



Instituto Politécnico Nacional

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada



Tolerancia a la modificación sitio-dirigida de las regiones variables del polipéptido
ácido de una globulina 11S de amaranto

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biotecnología

presenta

M.C. Jocksan Ismael Morales Camacho

Comité tutorial

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza (Co-Directora)

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dra. María Myrna Solís Oba

Dra. Silvia Luna Suárez (Directora)

Dr. Víctor Eric López y López

Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, junio de 2016.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal siendo las 14 horas del día 31 del mes de mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:
Tolerancia a la modificación sitio-dirigida de las regiones variables del polipéptido ácido de una globulina 11S de amaranto

Presentada por el alumno:

Morales Camacho Jocksan Ismael
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

A	1	2	0	9	2	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Claudia Martínez Cardoza

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dra. María Myma Solís Oba

Dr. Víctor Enrique López López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dra. María Myma Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 30 del mes de mayo del año 2015, el (la) que suscribe Jocksan Ismael Morales Camacho alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A120921, adscrito a CIBA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Silvia Luna Suárez y cede los derechos del trabajo intitulado Tolerancia a la modificación sitio-dirigida de las regiones variables del polipéptido ácido de una globulina 11S de amaranto, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jocmo24@hotmail.com, o bien sluna@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jocksan Ismael Morales Camacho

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jocksan Ismael Morales Camacho', is written over a horizontal line.

Nombre y firma

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	İ
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
DEDICATORIAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Las enfermedades cardiovasculares: la hipertensión arterial	2
2. Alimentos funcionales nutraceuticos: los péptidos bioactivos	5
2.1 Los péptidos antihipertensivos	7
3. Proteínas: estructura, función y estabilidad	10
3.1 Proteínas de reserva: amarantina	13
3.2 Caracterización de proteínas	16
3.2.1 Espectroscopía de dicroísmo circular	16

3.2.2 Espectroscopía de fluorescencia	17
3.2.3 Ensayos de termofluor	18
3.3 Expresión de proteínas	19
4. Modificación de proteínas	20
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	26
1. Objetivo General	26
1.1. Objetivos Específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Plásmidos y cepas de <i>Escherichia coli</i>	27
2. Construcción de las nuevas versiones modificadas: AACM.1, AACM.2 y AACM.4	28
3. Modelaje de la estructura tridimensional de AAC y de sus versiones modificadas	29
4. Expresión de las proteínas recombinantes	29
5. Purificación de AAC y de sus versiones modificadas	31
6. Protocolo de replegamiento de AAC y de las versiones modificadas	31
7. Obtención de anticuerpos para la detección de AAC y sus versiones modificadas	32
8. Análisis de las proteínas recombinante	33

8.1 Mediciones espectroscópicas	33
8.1.1 Dicroísmo Circular	33
8.1.1.1 Desnaturalización por temperatura: DC	33
8.1.2 Ensayos de termofluor	34
8.1.3 Fluorescencia Intrínseca	34
8.1.3.1 Desnaturalización química: urea	36
8.2 Electroforesis	36
8.3 Análisis tipo Western <i>blot</i>	36
8.4 Cuantificación de proteína	37
8.5 Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés	38
8.6 Proteínas solubles e insolubles	39
8.7 Determinación de la actividad antihipertensiva de AAC y sus versiones modificadas (Evaluación IECA)	39
8.7.1 Digestión enzimática	39
8.7.2 Determinación del IC ₅₀ sobre la ECA	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. Análisis de los modelos tridimensionales de AAC y de sus versiones modificadas	41
2. Expresión de las proteínas a nivel matraz	44
3. Expresión a nivel fermentador	56

4. Purificación y replegamiento de las proteínas recombinantes	58
5. Anticuerpos para la detección de AAC y sus versiones modificadas	65
6. Caracterización espectroscópica de las proteínas recombinantes	65
6.1 Espectroscopía de fluorescencia	65
6.2 Espectroscopía de dicroísmo circular	70
6.3 Determinación del punto isoeléctrico: electroforesis 2D	74
6.4 Termoestabilidad y estabilidad química	76
6.5 Desnaturalización química	81
6.6 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)	85
VIII. CONCLUSIONES	88
IX. PERSPECTIVAS	89
X. BIBLIOGRAFÍA	90
Apéndice A	104
Apéndice B	111
Apéndice C	112
Apéndice D	114
Apéndice E	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.	4
2	Alimentos funcionales nutracéuticos y su efecto en la salud humana.	6
3	Péptidos bioactivos identificados en diferentes fuentes alimenticias.	7
4	Péptidos con actividad antihipertensiva identificados en diferentes fuentes alimenticias.	8
5	Oligonucléidos para la construcción de los plásmidos que codifican para AACM.1, AACM.2 y AACM.4.	28
6	Tratamientos para el proceso de replegamiento de AAC, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4.	32
7	Evaluación de los modelos tridimensionales de AAC y de sus versiones modificadas.	42
8	Expresión de la subunidad ácida de la amarantina y sus versiones modificadas (g/L).	52
9	Resultados del replegamiento de AAC y sus versiones modificadas.	63
10	Parámetros determinados mediante espectroscopía de fluorescencia.	66
11	Contenido de estructura secundaria de las proteínas recombinantes.	73
12	Contenido de estructura secundaria de los modelos obtenidos.	73
13	Parámetros termodinámicos de AAC y sus versiones modificadas.	80
14	Rendimientos, purificación y caracterización fisicoquímica y funcional de AAC y sus versiones modificadas.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Hipertensión arterial mediada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).	3
2	Fármacos inhibidores que interactúan sobre los subsitios del centro activo de la ECA.	4
3	Niveles estructurales de las proteínas.	11
4	Esquema de AAC y de sus versiones modificadas.	27
5	Esquema de las proteínas que se analizaron.	41
6	Modelos de AAC y sus versiones modificadas.	43
7	Esquema de AAC y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	44
8	Western blot de la expresión de AAC a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	45
9	Esquema de AACM.3 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	46
10	Western blot de la expresión de AACM.3 a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	47
11	Esquema de AACM.4 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RI.L	48
12	Western blot de la expresión de AACM.4 a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	49
13	Esquema de AACM.3.4 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	50
14	Western blot de la expresión de AACM3.4 a nivel matraz en <i>E.coli</i> Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.	51

15	Productividad de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL en la expresión de AAC y de sus versiones modificadas.	53
16	Rendimientos de la expresión de AAC y de sus versiones modificadas.	54
17	Expresión de AAC y AACM.3 en forma de cuerpos de inclusión	55
18	Expresión de AACM.4 y AACM.3.4 en forma de cuerpos de inclusión.	56
19	Análisis de la solubilidad de AAC y de sus versiones modificadas.	58
20	Cromatograma de la purificación de AAC.	59
21	Análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de AAC.	60
22	Western blot de las fracciones colectadas durante la purificación de AAC.	60
23	Cromatograma de purificación de AACM.3.4.	61
24	Análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de AACM.3.4.	61
25	SDS-PAGE de AAC y sus versiones purificadas.	62
26	Proteínas recombinantes puras y replegadas en amortiguador fosfatos (0.2 M NaCl, 0.02 M fosfatos pH 7.5).	64
27	Western blot obtenidos a diferentes diluciones de anticuerpo primario.	65
28	Espectros de fluorescencia antes y después del protocolo de replegamiento.	68
29	Espectros de fluorescencia de AAC y sus versiones modificadas.	69
30	Espectros de DC antes y después del replegamiento.	71

31	Espectros de DC de AAC y sus versiones modificadas.	72
32	Electroforesis 2D de proteínas recombinantes pH 3-10.	74
33	Electroforesis 2D de proteínas recombinantes pH 4-7.	75
34	Desnaturalización por temperatura monitoreada por DC y TRF.	77
35	Curvas de transición mediante DC y TRF.	79
36	Desnaturalización de AAC con urea	82
37	Desnaturalización de AACM.1 con urea.	83
38	Desnaturalización de AACM.4 con urea.	83
39	Curvas de desnaturalización química de AAC, AACM.1 y AACM.4.	84

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública; la hipertensión es el principal factor de riesgo para su desarrollo. Se han usado distintos fármacos para el control de la hipertensión; sin embargo, estos generan efectos secundarios. La ingeniería de proteínas es una herramienta biotecnológica utilizada para modificar la estructura proteica con la finalidad de producir proteínas con capacidad terapéutica que se podrían emplear como alternativa para el control de distintos padecimientos. El objetivo de esta investigación es determinar el efecto de la modificación con péptidos bioactivos en la estabilidad estructural del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto (AAC) en cada una de sus regiones variables. AAC y sus versiones modificadas se expresaron en *E. coli* y, tras su purificación, se caracterizaron por espectroscopía de dicroísmo circular y fluorescencia. Se evaluó su estabilidad térmica y su desnaturalización con urea; asimismo, se determinó el efecto inhibitorio de todas las versiones sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los resultados mostraron diferencias en el contenido de estructura secundaria entre AAC y sus versiones modificadas con péptidos bioactivos. Las versiones modificadas en las regiones variables I y IV aumentaron su termoestabilidad (T_m 55 y 54°C, respectivamente) con respecto a AAC (T_m 46°C). En cambio, las versiones modificadas en las regiones variables II y III no mostraron estabilidad térmica. La proteína modificada en la región variable I presentó mayor tolerancia a la desnaturalización química. Todas las proteínas modificadas mostraron entre ocho y diez veces mayor efecto inhibitorio sobre la ECA, a excepción de la proteína modificada en la región variable I.

