.7 mU/mg de actividad enzimática. Para el caso de fenilalanina aminopeptidasa hubo una disminución del 82% con respecto al día 15, registrando 0.19 de actividad enzimática, para glicina aminopeptidasa la disminución fue del 85%, con 0.42 mU/mg de actividad enzimática. Y finalmente, valina aminopeptidasa disminuyó un 85% con una actividad enzimática específica de 0.1 mU/mg.

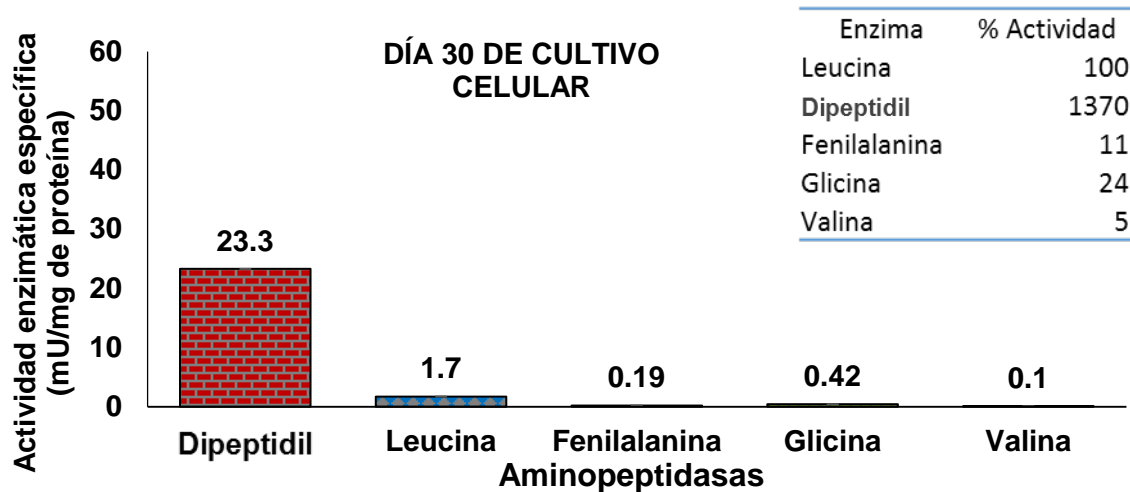


Figura 14. Actividad de aminopeptidasas en el día 30 de cultivo celular. Cuantificación de la actividad enzimática por espectrofometría a 405 nm. Se consideró a la actividad de leucina aminopeptidasa como 100% de actividad. La determinación de la actividad se realizó en 3 ensayos independientes.

Los resultados obtenidos anteriormente, sugieren que cada enzima estudiada tiene una expresión diferencial en el cultivo, cada una de las actividades enzimáticas específicas de aminopeptidasas va aumentando progresivamente hasta el día 5 donde se observó la máxima actividad enzimática. Después del día 5 se inicia el envejecimiento celular y se pierde la actividad de algunas proteasas. Y es hasta el día 30 donde finalmente, se observó que la actividad de la mayoría de las enzimas en estudio se perdió.

10.3. Perfil de actividad de enzimas específicas con menor actividad en los 30 días de estudio

En este trabajo se encontró que las enzimas fenilalanina, glicina y valina fueron las enzimas que menor actividad presentaron de las 5 evaluadas, por lo que la figura 15 muestra los cambios de estas enzimas en los días de estudio. Los resultados muestran que fenilalanina y glicina aminopeptidasa incrementó su actividad hasta el día 5, su día de máxima actividad fue el día 3; sin embargo, disminuyendo severamente en los días 10 al 30. Este patrón de actividad enzimática también se presentó en valina aminopeptidasa, solo que la actividad es mucho menor, teniendo su máximo al día 5.

