

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN “Ahp” CON CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA OBTENIDO DE SEMILLA DE *Cucurbita argyrosperma sororia*

M.F. León-Galván, M.A. Rocha-Mendoza, M.C. Del Rincón-Castro y E. Mares-Mares

Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Km 9 de la Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Gto. CP. 36500, México.*ingfaby@yahoo.com.mx y rocham_azucena@hotmail.com

RESUMEN:

En este proyecto el gen denominado “Ahp” es un gen homeótico de un gen con propiedades antihipertensivas, el cual actúa como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que juega un papel crucial en el sistema renina angiotensina aldosterona, es bien conocido para catalizar la conversión del decapeptido angiotensina I en el octapéptido angiotensina II fisiológicamente activa, desencadenando el aumento de presión arterial. Por tal motivo el objetivo del proyecto fue aislar y caracterizar molecularmente el gen “Ahp” con capacidad antihipertensiva obtenido de semilla de *Cucurbita Argyrosperma sororia*. El cual competirá con la enzima convertidora de angiotensina por el sustrato (angiotensina I) previniendo así la hipertensión arterial. Generando opciones una vez obtenido y caracterizado para crear un sistema recombinante para su expresión. Esto con la finalidad de que pueda ser incorporado en alimentos funcionales.

ABSTRACT:

In this project the gene called "Ahp" is a homeobox gene of a gene with antihypertensive properties, which acts as an ACE inhibitor (ACE), which plays a crucial role in the renin angiotensin aldosterone system, is well known for catalyze the conversion of the decapeptide angiotensin I to the octapeptide angiotensin II physiologically active, triggering an increase in blood pressure. Therefore the aim of the project was to isolate and molecularly characterize gene "Ahp" with antihypertensive capacity obtained seed *Cucurbita Argyrosperma sororia*. Which compete with angiotensin converting enzyme substrate (angiotensin I) thus preventing hypertension. Generating options once obtained and characterized to create a system for recombinant expression. This in order that it can be incorporated in functional foods.

Palabras clave: *Ahp*, Antihipertensivo, *Cucurbita*

Keywords: *Ahp*, Antihypertensive, *Cucurbita*.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los temas de alimentación relacionados con la salud son prioritarios, los consumidores, buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Siguiendo esta tendencia, reciben información sobre las propiedades saludables de los alimentos, en especial de aquellos que ejercen una acción favorable sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad como los alimentos funcionales (Araya *et al.*, 2005).

En este tipo de alimentos se busca la prevención de enfermedades ocasionadas por el estilo de vida del consumidor como pueden ser entre otras los padecimientos cardiovasculares. la hipertensión arterial (HTA) es uno de los factores de riesgo más importantes para padecer dichas enfermedades que son importantes causas de mortalidad en México (Campos *et al.*, 2013). La hipertensión se presenta cuando, la presión de la sangre se eleva debido al estrechamiento de las arterias, que son las encargadas de regular el flujo sanguíneo en el cuerpo; de acuerdo con la OMS, los parámetros internacionales para considerar hipertensión son presión sistólica mayor a 140 mmHg y diastólica superior a 90 mmHg (OMS, 2013b).

Una manera factible de combatir esta problemática es complementar con ingredientes de origen natural con propiedades benéficas, como la semilla de la especie *Cucurbita Argyrosperma sororia*, la cual es utilizada en la alimentación y especialmente la calabaza se destaca dentro de la dieta de comunidades rurales del centro-sur de México. En la planta de la calabaza el mayor valor nutritivo se encuentra principalmente en la semilla (Florentino *et al.*, 1995), ya que aporta una alta concentración de nutrientes de los que incluye proteína bruta 35.4%, Fibra bruta 18.2%, Calcio 0.44%, entre otros componentes (Bautista *et al.*, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las semillas

Las semillas de chicayota se adquirieron en el mercado de Ometepec, Azoyú y Marquelia Gro.

Extracción de RNA total, método de cloruro de litio

Para el método de cloruro de litio (Manning, 1991, modificado por Barrera y León, 2008). Se sintetizó de cDNA se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante de Smarttm. Se diseñaron los oligonucleótidos para un fragmento de *Ahp* se realizó la búsqueda y obtención de las secuencias de proteínas tipo *Ahp* reportadas en otros organismos taxonómicamente cercanos a chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*), en base de datos del National Center for Biotechnology (NCBI), posteriormente se realizó el análisis bioinformático con el software Bioedit.