Palabras clave: *Escherichia coli*, región variable, péptidos antihipertensivos, estabilidad estructural.

SUMMARY

Hypertension is a major risk factor to development cardiovascular diseases, which are a public health problem. Different drugs have been developed for control or prevention of hypertension, however their consumption, cause side effects. Protein engineering is a biotechnology tool that can be used to modify the protein structure in order to produce therapeutic proteins which can be employed as an alternative for the control of different illnesses. The objective of this work was to determine the effect of the modification with bioactive peptides in the structural stability of the acid polypeptide from 11S globulin of amaranth (AAC) in each its variable regions. AAC and their modified versions were expressed in *E. coli*. After, the recombinant proteins were purified and characterized by circular dichroism and fluorescence spectroscopies; also, their thermal stability and chemical denaturation (by urea) were evaluated. The inhibitory effect on angiotensin converting enzyme (ACE) of all versions of AAC was evaluated. The results showed differences in the secondary structure content between AAC and their variants. The modified versions in variable regions I and IV increased their thermal stability (T_m 55 and 54°C, respectively) in regard to AAC (T_m 46°C). Unlike, modified versions in variable regions II and III did not showed thermal stability. The protein modified in variable region I showed higher tolerance to chemical denaturation. All modified proteins showed higher inhibitory effect on ACE (around eight-ten times), except for the protein modified invariable in region I.

Key words: *Escherichia coli*, variable region, antihypertensive peptides, structural stability.

DEDICATORIAS

A mi cómplice y compañera de vida, **Aline**, que con su amor, apoyo y aliento ha sido pilar importante para mi desarrollo profesional.

A mi hija **Alizée**, que con su llegada ha iluminado nuestras vidas y con su sonrisa me provoca gran felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Luna Suárez, quien con su orientación, enseñanzas, confianza y disposición para realizar este proyecto ha contribuido a mi desarrollo como investigador.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, por su oportuno apoyo y por brindarnos la confianza de trabajar en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la UNAM.

A la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, por sus comentarios para enriquecer esta investigación y su disposición en todo momento.

Al Dr. Víctor Eric López y López y a la Dra. María Myrna Solís Oba, por su ayuda y comentarios para mejorar este proyecto.

A mi familia, por su amor, enseñanzas y ayuda incondicional para desarrollar mis actividades de la mejor forma.

Al personal administrativo, de seguridad y de apoyo técnico del CIBA, por su ayuda y cooperación.

A los amigos presentes y pasados, por los momentos compartidos en los que me han brindado su apoyo y orientación.

Al Conacyt, por la beca asignada para desarrollar los estudios de doctorado.

Este proyecto de tesis se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional.

La caracterización espectroscópica de las proteínas estudiadas por dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

*Pero el principio de que el saber está
por encima de la ignorancia en cualquier situación
constituía la base de su manera de pensar
y su postura ante la vida.
Por muy doloroso que resultase, debía saberlo.
Porque sólo el saber fortalece a las personas.*

Haruki Murakami

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión se considera un problema de salud a nivel mundial porque es un factor importante para el desarrollo de las enfermedades isquémicas del corazón como infarto al miocardio, aterosclerosis, etc. Para la prevención o control de la hipertensión existen fármacos como el captopril o el enalapril que provocan reacciones secundarias como tos seca y angioedema, entre otras. Por ello es necesario el desarrollo de nuevos productos que ayuden en la prevención y control de estos padecimientos.

En los últimos años, se han identificado alimentos que contienen sustancias que benefician al ser humano, por ejemplo, proteínas que liberan péptidos bioactivos cuando son hidrolizadas por efecto de la digestión o de la preparación de los alimentos, es decir, sustancias de origen proteico que ejercen cierta actividad biológica en el organismo humano. Se ha reportado que existen péptidos con actividad hipocolesterolémica, opioide, inmunomoduladora y antihipertensiva, entre otras. Estas sustancias se pueden sintetizar mediante procesos químicos, hidrólisis enzimática o por métodos recombinantes.

La ingeniería de proteínas permite la modificación de moléculas de origen proteico con la finalidad de originar cambios estructurales que mejoren los procesos de purificación, generen cambios en las propiedades catalíticas y/o provoquen la creación de agentes con propiedades terapéuticas. En la presente investigación se pretende evaluar el impacto en la estabilidad estructural de una proteína de amaranto con modificaciones que mejoran sus propiedades nutraceuticas.

II. Antecedentes

1. Las enfermedades cardiovasculares: la hipertensión arterial

Las enfermedades cardiovasculares son un importante problema de salud a nivel mundial. Se ha estimado que en el año 2020 serán la primera causa de muerte en todo el mundo (López y Murray, 1998). Se ha identificado que el principal factor de riesgo para generar estos padecimientos es la hipertensión (Moore, 2005).

La hipertensión (≥ 140 mm de Hg de presión sistólica y/o ≥ 90 mm de Hg presión diastólica) está asociada a una dieta inadecuada por un alto consumo de sal, baja ingesta de frutas y verduras, sobrepeso, un consumo excesivo de alcohol e inactividad física. La hipertensión arterial, además de ser un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades del corazón, es causa directa de las enfermedades cerebro-vasculares e insuficiencia renal. De acuerdo con la World Hypertension League (2016), anualmente se reportan 9.4 millones de muertes a nivel mundial por enfermedades relacionadas con la hipertensión. Este organismo también estima que existen 1.5 billones de personas que sufren de hipertensión; en México la incidencia de este padecimiento en la población de 20 años o más es de 31%. En otras palabras, 22.4 millones de adultos padecen hipertensión arterial, de los cuales 11.2 millones están diagnosticados y sólo 5.7 millones tienen controlado el padecimiento, según se indica en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Secretaría de Salud, 2012).

Otros reportes indican que los principales factores para el desarrollo de la hipertensión están relacionados con los hábitos: una dieta elevada en grasas saturadas, el tabaquismo, un alto consumo de sodio, falta de actividad física, así como la presencia de enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes, entre otras (Campos-Nonato y col., 2013). Dado que las causas de esta enfermedad están relacionadas con el estilo de vida de las personas, para el tratamiento y control de la hipertensión se han diseñado distintas estrategias que combinan cambios en los hábitos de vida, relacionados con una dieta saludable, la disminución del consumo de calorías aportadas por grasas y azúcares y el aumento de la actividad física; aunque existen situaciones donde es necesario el tratamiento farmacológico, principalmente por medio de los inhibidores de la

enzima convertidora de angiotensina (IECA). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) tiene un papel crucial en la regulación de la presión sanguínea. La ECA hidroliza un dipéptido en el extremo C-terminal del decapeptido inactivo angiotensina I lo cual provoca la formación de un octapéptido vasoconstrictor conocido como angiotensina II. Este vasoconstrictor también genera la secreción de aldosterona que a su vez provoca la retención de sodio y agua. Asimismo, la ECA hidroliza al vasodilatador bradiquinina y genera péptidos inactivos de esta hormona (véase Figura 1) (Li y col., 2004).

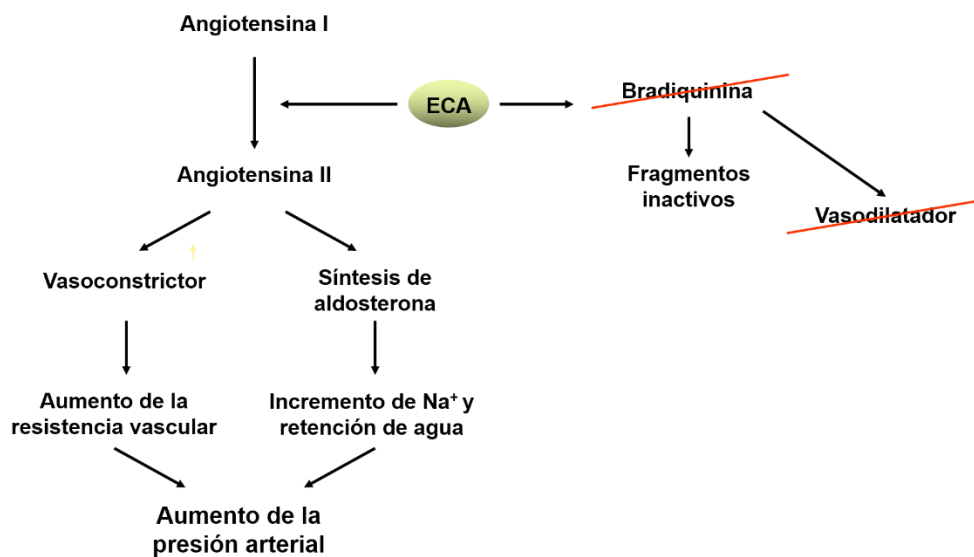


Figura 1. Hipertensión arterial mediada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Los IECA son considerados tratamientos de primera línea por su efectividad para el control de la hipertensión; son inhibidores competitivos que interactúan con los subsitios S1, S1' y S2' del centro activo de ECA (véase Figura 2) (Li y col., 2004).