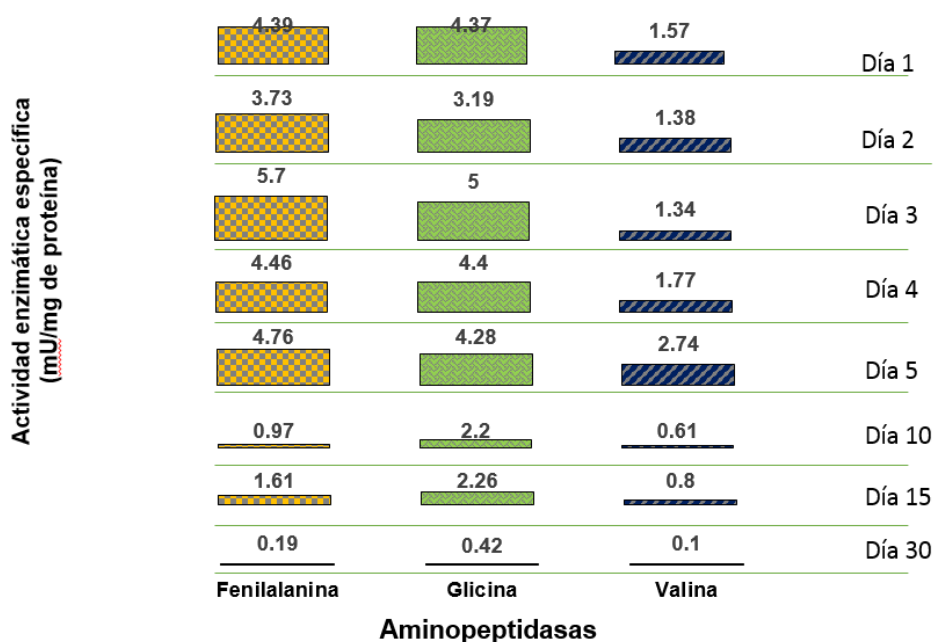


Figura 15. Actividad enzimática específica de fenilalanina, glicina y valina aminopeptidasas en los días de estudio (mU/mg).

10.4. Análisis de las actividades enzimáticas de las 5 proteasas evaluadas durante los 30 días de cultivo

En la figura 16 se muestra la actividad de las 5 enzimas estudiadas y en la tabla 5, su porcentaje de actividad, considerando como 100% la actividad de leucina aminopeptidasa en el día 1. En general, se identificó que en los primeros 5 días, que corresponden a células jóvenes, la actividad enzimática tiende a incrementar, siendo leucina aminopeptidasa la que tuvo mayor actividad hasta el día 5; sin embargo, después de este día la actividad de todas las enzimas disminuyó considerablemente y se mantuvo un valor similar para cada enzima tanto en el día 10 como en el día 15 (fig. 16), en el día 30 la actividad disminuyó notablemente, con respecto al pico máximo de actividad que fue el día 5 (tabla 5). Durante la etapa de envejecimiento celular, destacó la disminución severa de todas las aminopeptidasas estudiadas y el cambio en la morfología que presentaron las células, caracterizado por estructuras heterogéneas, así como la presencia de células muertas (Figuras 5 y 6).

A diferencia de leucina aminopeptidasa, Fenilalanina y glicina aminopeptidasas presentaron una actividad considerablemente constante (del 20% al 22%, tabla 5 durante los primeros 5 días). En cambio, aunque valina aminopeptidasa fue la proteasa evaluada que presentó menor actividad, hacia el día 5, aumentó su actividad 1.8 veces con respecto al primer día (7% día 1 y 13% día 5, tabla 5). Por lo que hasta este día valina-aminopeptidasa tuvo una tendencia similar a leucina y dipeptidil aminopeptidasas, aunque la actividad de valina aminopeptidasa fue baja con respecto a todas las otras proteasas estudiadas.

En células envejecidas, las enzimas Leucina y dipeptidil aminopeptidasas fueron las proteasas que presentaron el mayor incremento en su actividad enzimática al día 5, aumentando 2.3 y 2.1 veces, respectivamente (tabla 5). Cabe resaltar que dipeptidil aminopeptidasa fue la única proteasa de las estudiadas cuya actividad fue alta y se mantuvo desde el día 1 hasta el 30 de cultivo, siendo 1.1 veces, mayor al día 30, por lo que será de gran interés estudiar más adelante el papel de dipeptidil aminopeptidasa en la viabilidad celular, debido a que en ninguno de los

días evaluados disminuyó; sin embargo, resultó interesante identificar que conservó el mismo patrón observado para leucina y valina aminopeptidasa, las cuales presentaron picos máximo de actividad hacia el quinto día y posteriormente conforme avanzaba el proceso de envejecimiento se disminuyó considerablemente (Figura 16, tabla 5).