Se Identificó el fragmento de *Ahp* de Chicayota Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se amplificó Rápida de Extremos de cDNA (RACE): La técnica del RACE es un procedimiento usual para la clonación de la secuencia completa de un cDNA a partir de una secuencia parcial conocida previamente, puede emplearse para la clonación de la región 5' o 3' del cDNA completo.

Se purificaron los fragmentos amplificados se realizó empleando el Kit gene clean de QIAGEN. Se realizó aislamiento y ensamblaje del gen *Ahp* completo, primeramente un análisis bioinformático para obtener el marco de lectura abierto (ORF), para esto, se analizó la secuencia completa en el programa EXPASYPROTEOMICSERVER. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://expasy.org>).

Caracterización Bioinformática del Gen *Ahp*

La caracterización del gen *Ahp*, se realizó en primer plano con el análisis bioinformático de las secuencias en la base de datos de NCBI. Posteriormente las secuencias obtenidas mediante el RACE se analizaron en el programa MacVector y BLASTx para la obtención de la secuencia completa codificante para el gen *Ahp* de Chicayota.

Clonación del Gen *Ahp* y Transformación Genética

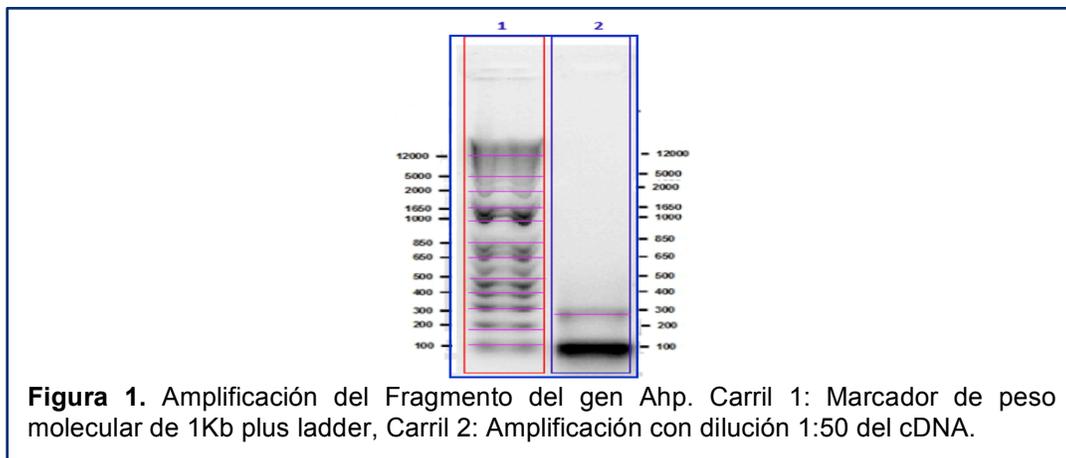
Se realizó con la ligación en vector Topo 4 cloning for sequences y transformación química (choque térmico) en células de *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido Recombinante. La Extracción de DNA Plasmídico por lisis alcalina y comprobación del inserto del gen de interés: Las bacterias genéticamente modificadas se crecieron en medio LB más kanamicina para extraer DNA plasmídico siguiendo el protocolo de QIAprep Spin Miniprep Kit.

Modelamiento de la Proteína

El modelamiento tridimensional de la estructura de la proteína se *realizó in silico* con el programa Swiss-Model utilizando la secuencia de aminoácidos obtenida a partir del Marco de Lectura Abierto (ORF).