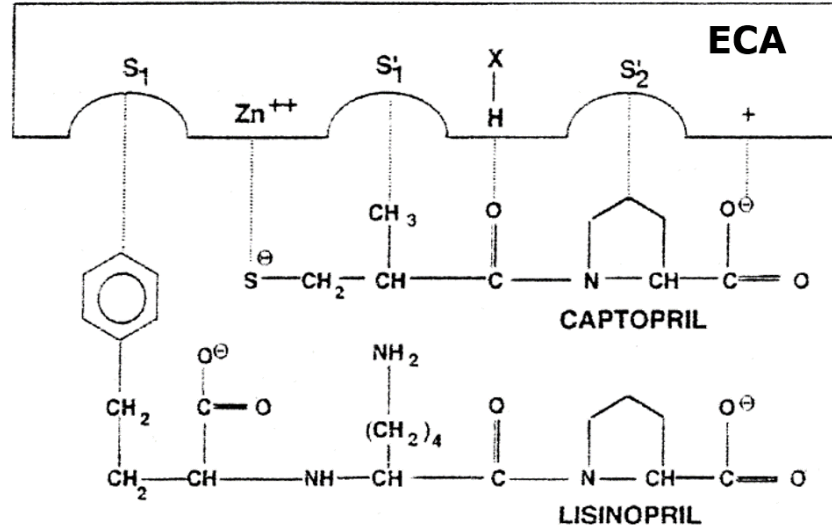


Figura 2. Fármacos inhibidores que interactúan sobre los subsitios del centro activo de la ECA.

En la mayoría de los casos los IECA producen efectos adversos como tos, hiperpotasemia, edema angioneurótico, disgeusia y anomalías fetales si se usan durante la gestación (Cobo-Abreu y Fabián San Miguel, 2007). Estas repercusiones hacen necesaria la búsqueda de alternativas igualmente efectivas y menos dañinas. En la Tabla 1 se enlistan los IECA más comúnmente usados para el tratamiento de la hipertensión.

Tabla 1. Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

Inhibidor de la ECA	Dosis (mg/día)	Efectos secundarios
Captopril	25 - 150	Tos, mareo, dolor muscular, boca seca, aftas, dolor de cabeza, insomnio, diarrea, irritación y/o erupción cutánea.
Enalapril	2.5 - 40	Tos, mareos, somnolencia, pérdida del apetito, dolor de cabeza, insomnio, diarrea, náuseas, irritación y/o erupción cutánea.
Lisinopril	10 - 40	Tos, dolor de cabeza, mareos, somnolencia, depresión, insomnio, dolor estomacal, diarrea, vómito, irritación y/o erupción cutánea.
Fosinopril	10 - 40	Síntomas de resfriado, hinchazón, dificultad para respirar o tragar, aturdimiento, desmayo, irritación y/o erupción cutánea.
Perindopril	4 - 8	Tos, dolor de cabeza, debilidad, mareo, diarrea, hinchazón, vómito, fiebre, dolor de garganta,

		taquicardia.
Quinapril	10 - 40	Tos, mareo, somnolencia, vómito, dolor de estómago, hinchazón, mareo, desmayo, dificultad para tragar o respirar, dolor de pecho.
Ramipril	2.5 - 20	Dolor de cabeza, mareo, somnolencia, debilidad, dolor de cabeza, dolor de estómago, dificultad para respirar o tragar, aturdimiento, desmayo.
Trandolapril	1 - 4	Síntomas de resfriado, hinchazón, dificultad para respirar o tragar, aturdimiento, desmayo, irritación y/o erupción cutánea.

Adaptado de: Cobo Abreu y Fabián San Miguel, 2007; Patrias, 2007.

Las dosis que se administran para el tratamiento de la hipertensión son variables; sin embargo, los efectos secundarios que provocan su consumo son similares. Aunque la cantidad de ingesta de Trandolapril es menor a la dosis recomendada de Captopril, ambos provocan, por ejemplo, reacciones alérgicas (véase Tabla 1).

El aumento considerable en los problemas de salud a nivel mundial y la necesidad de identificar nuevos productos menos tóxicos son algunas de las razones por las que los investigadores han centrado su atención en el estudio de los alimentos como una nueva opción para la prevención o tratamiento de enfermedades. Precisamente el reconocimiento del aporte benéfico que algunas sustancias de los alimentos pueden traer consigo al cuerpo humano ha generado nuevas tendencias en la ciencia y tecnología de alimentos; así, se ha desarrollado el estudio de alimentos funcionales y nutraceuticos.

2. Alimentos funcionales nutraceuticos: los péptidos bioactivos

Los alimentos funcionales y nutraceuticos son definidos como alimentos que previenen o revierten un estado de enfermedad (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2000). Existen reportes de sustancias aisladas de distintos grupos de alimentos que ejercen un efecto benéfico en la salud humana; algunos de ellos tienen un origen fitoquímico, por ejemplo, las isoflavonas, los flavonoides y las antocianinas, entre otras. También existen sustancias nutraceuticas provenientes principalmente de aceites (animal o vegetal) como el Omega 6 y el Omega 3, por mencionar algunos. Otros tienen su origen a partir de fuentes proteicas; por

ejemplo, globulinas aisladas de leche, hidrolizados de carne de pescado o carne de pollo. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de alimentos funcionales nutraceuticos.

Tabla 2. Alimentos funcionales nutraceuticos y su efecto en la salud humana.

Alimento	Componente activo	Propiedad funcional
Derivados lácteos (quesos, yogurt, leche y mantequilla)	Probióticos	Prevención de enfermedades diarreicas y cáncer de colón
Oleaginosas, aceite de pescado y de algas	Omega 3	Prevención de enfermedades cardiovasculares
Hidrolizados de pollo y pescado	Distintos péptidos	Efecto antihipertensivo
Frutas, semillas y cereales	Flavonoides, antocianinas y carotenoides.	Activan el sistema inmune, propiedades antitumorales y antiinflamatorias.

Las proteínas de los alimentos han sido reconocidas por sus propiedades funcionales y nutraceuticas; dichas propiedades están determinadas principalmente por su secuencia de aminoácidos y ejercen un efecto fisiológico una vez que son absorbidas a través de la digestión. Las proteínas de los alimentos contienen secuencias de aminoácidos que, al ser hidrolizadas, pueden generar moléculas con funciones específicas en el cuerpo humano; dichas moléculas son los llamados péptidos bioactivos (Santiago-López y col., 2016).

De acuerdo con la mayoría de los reportes, estos péptidos se encuentran inactivos en las proteínas que los contienen; no obstante, al ser liberados durante el proceso digestivo o durante el proceso de elaboración de los alimentos, adquieren sus propiedades benéficas (Hartmann y Meisel, 2007). Estos péptidos pueden ejercer su efecto al ser absorbidos por el intestino y entrar intactos a la circulación sanguínea, o bien pueden producir únicamente efectos a nivel del sistema digestivo (Kits y Weiler, 2003).

En las últimas décadas se han desarrollado distintas investigaciones enfocadas al estudio de los péptidos bioactivos, pequeñas secuencias de aminoácidos que se encuentran encriptadas en las proteínas de los alimentos que

las aportan. Estructuralmente, son moléculas de origen proteico constituidas por 2 o hasta 20 aminoácidos. Por su efecto funcional nutracéutico, estas sustancias son atractivas para utilizarlas como ingredientes en alimentos destinados al mantenimiento de la salud. Los péptidos bioactivos son componentes derivados de alimentos que, además de su valor nutricional, ejercen un efecto fisiológico benéfico al cuerpo humano. Se ha reportado que poseen un efecto antihipertensivo, hipocolesterolémico, inmunomodulatorio, antioxidante, antimicrobiano, antitrombótico, entre otros (Arihara, 2006; Erdmann y col., 2008; Ryan y col., 2011); incluso, algunos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados (Tabla 3) (Meisel, 2004).

Tabla 3. Péptidos bioactivos identificados en diferentes fuentes alimenticias.

Fuente alimenticia	Péptido ^a	Bioactividad	Referencia
Langosta americana	QYGNLLSLLNQYR	Antimicrobiana	Battison y col., 2008
Hidrolizados de soya	Péptidos de diferentes pesos moleculares	Inmunomodulatoria	Kong y col., 2008
Para- κ -caseína (leche bovina)	FFSDK f(17-21)	Inmunomodulatoria	Gill y col., 2000
Lisozima de huevo	Lisozima f(98-112) IVSDQNMNAWVAWR	Antimicrobiana	Expósitoa y Recio, 2006
Arroz	QYPMYPLR	Opioide e inmunomodulatoria	Hartmann y Meisel, 2007
β -lactoglobulina (leche bovina)	IIAEK	Hipocolesterolémica	Hartmann y Meisel, 2007
κ -caseína (leche humana y bovina)	f(106-116) MAIPPKDQDK	Antitrombótica	Hartmann y Meisel, 2007

Adaptada de Agyei y Danquah (2011).

^aLos péptidos identificados se encuentran de forma natural en los alimentos enlistados.

Entonces, debido al potencial para mejorar la salud y los perfiles de seguridad que ofrecen, los péptidos se pueden usar como componentes en alimentos funcionales y nutracéuticos (Korhonen y Pihlanto, 2003).