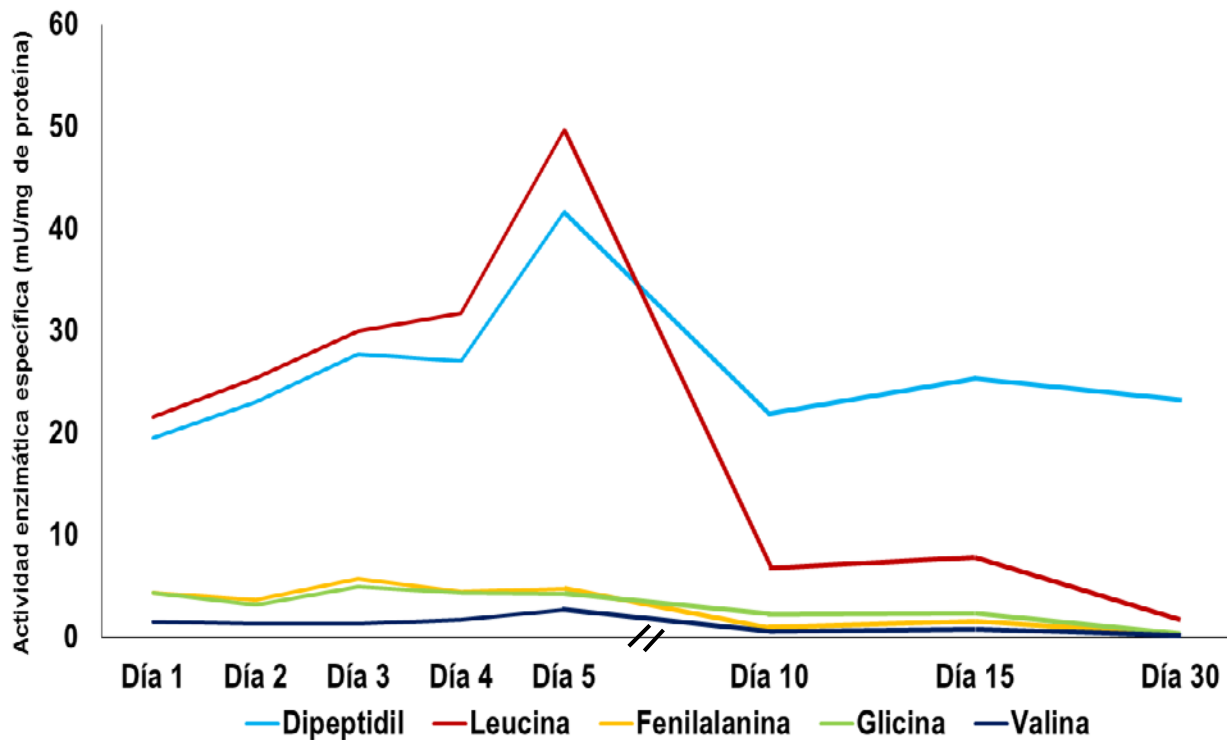


Figura 16. Gráfica global de la actividad enzimática específica de las 5 aminopeptidasas a lo largo del estudio.

Tabla 4. Porcentaje de la actividad de las 5 aminopeptidasas. La actividad de leucina aminopeptidasa del día 1 se consideró como el 100% = 21.55 mU/mg.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 10	Día 15	Día 30
Leucina	100%	118%	139%	147%	230%	32%	36%	8%
Dipeptidil	91%	107%	129%	125%	193%	101%	119%	108%
Fenilalanina	20%	18%	26%	21%	22%	6%	7%	1%
Glicina	20%	15%	23%	20%	20%	10%	10%	2%
Valina	7%	6%	6%	8%	13%	3%	4%	1%

11. DISCUSIÓN

Las aminopeptidasas realizan funciones celulares esenciales, sirven en el metabolismo humano, en la regulación de los niveles de hormonas peptídicas, participan en la digestión de proteínas en el intestino, así como en la maduración y en la determinación de la estabilidad de proteínas. Sin embargo, también se ha identificado que muchos estados de enfermedad (cáncer, daño renal y daño hepático) están asociados con una función proteolítica alterada (Vollmar y col. 2011).