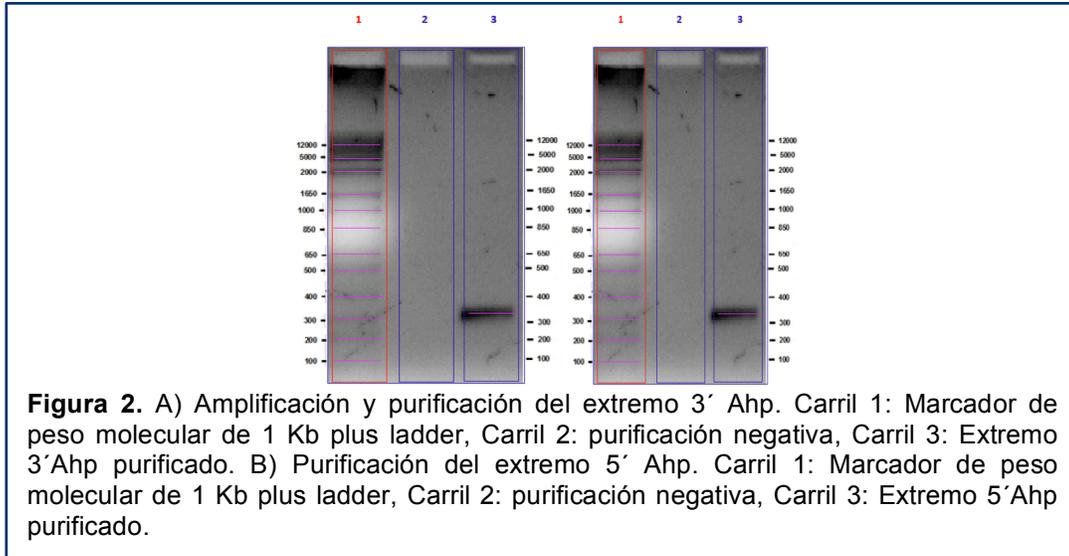
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se detectó de la presencia del gen *Ahp* y se comprobó por PCR, esta técnica permitió la amplificación de un amplicón aproximadamente de 250 pb, para tal amplificación se utilizó diferentes concentraciones de cDNA, (dilución 1:50, 1:75, 1:100, 1:200) y se realizó un gradiente de temperatura de 48 a 55°C. Se analizó en electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1%, en la cual la mejor amplificación se aprecia en la dilución 1:50 y 54° de alineamiento al obtener una banda sin barrido.

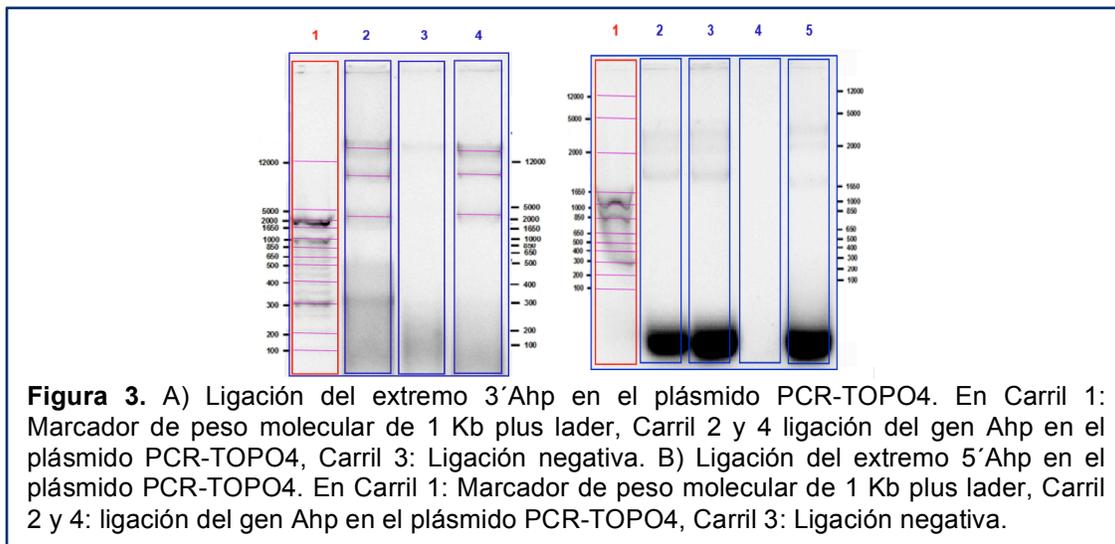


En la figura 2 se amplificaron, los extremos 5' *Ahp* y 3' *Ahp*. Al respecto, el extremo 5' se obtuvo un amplicón de 430 pb con la dilución 1:75 de cDNA y 65°C de alineamiento y el extremo 3' se obtuvo un amplicón de 350 pb con la dilución 1:50 y 53°C de alineamiento y se purificaron para su posterior clonación se hicieron tres

reacciones de PCR para cada uno, lo anterior con la finalidad de obtener suficiente muestra para poder realizar la purificación con un buen rendimiento (concentración). Las reacciones de PCR se analizaron en gel de agarosa desnaturalizante al 1% y se visualizaron en el fotodocumentador GelDoc System de Bio-Rad.