2.1 Los péptidos antihipertensivos

Como se mencionó anteriormente, la ECA tiene un papel importante en la regulación de la presión sanguínea; esta enzima cataliza la síntesis un potente

vasoconstrictor (angiotensina II) y, al mismo tiempo, actúa como un inactivador del polipéptido vasodilatador bradiquinina. Los agentes antihipertensivos o inhibidores de la ECA que, cabe recordar, provocan reacciones secundarias (Hayes y col., 2007; Majumder y Wu, 2014). Algunas investigaciones han reportado la existencia de péptidos que poseen las mismas características inhibitorias que los fármacos comúnmente usados. Ferreira y col. (1970) aislaron nueve péptidos biológicamente activos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*, entre ellos destaca el péptido con la secuencia pirrolodion-carboxil-Lys-Trp-Ala-Pro ya que mostró la más alta actividad inhibitoria de ECA.

A partir de estos hallazgos, se comenzó a buscar compuestos con estas propiedades en otras fuentes, principalmente en proteínas alimentarias. Así, muchas investigaciones se han enfocado al estudio de péptidos aislados de varias fuentes y algunos sintetizados químicamente (Mizuno y col., 2004). También se han identificado péptidos antihipertensivos como producto de la actividad microbiana en productos lácteos fermentados (Gobetti y col., 2000). Los péptidos antihipertensivos han sido los más estudiados debido a la prevalencia de la hipertensión entre la población.

Tabla 4. Péptidos con actividad antihipertensiva identificados en diferentes fuentes alimenticias.

Fuente alimenticia	Péptido	IC ₅₀
Salmón	IW	1.2 µM
Queso manchego	KKYNVPQL	77.1 µM
Carne de cerdo	ND	3.9 mg/mL
Queso gouda	RPKHPIKHQ	13.4 µM
Pollo	LAP	3.2 µM
Sardina	GWAP	3.86 µM
Kéfir de leche de cabra	LVYFPFGPIP	27.9 µM
Productos de suero lácteo	ALPM	928 µM
β-lactoglobulina	LQKW	34.7 µM
Hidrolizados de caseína con proteinasa K	VYP	288 µM

β -lactoglobulina de proteína de cabra	LLF	79.8 μ M
Carne de res	FHG	52.9 μ g/mL
Bonito	IKPLNY	43 μ M

Adaptado de Ahhmed y Muguruma (2010); Hernández-Ledesma y col. (2010).

La actividad antihipertensiva de los péptidos aislados ha sido probada en ratas espontáneamente hipertensas. Nakamura y col. (1995) reportaron que la administración oral de leche fermentada que contenía los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro a una dosis simple de 5 mL/kg disminuyó significativamente la presión sistólica en ratas hipertensas. En el estudio se observó que la leche fermentada tuvo el mismo efecto antihipertensivo que los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro que se sintetizaron químicamente y se administraron en una dosis de 0.6 y 0.3 mg/kg, respectivamente. En el experimento se formaron cuatro grupos de ratas hipertensas: al primero se le administró de forma oral 5 mL/kg de leche fermentada (por *L. helveticus* y *S. cerevisae*); al segundo, se le administró una solución de Val-Pro-Pro disuelto en amortiguador PBS-caseinato en la concentración descrita; al tercero se le administró una solución de Ile-Pro-Pro disuelto en el mismo amortiguador y a la concentración descrita; finalmente, el cuarto grupo corresponde al control que se le administró leche sin fermentar disuelta en amortiguador PBS-caseinato. Los grupos que consumieron la leche fermentada, la solución de Ile-Pro-Pro y la solución de Val-Pro-Pro mostraron una disminución de la presión sistólica (entre 24 y 32 mm Hg con respecto a la presión antes del tratamiento) que se presentó entre 6 y 8 h después de la administración; mientras que en el grupo control no se observó efecto antihipertensivo. Además, en el mismo estudio se aplicaron los mismos tratamientos en ratas normotensas y no se observó un efecto en la presión sistólica. También se ha probado el efecto de algunos péptidos antihipertensivos en humanos, tal es el caso de los péptidos VPP e IPP, encontrados en la leche que se administró a pacientes hipertensos. Los pacientes fueron asignados al azar en dos grupos; el primero ingirió diariamente 150 mL de leche con 2.4 mg de Val-Pro-Pro / 100 g de producto y 1.5 mg de Ile-Pro-Pro / 100 g de producto durante 21 semanas; y el segundo grupo

consumió leche acidificada artificialmente como un placebo. El grupo que consumió leche con péptidos disminuyó su presión sistólica (6.7 mm Hg) y su presión diastólica (3.6 mm Hg); mientras que el grupo con el placebo no tuvo efectos (Seppo y col., 2003).

De forma similar, el efecto antihipertensivo del dipéptido VY se probó en humanos hipertensos mediante la administración de 100 mL de una solución con 3 mg del dipéptido a lo largo de 4 semanas dos veces al día. La reducción de la presión sistólica y diastólica fue de 9.7 y 5.3 mm Hg, respectivamente (Kawasaki y col., 2000).

Se ha reportado que los péptidos que contienen residuos hidrofóbicos o residuos con cadenas laterales ramificadas generan una mayor inhibición sobre la ECA. En muchos estudios se ha mostrado que los di o tripéptidos con alta actividad inhibitoria tienen un residuo de Trp, o de Phe, o de Tyr o de Pro en su extremo C-terminal y/o tienen un residuo de cadena alifática ramificada en su extremo N-terminal (Li y col., 2004).

3. Proteínas: estructura, función y estabilidad

Las proteínas son las moléculas más versátiles de los sistemas vivos porque realizan distintas funciones que regulan todos los procesos biológicos tales como: el transporte y el almacenamiento de otras moléculas, el reconocimiento celular, actúan como catalizadores de reacciones químicas, regulan el crecimiento y la diferenciación celular, dan soporte y participan como agentes protectores en el sistema inmune (Berg y col., 2002).

Estructuralmente, son polímeros constituidos por monómeros llamados aminoácidos; la función de cada proteína está determinada por la estructura tridimensional que estas adoptan a partir de la secuencia de sus aminoácidos (estructura primaria). Además, existen interacciones como puentes de hidrógeno que forman patrones estructurales repetitivos que dan lugar a estructuras planas o en forma de hélice las cuáles se encuentran enlazadas por asas o giros (estructura secundaria). La conformación tridimensional (estructura terciaria) que adoptan las proteínas se genera a partir de distintas interacciones como las

hidrofóbicas, las iónicas, las fuerzas de Van der Waals y, en ocasiones, por la formación de enlaces disulfuro. En algunos casos, es necesario que dos o más cadenas de aminoácidos (iguales o diferentes en secuencia) se acoplen o interactúen para que una proteína sea funcional; si emerge este fenómeno, se dice que la proteína adopta una estructura cuaternaria (Berg y col., 2002). En la Figura 3 se ilustra cada uno de los niveles estructurales de las proteínas.

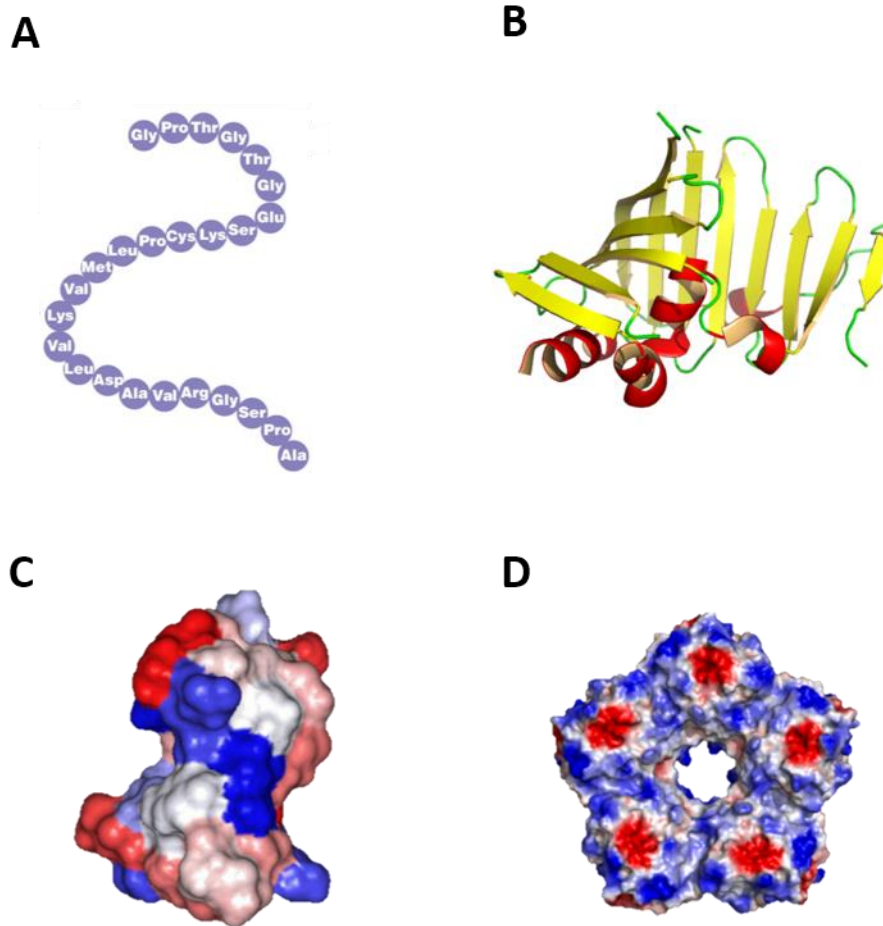


Figura 3. Niveles estructurales de las proteínas. **A**, estructura primaria (secuencia de aminoácidos); **B**, estructura secundaria (hélice en color rojo, hojas β en color amarillo y en color verde asas o giros); **C**, estructura terciaria; **D**, estructura cuaternaria (pentámero).