En este trabajo, se analizaron cinco proteasas del tipo aminopeptidasas para evaluar su actividad en el envejecimiento celular. Al inicio del envejecimiento celular, que en *S. pombe* corresponde con el quinto día de cultivo según la investigación de Roux A. (2009), destacó el incremento en la actividad de dipeptidil y leucina aminopeptidasas; sin embargo, aunque ambas disminuyeron su actividad a partir del envejecimiento celular, dipeptidil aminopeptidasa a diferencia de todas las enzimas evaluadas mantuvo su actividad enzimática similar al primer día, es decir, fue activa tanto en células jóvenes como en células envejecidas, por lo que esto sugiere que su actividad pudiera estar relacionada con el mantenimiento de la viabilidad celular de *S. pombe*.

Cabe resaltar que en levaduras existen 2 formas proteicas de dipeptidil aminopeptidasa, una termo-estable y otra termo resistente, codificadas por el gen DAPC (dipeptidil termo-estable) y DAPK (dipeptidil termo-resistente), por lo que la regulación de la expresión de uno u otro gen podría estar relacionada con la capacidad de supervivencia de la célula en ambientes extremos, por lo que su relación en el proceso de envejecimiento tendrá que ser elucidada en estudios posteriores. Aunque no se conoce la función de las dipeptidil aminopeptidasas descritas en *S. pombe*, en *Homo sapiens* se conoce que juega un papel importante en la digestión final de los péptidos involucrados en los procesos digestivos. También puede jugar un papel crítico en la patogénesis de enfermedades relacionadas con cálculos biliares y es muy utilizado como un marcador para la leucemia mieloide aguda. Los defectos en este gen parecen

estar relacionados con varios tipos de leucemia (Caprioglio D. y col 1993). Adicionalmente, la enzima se utiliza como un biomarcador para detectar daño renal causado por medicamentos y otros agentes químicos (Villaseñor M. 2013).

Un dato muy interesante derivado de este trabajo, fue la disminución de la actividad de leucina aminopeptidasa al inicio del envejecimiento celular, lo sugiere que ésta enzima podría ser un candidato a estudiar como marcador de envejecimiento celular, ya que presentó una alta actividad en los primeros días y un declive de la misma en la etapa de envejecimiento de *S. pombe*. Hasta el momento no se conoce la función de la enzima en la levadura pero en humanos tiene un papel importante, ya que son enzimas que se utiliza como biomarcador para diagnosticar posible daño a nivel hepático (Berk P. 2011). En plantas esta enzima participa en la regulación de la respuesta inmune en el tomate y en el tabaco y para algunas plantas marinas, leucina aminopeptidasa se expresa para hacer frente a la amenaza osmótica ante alta salinidad, en un intento de equilibrar la elevada concentración de iones (Gu YQ. 2002).

Otra de las enzimas que podría ser importante para el crecimiento celular es fenilalanina aminopeptidasa pues se detectó mayoritariamente en células jóvenes, en las cuales se mantuvo su actividad, aunque no podría considerarse un marcador de envejecimiento celular debido a que su actividad no se incrementó de manera importante en comparación con dipeptidil y leucina aminopeptidasas. Es posible que su actividad esté relacionada con el crecimiento de la levadura y no con el proceso de envejecimiento, aunque no se ha descrito su papel en *S. pombe*. La baja actividad enzimática identificada para glicina aminopeptidasa y valina aminopeptidasa, similar a fenilalanina aminopeptidasa, muestra que su papel más predominante podría estar relacionado con etapas más tempranas de la vida celular.

12. COMENTARIO

- La leucina aminopeptidasa en levaduras posiblemente tiene un papel importante en procesos de división celular a lo largo del crecimiento del cultivo, siendo indispensable en condiciones de crecimiento prolongado, como en la fase estacionaria, para el mantenimiento y viabilidad celular, por lo que esta enzima puede ser el mejor marcador biológico de envejecimiento puntualizado para esta investigación.

12. CONCLUSIONES

- Tanto células jóvenes como envejecidas de la levadura *S. pombe* presentan actividad enzimática importante de dipeptidil aminopeptidasa, por lo que su actividad podría estar relacionada con el mantenimiento de la viabilidad celular.
- La enzima leucina aminopeptidasa podría ser de utilidad como marcador de envejecimiento celular pues su actividad disminuye considerablemente a partir del inicio de esta etapa de la vida de *S. pombe*.
- Las proteasas fenilalanina, glicina y valina aminopeptidasas no presentan actividad enzimática significativa durante el proceso de envejecimiento celular de *S. pombe*, por lo que no son buenos candidatos para ser marcadores de envejecimiento celular.