En la figura 3 se aprecia la ligación y transformación en la que las bacterias genéticamente modificadas que se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) más antibiótico después de 16 horas de incubación a 37 °C presentaron crecimiento, visible por la presencia de turbidez en el medio líquido LB, de forma preliminar, esto indicó que si las bacterias tenían la capacidad de crecer en medio con antibiótico, efectivamente eran transformantes.



Posterior a la identificación del crecimiento de las bacterias se realizó extracción del DNA plasmídico como se describió en materiales y métodos. Se obtuvo el DNA plasmídico aproximadamente de 4000 pb, y fue comprobado por análisis de

restricción con una PCR con los oligonucleótidos específicos utilizados para el aislamiento del fragmento Ahp. Es importante destacar que la mayoría de las clonas seleccionadas fueron positivas, con lo anterior se concluyó que la eficiencia de transformación.

En la figura 4 se muestra la caracterización bioinformáticamente el gen Ahp el cual, se sometió a análisis comparativos en la plataforma bioinformática del NCBI y se optó por la opción Nucleotide Blast, con esto se buscó que la secuencia identificada en chicayota se comparara a nivel de DNA con todas las secuencias reportadas en la base de datos. El análisis, indica que la secuencia aislada tiene una identidad del 90% con un RNA que codifica para una Kinin reportada en *Nilaparvata lugens* (Sequence ID: AB817264.1), la cual es una proteína que se involucra directamente en el sistema de presión arterial como vasodilatador.

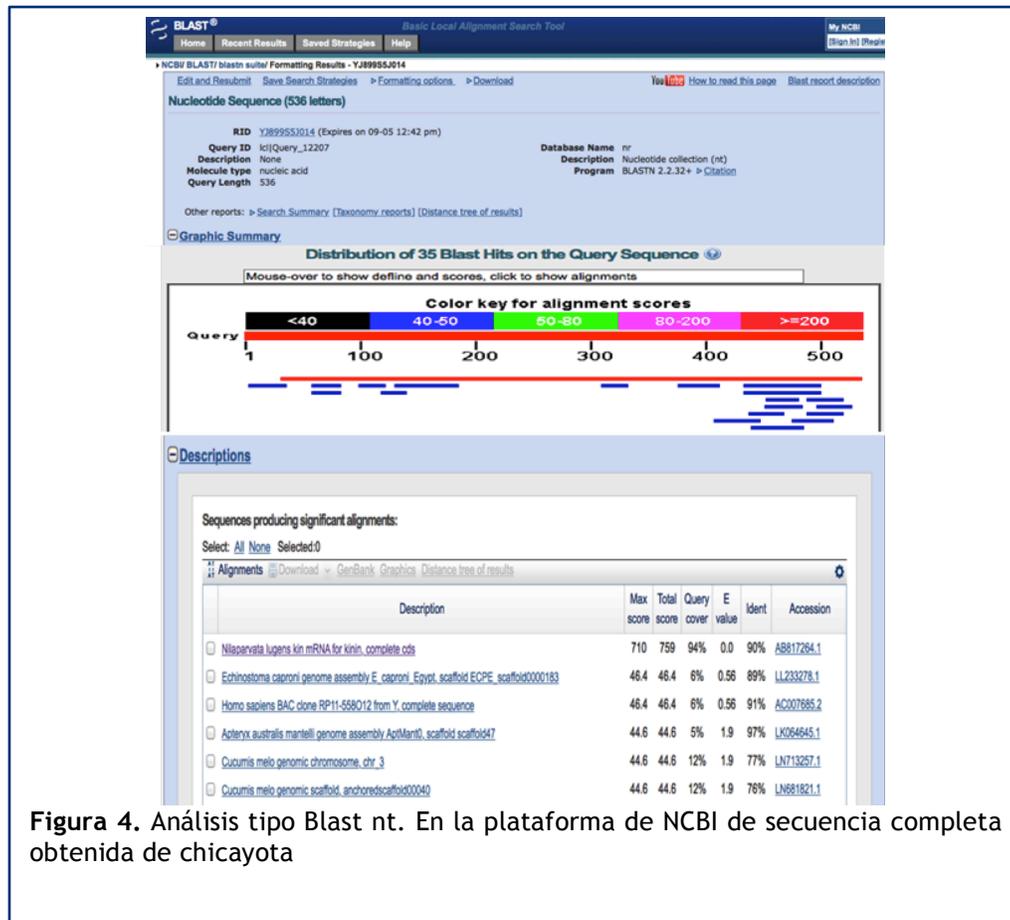
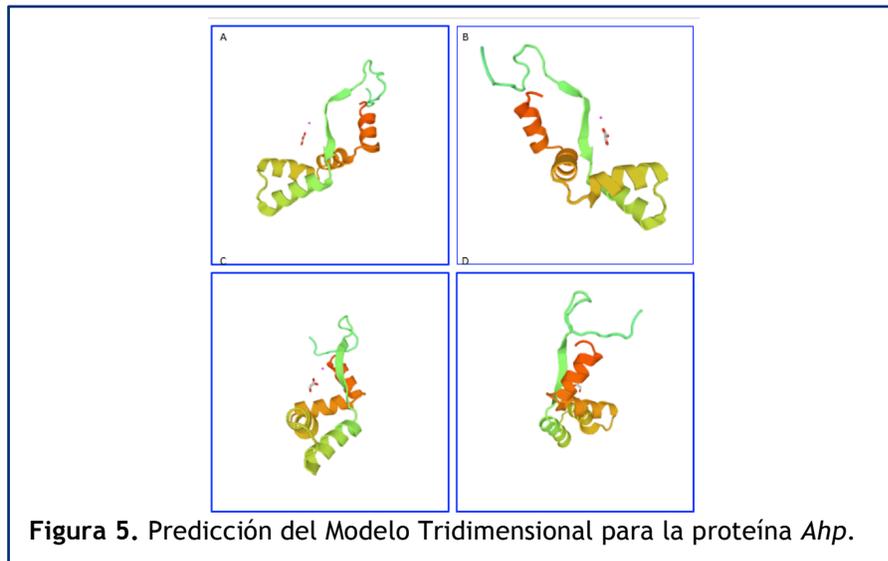