Todas las interacciones que dictan la conformación estructural de una proteína se ven afectadas por las condiciones ambientales en las que ésta se encuentra; es decir, el pH, la fuerza y la naturaleza iónica, la temperatura, la presencia de otras proteínas, entre otras, influyen en la conformación y, por lo tanto, afectan su

actividad biológica. Entonces, la conformación estructural que adopta una proteína es un resultado multifactorial; si uno de estos factores cambia, la proteína puede perder o continuar con su función.

Existen diversos experimentos reportados que evalúan distintos escenarios para establecer la relación estructura-función o estructura-estabilidad que una proteína posee; tal es el caso del estudio realizado por el grupo de Zhang en el 2010, quien compara las cinéticas de inhibición de dos enzimas (acetilcolinesterasas) relacionadas con la regulación de neurotransmisores e impulsos nerviosos en especies parasitarias que afectan campos de cultivo de interés agronómico. Por su importancia, estas enzimas son las biomoléculas blanco de insecticidas organofosforados. A través de un alineamiento de las secuencias de las acetilcolinesterasas de diez especies de moscas, se identificó que en cuatro de estas existía la mutación Gly353Ala en la misma posición. Por tal motivo, expresaron y purificaron las dos enzimas; al comparar las cinéticas notaron que la enzima con Ala es menos sensible al efecto de los insecticidas, lo que se traduce en mayor resistencia de las especies de moscas que las contienen. Los autores sostienen que este fenómeno se da a partir de las interacciones que Ala establece con la Ser200 que se encuentra en el sitio catalítico (Lang y col., 2010).

Para entender la relación estructura-función, Hu y col. (2015) realizaron la caracterización de una proteasa del virus reticuloendoteliosis (esta proteína está relacionada con el proceso infeccioso del retrovirus). Se reportó que la actividad de la proteína está influenciada por el pH, la temperatura y la presencia de iones Ca^{+2} y Ni^{+2} que pueden inhibirla al igual que el inhibidor de caspasa. Además, determinaron que el residuo Thr28 es clave para la actividad enzimática; a partir de estos hallazgos se podrían generar nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades causadas por retrovirus.

Con el propósito de optimizar las propiedades o funciones de las proteínas, las investigaciones se han centrado en la modificación estructural de las mismas. Precisamente se han diseñado nuevas estructuras y se han realizado modificaciones a través de la ingeniería de proteínas con el empleo de técnicas

genéticas y químicas. Estas alteraciones permiten crear proteínas quiméricas o estructurales, cambiar las propiedades catalíticas de algunas proteínas, mejorar la purificación proteica y modificar la estructura para producir proteínas con poder terapéutico o aumentar su estabilidad (Kamionka, 2011).

En términos prácticos, el estudio de la estabilidad de las proteínas es importante en distintas áreas industriales como la biomedicina, la biotecnología, la farmacéutica y la industria de los alimentos. La estabilidad de una proteína se define como la diferencia en la energía libre de Gibbs entre el estado nativo y el estado desplegado o desnaturalizado. La pérdida de estabilidad de una proteína implica que las condiciones fisicoquímicas en las que una proteína mantiene su conformación nativa (funcional) son más limitadas. Esta situación, en el área de la biotecnología puede limitar la comercialización de productos obtenidos mediante tecnología recombinante (Baldwin, 1975; Gierasch y King, 1990; Gupta y col., 1998). En el área de la biomedicina, existe un gran número de enfermedades conocidas como amiloidosis que se generan a partir del plegamiento anormal de proteínas. Este fenómeno provoca la formación de agregados y con ello distintas patologías como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, entre otras (Khurana y col., 2001; Wetzel, 1997). En la industria farmacéutica, la baja estabilidad de las proteínas que se usan para el tratamiento de algunas enfermedades puede generar la formación de agregados durante el proceso de empaque, en el embalaje o durante el almacenamiento, esta situación limita su administración como fármaco (Constantino y col., 1995; Martínez y col., 2012). En la industria de alimentos, la formación de agregados de proteína por cambios en su estabilidad puede generar la aparición de sabores desagradables o la formación de colores o texturas no deseados (Corzo-Martínez y col., 2012; Persson y Gekas, 1994; Rullier y col., 2008).

3.1 Proteínas de reserva: amarantina

Las proteínas de semilla se clasifican en dos categorías: las de mantenimiento, que son esenciales para el metabolismo celular, y las de reserva, que son metabolizadas durante la germinación. En las etapas iniciales del desarrollo de la

plántula, las proteínas de reserva proveen una fuente de nitrógeno reducido, así como de carbono y azufre. Además, estas proteínas representan un aporte significativo a la alimentación dado que se acumulan en grandes cantidades en las semillas (Higgins, 1984; Herman y Larkins, 1999).

La clasificación tradicional de las proteínas de reserva se ha realizado con base en su solubilidad, entre ellas están: las albúminas, que son solubles en agua; las globulinas, que son solubles en soluciones salinas diluídas, las prolaminas, que se extraen con mezclas de alcohol-agua, y las glutelinas, que se obtienen en condiciones severas de pH (ácidas o básicas) (Osborne, 1924). Sin embargo, Fukushima (1991) propone una nueva clasificación según la presencia o ausencia de intrones en el gen, la homología de la estructura primaria, la presencia de estructuras repetitivas que influyen en la estructura secundaria y la ruta biosintética. De acuerdo con esto, estas proteínas están divididas en dos grupos: por un lado, las prolaminas que incluyen a las albúminas y, por otro, las globulinas que incluyen a las glutelinas.

Las globulinas presentes en los distintos tipos de granos son las proteínas más ampliamente distribuidas ya que se pueden localizar en el endospermo y en el polen, entre otros organelos (Shewry, 1995). Por su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa, se dividen en dos grupos: las globulinas 7S (7-8S), también conocidas como vicilinas, y las globulinas 11S (11-13S), denominadas leguminas. Ambos grupos presentan variaciones considerables en su estructura, resultado de modificaciones post-traduccionales (Danielsson, 1949).

En forma madura, las proteínas 7S se consideran trímeros formados por subunidades de 50-70 kDa; en cambio, las globulinas 11S se encuentran como hexámeros formados por subunidades de 60-80 kDa. Cabe señalar que en ambos grupos las subunidades están acopladas por interacciones no covalentes; sin embargo, en las globulinas 11S las subunidades presentan un corte proteolítico como parte del procesamiento post-traducciona (Casey, 1999).

Las globulinas 11S son proteínas comunes en las semillas de plantas superiores y en muchas ocasiones son la fracción mayoritaria de las proteínas de reserva en granos, principalmente en dicotiledóneas y en algunos cereales como

la avena y el arroz (Nielsen y col., 1995). Entre algunos tipos de globulinas están la amarantina, que es un homohexámero (Sanfeng y Paredes-López, 1997), y la glicinina de soya, que es una heterohexámero (Staswick y col., 1984).

En general, la amarantina representa cerca del 18.6% de la proteína total del grano del amaranto y aproximadamente el 90% del total de las globulinas; en efecto, la mayor parte de las globulinas 11S presentes en el amaranto es amarantina. Esta proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 300-400 kDa y está constituida por seis subunidades de 52 kDa, cada una con un polipéptido ácido (34-36 kDa) y un polipéptido básico (22-24 kDa) unidos por un puente disulfuro (Sanfeng y Paredes-López, 1997; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992). Desde un punto de vista nutricional la amarantina es importante porque posee un alto contenido de lisina (3.7-7.6%) y aminoácidos azufrados (3.1-7.1%) (Barba de la Rosa y col., 1992).

Cada monómero de la amarantina posee cinco regiones variables en su estructura, cuatro de estas regiones se encuentran en el polipéptido ácido (Luna-Suárez, 2008). Estas regiones variables son secuencias no conservadas de aminoácidos y son susceptibles de modificación mediante ingeniería de proteínas, precisamente porque estas regiones no comprometen su estructura tridimensional. Mediante alineamientos de secuencias de distintas globulinas 11S, Wright (1988) identificó regiones conservadas y variables que tienen en común las proteínas 11S estudiadas. A partir de estas observaciones, propuso que las regiones conservadas son importantes para el mantenimiento de la estructura molecular de las proteínas y que las regiones variables podrían tener menor influencia en la conservación estructural. Además, el carácter hidrofílico de las regiones variables hace suponer que se encuentran en la superficie molecular de las proteínas. Estas características en las regiones variables, son un indicio de que al realizar modificaciones en esas zonas no se compromete la estructura principal de las globulinas (Tandang-Silvas y col., 2011).