13. SUGERENCIAS

- Se sugiere la evaluación de estas 5 enzimas sometidas a purificación parcial.
- Separar las dos actividades de dipeptidil aminopeptidasa y analizar su papel en el envejecimiento de la levadura.
- Caracterizar el papel de leucina aminopeptidasa como marcador de envejecimiento.

14. BIBLIOGRAFIA

- Roux AE, Quissac A, Chartrand P, Ferbeyre G, Rokeach LA. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell*, 5(4):345-57.
- Ayoub N, Goldshmidt I, Cohen A. (1999). Position effect variegation at the mating-type locus of fission yeast: a cis-acting element inhibits covariegated expression of genes in the silent and expressed domains. *Genetics*. 152(2):495-508.
- Baur J, Sinclair DA, (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6):493-506
- Berk P, Korenblat K. (2011) Aproximación al paciente con ictericia o pruebas hepáticas anormales. En: Goldman L, Schafer AI, Eds. *Medicina Cecil*. Ed 24. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. Chapter 149.
- Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G. (1998). Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett*. 14; 9(1):e85335.
- Caprioglio DR, Padilla C, Werner-Washburne M. (1993) Isolation and characterization of AAP1. A gene encoding an alanine/arginine aminopeptidase in yeast. *J Biol Chem*. Jul 5; 268(19):14310-5.
- Son C, David. (1989) "Carboxypeptidase A" *Ass. Chem. Res*. 22: 62-69.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*. 325(5937):201-4.
- CONAPO 2010. Consejo Nacional de Población. <http://www.conapo.gob.mx/en/CONAPO/Envejecimiento>
- Crichton P, Affourtit C, Moore A. (2007) Identificación de un alcohol deshidrogenasa mitocondrial en *Schizosaccharomyces pombe*: nuevos conocimientos sobre el metabolismo de la energía. *Biochemical Journal*. 401:459-464.

- Davey K, Imai Y, Yamamoto M, Matthews G. (1994). Isolation and characterization of krp, a dibasic endopeptidase required for cell viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. ; 13(24):5910-21.
- Delgado CA, Munguillon L, Joglar TJ. (2004). Introducción a la Química Terapéutica. Diaz de Santos S.S.
- Dawson RM, Elliott DC, Elliott WH, Jones, KM. (1996) Data for Biochemical Research, pp. 1-31.
- Fabrizio P, Longo V. (2008). Chronological aging-induced apoptosis in yeast. Biochim Biophys.; 1783(7):1285.
- Frey J, Röhm KH. (1978). Subcellular localization and levels of aminopeptidasas and dipeptidase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. 10; 527(1):31-41
- Fabrizio P, Longo V. (2003). The chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell 2: 73–81.
- Graham S, Lilley P, Lee M, Schaeffer P, Kralicek A, Dixon N, Guss J. (2006). El análisis cinético y cristalográfico del mutante de *Escherichia coli* aminopeptidasa P: conocimientos sobre el reconocimiento del sustrato y el mecanismo de la catálisis. Bioquímica. 45: 964-75.
- Guarente L, Kenyo, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. Nature, 9; 408(6809):255-62
- Gu YQ, Walling LL. (2002) "La identificación de los residuos críticos para la actividad de la aminopeptidasa herida inducida por leucina (LAP-A) de tomate". European Journal of Biochemistry / FEBS. 269 (6): 1630-1640.
- Howitz KT. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature. 425: 191-196.
- Jone JH. (1985). Amino Acids, Peptides and Proteins. Specialist Periodical Reports 16. London: Royal Society of Chemistry. p. 389.
- Kaeberlein M, Burtner C, Kennedy BK. (2007). Recent developments in yeast aging. Genetics, 59(4):340-8.
- Kerr J. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology. 181-182:471-4.