Figura 4. Análisis tipo Blast nt. En la plataforma de NCBI de secuencia completa obtenida de chicayota

En la figura 5 se observa el modelo tridimensional de la proteína que se obtuvo con la secuencia codificante para el ORF se realizó la predicción del modelo encontrando que la proteína forma un monómero, compuesto por 438 nucleótidos, y tiene dos ligandos denominados OXD y dos más denominados CA.



CONCLUSIONES

La técnica de RACE 5'-3' permitió el aislamiento del gen denominado como "Ahp" a partir de semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* (chicayota) y la caracterización bioinformática indicó que la mayor identidad genética del gen Ahp fue con el gen que codifica para la enzima kinin mostrando una identidad del 90%. Este es primer reporte de un gen con posible actividad antihipertensiva obtenido a partir de *Cucurbita argyrosperma sororia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Araya LH, Lutz RM. Alimentos Funcionales y Saludables. Revista Chilena de Nutrición. Abril 2003, vol.30, no.1, p.8-14. Disponible en: <<http://www.scielo.cl>>. (Consulta: enero de 2015).
- Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Rojas-Martínez R, Pedroza-Tobías A, Medina-García C, Barquera S. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. Salud Publica Mex 2013;55 supl 2:S144-S150.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013b). *Global Health Observatory. Raised blood pressure. Situation and trends*. Consultado el 15 de febrero de 2013, de:http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/index.html
- M. en C. Bernardo Lucas Florentino, Q.F.B. Leticia Gil Vieyra, Ma del Pilar Paredes C. Depto de Farmacia (Posgrado), Fac. de Química, UNAM. Evaluación nutritiva y toxicológica de la proteína de calabaza.
- Bautista Justo M, Barragán Romero I* Martínez Soto G, Camarena Aguilar E., Barboza-Corona J.E. y León Galván F. Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División de ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Caracterización físico-química de la semilla de chicayota (*Cucurbita argyrosperma sororia*). 2014.