En cuanto a su solubilidad, las globulinas del amaranto muestran una precipitación parcial en un rango de pH de 4.5-6.8 (Gorinstein, 1993). De forma detallada, la máxima insolubilidad se presenta en un rango de pH de 4.5-6 y una

precipitación parcial en un rango de pH de 6.1-6.8. Cabe señalar que esto sucede por la presencia de diferentes estados ionizables de la proteína (Segura-Nieto y col., 1994). La actividad emulsificante de las globulinas de amaranto, según Konishi y Yoshimoto (1989), es dos veces mayor que la de aislados de soya y más baja que la de la caseína. Estos investigadores también encontraron que la hidrofobicidad de estas globulinas se incrementó hasta en un 200% después de un calentamiento a 100 °C.

3.2 Caracterización de proteínas

La aplicación de técnicas analíticas que permiten la caracterización detallada de proteínas terapéuticas son una herramienta útil para entender distintas condiciones que pueden limitar el uso de estos nuevos productos. Como se mencionó previamente, la conformación de una proteína es un aspecto clave para que la molécula lleve a cabo su función biológica; por esta razón, los estudios estructurales evalúan distintas condiciones que afectan la estabilidad conformacional con el propósito de identificar los factores que afectan a la proteína y con ello limiten su utilidad en aplicaciones industriales (Pace y col., 1990; Bertucci y col., 2011). Existen distintas técnicas para caracterizar la estructura de proteínas como la cristalografía de rayos X, la microscopía electrónica, la resonancia magnética nuclear y las técnicas espectroscópicas, entre las que destacan el dicroísmo circular y la espectroscopía de fluorescencia.

3.2.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas. La luz polarizada en un plano está formada por dos componentes reunidos circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. De esta manera, cuando esta luz pasa por un medio ópticamente activo, cada uno de sus componentes interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. Esta interacción produce un desfaseamiento y un cambio de magnitud diferencial en ambos componentes de la

luz polarizada; a su vez, este fenómeno provoca una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferencia en la absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían con la longitud de onda, lo que permite obtener espectros de diferentes fenómenos, es decir, gráficas de la rotación o elipticidad respecto a la longitud de onda.

Los espectros de DC se obtienen generalmente mediante radiación electromagnética en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm). En la región del UV cercano, los cromóforos más importantes en proteínas son los grupos aromáticos de las cadenas laterales del triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), así como los puentes disulfuro. Esto es por la asimetría en estos grupos químicos debido exclusivamente a su entorno y a la distribución de los residuos aromáticos en toda la macromolécula. Los espectros en esta región son un reflejo de la conformación terciaria de una proteína. Los espectros de DC en la región del UV lejano son consecuencia principalmente del enlace amida que une a los residuos de aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína; por esta razón, las señales de DC se pueden interpretar (mediante el uso de algoritmos) en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, de acuerdo al porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otras formas estructurales) (Neumann y Snatzke, 1990).

3.2.2 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión que se da en dos etapas. En la primera, las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética; posteriormente, las especies excitadas se relajan al estado fundamental y el exceso de energía se libera en forma de fotones. En otras palabras, una vez excitada la molécula, pasará al modo vibracional de menor energía del estado excitado; es decir, el fotón que se absorbió durante la excitación será emitido con una menor energía durante el proceso de

fluorescencia, por lo que posee una frecuencia menor y emite a mayor longitud de onda (Skoog y col., 2007).

En las proteínas plegadas la fluorescencia intrínseca es una mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos Trp, Tyr y Phe. Mediante esta técnica se mide la intensidad de la longitud de la onda de emisión, entre 300 y 350 nm. La radiación con una longitud de onda de 280 nm excita tirosinas y triptófanos, mientras que a 295 nm provoca la excitación de triptófanos. La emisión de fluorescencia de los triptófanos depende mucho del ambiente en el que se encuentra la proteína. Por ejemplo, una proteína en el estado nativo tendrá los residuos de triptófano predominantemente en la parte del núcleo hidrofóbico y, por lo tanto, estarán en zonas donde las moléculas de agua tienen poco acceso, esto genera que el espectro de emisión se mueva hacia regiones del UV con un máximo de emisión cercano a 330 nm. En cambio, cuando se desnaturaliza la proteína, el espectro de emisión se mueve hacia el rojo y presenta un máximo de emisión cercano a 350 nm, esto es un fenómeno que se produce porque los triptófanos pasan a un ambiente más hidrofílico (Vivian y Callis, 2001).

3.1.3 Ensayos de termofluor

El ensayo por termofluor (TRF), también conocido como ensayo de desplazamiento térmico o fluorescencia diferencial de barrido, es una técnica rápida para la medición de la estabilidad térmica de una proteína. Se basa en el uso de un colorante que tiene afinidad por las regiones hidrofóbicas de una proteína. En los ensayos, un colorante interactúa con las regiones del núcleo hidrofóbico de una proteína tras la desnaturalización por calor. Para muchas proteínas, el aumento gradual de la temperatura tiene poco efecto sobre el desplegamiento. Hasta que se alcanza una temperatura en la que rápidamente se desarrolla la desnaturalización, la proteína desplegada expondrá su núcleo hidrófobo; así, cuando el colorante interacciona esas regiones, emite una señal fluorescente (Chan y col., 2015).

El dicroísmo circular y el termofluor son técnicas espectroscópicas para examinar el desplegamiento de proteínas generado por cambios de temperatura.

A partir de los datos recolectados con estas técnicas, se puede hacer la determinación de la temperatura media del desplegamiento (T_m), que es una forma cuantitativa que indica la estabilidad térmica que una proteína posee. Una proteína con mayor estabilidad requerirá mayor temperatura para desplegarse completamente (Phillips y Hernández, 2011). De forma similar, la concentración media del desplegamiento ($C_{1/2}$) es otro parámetro que sirve para establecer cuantitativamente la estabilidad de una proteína. Para su determinación se requiere un agente desnaturizante (urea o cloruro de guanidinio) y mediante determinaciones espectroscópicas se obtiene una curva de transición. El término $C_{1/2}$ alude a la cantidad de agente químico que se necesita para desnaturizar al 50% una proteína (Pace, 1986).

3.3 Expresión de proteínas

En muchas ocasiones, se requiere una gran cantidad de proteína para su caracterización; como es sabido, es difícil obtenerla de forma natural al interior de la célula. La expresión de proteínas recombinantes mediante fermentación es una opción para obtener cantidades suficientes de proteína para estudios estructurales. La fermentación es un proceso en el que los microorganismos producen metabolitos o biomasa; a través del uso de cultivos en suspensión líquida se llevan a cabo transformaciones de materia orgánica en las que la descomposición de los sustratos es catalizada por enzimas sintetizadas por los microorganismos (Hernández, 2003).

La función principal de la fermentación es conservar al medio y a los microorganismos en las condiciones idóneas para obtener la mayor producción de los compuestos de interés. Comúnmente, los biorreactores se construyen de vidrio o acero inoxidable; su volumen fluctúa de entre uno hasta cincuenta litros y, a nivel industrial, pueden alcanzar hasta los 300,000 litros. El volumen de trabajo de un fermentador es hasta del 80% del volumen total. Existen diferentes tipos de fermentadores; cada uno está diseñado para adaptarse a las condiciones de operación necesarias para optimizar la producción de la sustancia de interés. Los

más utilizados a nivel laboratorio son el matraz erlenmeyer y el reactor de tanque agitado (Hernández, 2003).

El matraz erlenmeyer es la herramienta más usada en el laboratorio porque, antes de aumentar el tamaño del proceso, sirve para seleccionar la mejor cepa, preparar el inóculo y hacer un examen de las mejores condiciones para el desarrollo del cultivo. De entre las desventajas para el óptimo crecimiento de los microorganismos destacan: no se controlan las condiciones de pH, asepsia y oxígeno disueltos necesarios (Hernández, 2003). Cabe mencionar que se han diseñado matraces con hendiduras internas (baffles) cuya función es evitar la formación de vórtices para lograr un mezclado homogéneo y aumentar la oxigenación del cultivo.

El reactor de tanque agitado está conformado por un tanque con un motor en la parte superior o inferior para la agitación del caldo de cultivo. Cuando el biorreactor es pequeño, se puede esterilizar en autoclave; si es de un mayor volumen, comúnmente cuentan con un sistema de inyección de vapor para su esterilización (Hernández, 2003).

4. Modificación de proteínas

Mediante ingeniería de proteínas se puede manipular una proteína con la finalidad de realizar cambios estructurales que mejoren los procesos de purificación, generen cambios en las propiedades catalíticas y/o provoquen la creación de agentes con propiedades terapéuticas o funcionales (Fersht, 1999).

Kim y col. (1990) realizaron un estudio estructural en la glicinina de soya. La proteína fue modificada mediante la eliminación de las regiones variables y con la inserción de cuatro residuos de metionina. Las proteínas modificadas se expresaron en *E. coli* y se evaluó la capacidad de autoensamble en trímeros de la proteína recombinante. Según los resultados observados mediante análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa los autores concluyeron que las deleciones hechas en las regiones I, IV y V fueron toleradas porque las proteínas mutantes se ensamblaron de forma similar que las silvestres y por lo tanto la proteína puede ser modificada en esas regiones sin poner en riesgo su

estabilidad. También observaron que la modificación con metioninas mejora las propiedades gelificantes de la proteína.