- Ladds G, Davey J. (2000). Identification of proteases with shared functions to the proprotein process in protease Krp1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 38(4):839-53.
- Longo V, Fabrizio P. (2002). Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 903–908.
- Lelli J, Becks L, Dabrowska M, Hinshaw D. (1998). ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med*; 25(6):694-702.
- Lee Y, Shacter E. (1999). Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem.* 274(28):19792-8.
- Lennon S, Martin S, Cotter T. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24(2):203-14.
- Madera V. (2002). La secuencia del genoma de *Schizosaccharomyces pombe*. *Naturaleza*. 415: 871-880.
- Marquez D. (2005). Expresión del gen y la actividad enzimática de las aminopeptidasas yspl y yspII, y las dimetil aminopeptidasas yspC y yspK bajo limitantes nutricionales en *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de maestría. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martin G. (2007). Biology of aging. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. 99(1-2):84-95.
- Michán S, Sinclair D. (2007). Sirtuins in mammals: insight into their biological function. *The Biochemical Journal*. 404(1):1-13
- Nanus D, Engelstein D, Gastl G, Gluck L, Vidal M, Morrison M, Finstad C, Bander N, Albino A. (1993). SEQUENCE [mRNA], PROTEIN SEQUENCE OF 242-251; 300-316 AND 369-377, VARIANTS ARG-213 AND ALA-218. 90:7069-7073
- Organización Mundial de la Salud (OMS)
<http://www.who.int/ageing/publications/es/>

- Parrella E, Longo VD. (2010). Insulin/IGF-I and related signaling pathways regulate aging in nondividing cells: from yeast to the mammalian brain. *Scientific World Journal*. 10:161-77.
- Powers R, Kaeberlein M, Caldwell S, Kennedy B, Fields S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*. 20(2):174-84.
- Rodes T, Guardia M. (1997) *Biología del envejecimiento*. Editorial Masson. Edición 1ª. Barcelona. Pp. 3475.
- Roux A, Leroux A, Alaamery M, Hoffman C, Chartrand P, Ferbeyre, G, Rokeach L. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. 5(3):e1000408.
- Salgado A, Guillén F. (1990) *Manual de Geriatria*. Editorial Salvat. Barcelona (España); 1-17.
- Sakurai M, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y. (2004) Un tipo distinto de la alcohol deshidrogenasa, ADH4 +, complementa la fermentación del etanol en una cepa deficiente en ADH1 de *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Investigación*. 6: 649-654.
- Schafer F, Buettner G. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30 (11): 1191-212.
- Seoane G. (2012). Estudio de las actividades proteolíticas en el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de licenciatura en Biología. Escuela de Biología. Instituto de ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Sedmak J, Grossberg SE. (1976). A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem*. 79(1-2):544-52.
- Sträter N, Sun L, Kantrowitz ER, Lipscomb WN (1999). A bicarbonate ion as a general base in the mechanism of peptide hydrolysis by dizinc leucine aminopeptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (20).

- Taylor A. (1993). Amino-peptidases: structure and function". The FASEB Journal. 7(2):290-8.
- Valko M, Morris H, Croni M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem. 12(10):1161-208
- Villaseñor-Cardoso MI, Frausto-Del-Río DA, Ortega E. (2013) Amino-peptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. Biomed Res Int. 2013:562984.
- Vollmar M, Kochan G, Krojer T, Harvey D, Chaikuad A, Allerston C, Muniz, JR, Raynor J. (2011). Crystal structure of the open state of human endoplasmic reticulum amino-peptidase 1 ERAP1
- Weindruch R. (1996). Calorie restriction and aging. Scientific American, 274 (1): 46-52.
- Wilce M, Bond C, Dixon N, Freeman H, Guss J, Lilley P, Wilce J. (1998). Estructura y mecanismo de una amino-peptidasa específica de prolina a partir de *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. 95 (7); 3472-7.
- Wilhelm J. (2008). Repertorio dinámico de un transcriptoma eucariota encuestado a una resolución de un solo nucleótido. Naturaleza. 453: 1239-1243
- Yoshimoto T, Murayama H, Tono H, Tsuru D. (1988). Clonación y expresión del gen de amino-peptidasa P de *Escherichia coli* HB101 y caracterización de la enzima expresada. J Biochem. 104 (1); 93-7.
- Yamada A, Dairi T, Ohno Y, Huang X, Asano Y. (1995) Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [GENOMIC DNA]. 11059.
- Zahn J, Poosala S, Owen A, Ingram D, Lustig A. (2007) AGEMAP: Una base de datos de expresión génica para el envejecimiento en ratones. PLoS Genet. 3 (11): E201.
- Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner D. (1999). Proteolytic processing in the secretory pathway. J Biol Chem. 274: 20745-20784.