El grupo de Yoshikawa aisló e identificó el péptido antihipertensivo RPLKPW de ovoalbúmina. Posteriormente, los investigadores insertaron cuatro copias del péptido en la β -conglucina de soya. Las posiciones donde se insertó cada una de las copias fueron Pro15-Arg21, Pro38-Pro44, Pro44-Gln51 y en C-terminal de la proteína. Mediante esta estrategia desarrollaron una proteína modificada con una actividad antihipertensiva 2000 veces mayor que la ovoalbumina (Matoba y col., 1999; Onishi y col., 2004).

Por su parte, Takenaka y col. (2000) generaron dos proteínas mutantes por la introducción de dos péptidos con actividad hipocolesterolémica en la subunidad de la glicina de soya A_{1a}B_{1b}. Para ello, realizaron el análisis del alineamiento de las cinco subunidades que componen la glicina e identificaron un sitio homólogo con el péptido enterostatina (VPDPR), el cual es un péptido que inhibe el consumo de alimentos con alto contenido de grasa. Además, insertaron al péptido LPYPR que tiene similitud con la enterostatina y que se identificó en la subunidad A₅A₄B₃ de la glicina en un estudio previo; LPYPR también mostró un efecto hipocolesterolémico. A partir de estos hallazgos, se llevó a cabo la modificación de A_{1a}B_{1b} por mutación sitio-dirigida entre el sitio Tyr62-Glu68 y al expresarlas en *E. coli* observaron una acumulación del 20% y del 15% (con respecto a la proteína total) para la mutante con enterostatina y para la mutante con LPYPR, respectivamente. También, reportaron que la liberación *in vitro* de los péptidos se realizó con las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina y que se logró un rendimiento del 40% de enterostatina liberada y del 62% del péptido LPYPR liberado a partir de las dos proteínas mutantes puras. Los autores sugieren que los péptidos de las proteínas mutantes se podrían liberar durante el proceso digestivo y ser absorbidos en el intestino para generar un efecto hipocolesterolémico en los consumidores.

En otro estudio, se incrementó la estabilidad del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) al hacer deleciones de fragmentos hidrofóbicos repetitivos. Al mismo tiempo, con las modificaciones hechas, se mejoró la solubilidad de la

proteína mutante y se pudo almacenar por mayor tiempo a temperaturas moderadas sin pérdida de la estabilidad (Kamionka, 2011). Entonces a partir de estos hallazgos es posible que al eliminar regiones hidrofóbicas de una proteína se pueda aumentar su estabilidad.

También, se han mejorado las propiedades gelificantes de la globulina 11S de amaranto por la inserción de cuatro metioninas en la región variable V. El cambio en esa región fue realizado con base en la estructura tridimensional de la proteína. La modificación provocó la formación de geles con mayor dureza comparado con los geles que forma la proteína sin modificar. La proteína mejorada podría ser usada en el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Tandang-Silvas y col., 2012; Carrasco-Peña y col., 2013).

En otros estudios, se han realizado cambios estructurales a proteínas en regiones variables para mejorar los procesos de purificación (Medina-Godoy, 2005) y, en algunos casos, las propiedades nutraceuticas por la inserción de péptidos bioactivos (Luna-Suárez y col. 2010). Las propiedades funcionales que posee la amarantina hacen de esta proteína una molécula que puede ser utilizada como aditivo para la formulación de alimentos. Dado que se mejoran sus propiedades nutraceuticas, las proteínas recombinantes podrían ser utilizadas para la elaboración de alimentos con fines terapéuticos (Duranti, 2006).

En el 2000 Osuna-Castro y col. clonaron y expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) el cDNA que codifica para la amarantina; ellos lograron un rendimiento de 32 mg/L de cultivo de proteína de forma insoluble. Posteriormente, Medina-Godoy y col. (2004) lograron la expresión de la misma proteína con cola de histidinas en *E. coli* Origami con un rendimiento de 76 mg/L; mediante la purificación en un solo paso obtuvieron 48 mg/L de amarantina pura. En el 2008 Luna-Suárez y col. expresaron la subunidad ácida de la amarantina con cola de histidinas en *E. coli* Origami; la proteína se purificó de la fracción soluble por cromatografía de afinidad y consiguieron 30 mg de proteína pura por cada litro de cultivo en caldo Terrific. Años más tarde, Luna-Suárez y col. (2010) expresaron la subunidad ácida de la amarantina modificada con péptidos bioactivos (VYVYVYVY) en *E. coli* Origami y

obtuvieron un nivel de expresión de 60 mg/L de cultivo; al purificar la proteína mutante recuperaron 40 mg de proteína por cada litro.

En el año 2012 se logró la expresión de la subunidad ácida de la amarantina modificada en dos regiones hipervariables por la inserción de los péptidos bioactivos VYVYVYVY e IPP; en esta investigación se expresaron 90 mg/L de cultivo a nivel fermentador con el uso de *E. coli* Origami (Castro-Martínez, 2012). En el mismo año se aumentó el rendimiento de la subunidad ácida de la amarantina doblemente modificada mediante la expresión de la proteína con células de *E. coli* Rosetta (DE3) y con la manipulación de las condiciones de aireación, temperatura y flujo de aire a nivel fermentador. El rendimiento que se consiguió fue de 747 mg/L de cultivo en medio Terrific (Arano-Varela, 2012). Finalmente, en el 2013, el rendimiento de la proteína con dos modificaciones se incrementó a 1,681 mg/L de cultivo mediante la manipulación de nueve factores a nivel fermentador, entre los que destacan: el uso de lactosa como agente inductor, un medio de cultivo mínimo, *E. coli* Rosetta (DE3) como células de expresión, la aireación, el momento de la inducción y la agitación (Morales-Camacho y col., 2013).

En todos los casos citados se han probado las propiedades funcionales y/o nutraceuticas. Sin embargo, en ninguna de las investigaciones descritas se han evaluado las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las nuevas moléculas. Aun cuando la estabilidad conformacional de estas nuevas proteínas tiene importancia práctica porque es un criterio que limita su uso en aplicaciones industriales.

En esta investigación se pretende evaluar los cambios provocados en la estabilidad estructural del polipéptido ácido de la amarantina (AAC) por la inserción de péptidos con actividad antihipertensiva. Se compararán los niveles de acumulación en *Escherichia coli* de cinco versiones del polipéptido modificado mediante mutagénesis sitio-dirigida. Cuatro de éstas tendrán insertados cuatro dipéptidos VY (en serie) en cada una de las regiones variables del polipéptido ácido (AACM.1, AACM.2, AACM.3 y AACM.4) y una versión tendrá, además del péptido VY, un péptido RIPP en la región carboxi-terminal (AACM.3.4). Los

polipéptidos modificados se caracterizarán con la finalidad de observar si las modificaciones realizadas generan cambios en las estructuras de los polipéptidos que pongan en riesgo o repercutan directamente sobre la estabilidad estructural de las versiones recombinantes.

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, debido al elevado índice de hipertensión en la población, se han desarrollado fármacos antihipertensivos que provocan reacciones secundarias como tos seca, erupción cutánea, debilidad y náuseas, entre otros. Por lo tanto, es necesario desarrollar productos que coadyuven al control o prevención de este padecimiento que no causen los citados efectos secundarios. Para el diseño de nuevas sustancias, algunas investigaciones se han centrado en la modificación de proteínas de interés nutricional mediante la inserción de péptidos bioactivos con efectos antihipertensivos. Sin embargo, muchos de los estudios se han limitado a probar su efectividad sin analizar las consecuencias estructurales que traen consigo dichas modificaciones.

El estudio de los cambios estructurales es primordial para sentar las bases que dan paso al uso de una proteína como agente acarreador. En otras palabras, las proteínas modificadas con péptidos bioactivos requieren estudios a nivel molecular que permitan evaluar su estabilidad estructural con el objetivo de establecer criterios para su uso en la formulación de alimentos y/o su aplicación como aditivos.

Por lo tanto, en este trabajo se pretende evaluar el efecto de la modificación con péptidos bioactivos en la estabilidad estructural del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto en cada una de sus regiones variables.

IV. HIPÓTESIS

La inserción de péptidos VYVYVYVY y/o RIPP en la secuencia del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto modifican su estructura y su estabilidad.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar el efecto de la modificación con péptidos bioactivos en la estabilidad estructural del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto en cada una de sus regiones variables.

1.1. Objetivos Específicos

Obtener cada una de las versiones modificadas del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto recombinantes.

Analizar el efecto de la inserción de péptidos bioactivos en la estructura del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto.

Analizar el efecto de la inserción de péptidos bioactivos en la estabilidad del polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto.

Evaluar el efecto antihipertensivo de cada una de las versiones del polipéptido ácido de la amarantina mediante ensayos *in vitro*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 4 se presenta un esquema que muestra al polipéptido ácido de la globulina 11S de amaranto (AAC) y a cada una de sus versiones mutantes. Se puede observar que las proteínas AAC, AACM.3 y AACM.3.4 se reportaron previamente.

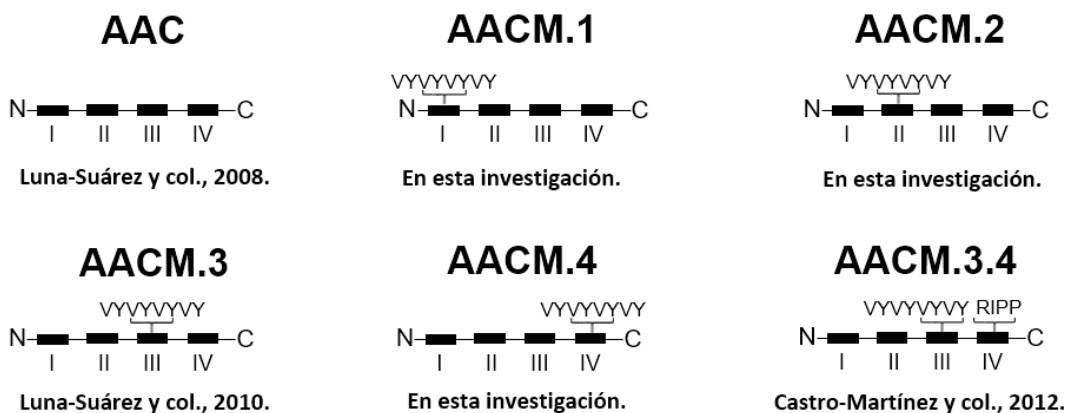


Figura 4. Esquema de AAC y de sus versiones modificadas. Se ilustran las cuatro regiones variables (resaltadas en negro) y con número romano se enumeran. Los péptidos insertados se encuentran por encima de cada esquema y en la región variable correspondiente.

1. Plásmidos y cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron las cepas de expresión BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) y Rosetta 2 (Novagen). La cepa Rosetta 2 contiene el plásmido pRARE que mejora la expresión de proteínas de origen eucariótico que contienen codones que son raros en *E. coli*. El plásmido pRARE le confiere resistencia a cloranfenicol a la bacteria y le suministra tRNAs para la codificación de los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA y CGG. La cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL contiene copias extras de los genes *argU*, *ileY* y *leuW*. Estos genes codifican tRNAs que reconocen los codones de arginina (AGA y AGG), isoleucina (AUA) y leucina (CUA) con esto se mejora la expresión de proteínas heterólogas.

La cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) se utilizó para el mantenimiento y propagación de plásmidos. La transformación de las células BL21-CodonPlus(DE3)-RIL se realizó por choque térmico con el plásmido pET-AC6His que codifica para la subunidad ácida de la amarantina (Luna-Suárez y col., 2008). También se utilizó el plásmido pET-AC-M3 que codifica para la subunidad ácida de la amarantina modificada en la región variable tres (AACM.3) (Luna-Suárez y

col., 2010) y el plásmido pET-AC-M3.46His que codifica para la subunidad ácida doblemente modificada (AACM.3.4) (Castro-Martínez y col., 2012).

2. Construcción de las nuevas versiones modificadas: AACM.1, AACM.2 y AACM.4

Los plásmidos pET-AACM1-6His y pET-ACM2-6His que codifican para la subunidad ácida modificada en la región variable uno (AACM.1) y la proteína modificada en la región variable dos (AACM.2) se obtuvieron a partir del plásmido pET-AMAR-6His (Medina-Godoy y col., 2004). El plásmido de expresión pET-AC-M4-6His que codifica para la proteína modificada en la región variable cuatro (AACM.4) se construyó a partir del plásmido pET-AC-6His (Luna-Suárez y col., 2008). Este plásmido se utilizó como templado para llevar a cabo la mutagenesis sitio-dirigida con las cuatro copias VY dentro de la región variable cuatro de la subunidad ácida de la amarantina. La enzima Platinum®*Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) se utilizó para obtener los productos de PCR mutados en la región variable cuatro (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos para la construcción de los plásmidos que codifican para AACM.1, AACM.2 y AACM.4

Proteína	Vector	Oligonucleótidos
AACM.1	pET-AACM1-6His ^a	Directo: 5'- GTTTACGTTTACGTTTACGTATAC TTTAGAGAGTTTCAACAA GG-3' Reverso: 5'- CCTTCCTTCACCTTCCATTA-3'.
AACM.2	pET-ACM2-6His ^b	Directo: 5'- GTTTACGTTTACGTTTACGTATAC GGCGATCGCTTCCAAGA CC Reverso: 5'- TCGCATTCCGAACCTCCTG-3'.
AACM.4	pET-AC-M4-6His ^c	Directo 5'-TGGGTGATTAATGGAAGGAAGG-3' Reverso:5'- <u>CTCGAGGTA AACGTAAACGTATACGTAAACCCTATTGGGA</u> AGG-3'

^{a, b} la secuencia que corresponde al inserto VYVYVYVY está resaltado en negrita, el sitio de restricción *Sna*BI está subrayado

^c la secuencia subrayada en el oligonucleótido directo corresponde al sitio de restricción *Ase* I; la secuencia que codifica el péptido VYVYVYVY está resaltado en negritas, la secuencia subrayada en el oligonucleótido reverso corresponde al sitio de restricción *Xho*I.

Se realizó la amplificación del fragmento de ADN. El producto de PCR se clonó en el vector pPCR®2.1-TOPO®. Se seleccionaron las células transformadas de *E. coli* en placas de LB conteniendo 100 µg/mL ampicilina y X-gal. El fragmento de ADN que codifica para las proteínas modificadas se liberó de pPCR®2.1-TOPO usando las enzimas de restricción *VspI* y *XhoI*. Las clonas positivas se confirmaron por secuenciación y mediante análisis de restricción.

3. Modelaje de la estructura tridimensional de AAC y de sus versiones modificadas

Mediante el servidor RaptorX se obtuvieron los modelos tridimensionales de las proteínas (Källberg y col., 2012), para el modelado de las asas y giros se utilizó el servidor ModLoop utilizando como molde las coordenadas de la estructura cristalina de la globulina 11S del grano de amaranto (PDB 3QAC) (Tandang-Silvas y col., 2012). Para mejorar la estereoquímica de las cadenas laterales, se llevó a cabo una minimización de energía con el servidor gratuito Yasara (Krieger y col., 2009). También, se realizó el refinamiento estructural para la corrección de los ángulos, choques y la longitud de los enlaces con la paquetería WinCoot 0.8.2. Finalmente, se evaluó la calidad de las estructuras obtenidas a partir de la puntuación que genera el servidor MolProbity con el uso de los gráficos de Ramachandran, la evaluación de rotámeros, evaluación de los contactos y de la geometría de la proteína que genera el mismo servidor (Chen y col., 2010).

El programa PyMOL se usó para obtener las imágenes de todos los modelos tridimensionales (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

4. Expresión de las proteínas recombinantes

Las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos para expresar las proteínas recombinantes se usaron para inocular 100 mL de caldo LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol.

Los precultivos se dejaron en agitación a 37 °C y 200 rpm en un agitador orbital por 12 horas. La expresión a nivel matraz se realizó con las cepas Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformadas con el vector respectivo para la

expresión de AAC, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4. Los experimentos se llevaron a cabo en 42 mL de medio LB, el inóculo inicial fue del 2.5% (v/v) del volumen total; las fermentaciones se realizaron en matraz de 250 mL bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras de 1 mL a diferentes intervalos de tiempo a las 0, 1.5, 3, 6 y 24 h de inducción con el fin de analizar la expresión de las proteínas. Las muestras se cosecharon mediante centrifugación a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. La pastilla celular resultante del proceso de centrifugación se almacenó a -20 °C para el posterior análisis de la expresión de la proteína recombinante.

Los cultivos a nivel fermentador se realizaron en un biorreactor Biostat A (Sartorius) de 5 L con un 80% de volumen de trabajo. Para la expresión se utilizó la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformada con los plásmidos que codifican para AAC, AACM.1, AACM.2, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4. Las condiciones de cultivo para la expresión de cada proteína fueron las mismas y se describen a continuación: 4 L de caldo de cultivo (200 g/L papa, 12 g/L triptona, 4 g/L glicerol, 17 mM KH_2PO_4 y 72 mM K_2HPO_4); 2.5% (v/v) de inóculo, agitación de 340 rpm; 1 vvm de aireación, el pH se mantuvo a 7 con la adición de 2 M NaOH o 5 M H_2SO_4 ; la temperatura inicial fue de 37 °C y al momento de la inducción se ajustó a 30 °C. La inducción se realizó con 0.5% de lactosa (p/v) cuando la DO_{600} alcanzó 0.5 unidades de absorbancia. Las células se cosecharon 6 horas después de la inducción mediante centrifugación a 13,300 g por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las pastillas celulares se sometieron a sonicación a una amplitud del 18% por 1 min en 40 mL de amortiguador de extracción (AE) (0.2 M NaCl, 20 mM fosfatos (sodio), pH 7.5) y después un periodo de reposo en hielo por 3 min; este tratamiento se aplicó en seis ocasiones. A continuación, las células sonicadas se centrifugaron a 15,600 g por 30 min a 4°C y el sobrenadante se desechó. En seguida, la pastilla con los residuos restantes se resuspendió en 10 mL de amortiguador de solubilización (AS) (urea 6 M, NaCl 0.2 M, 20 mM amortiguador fosfatos, pH 7.5) y se agitó a 200 rpm durante 4h a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 15,600 g por 30 min a 4°C para remover el material insoluble.

5. Purificación de AAC y de sus versiones modificadas

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó con el extracto insoluble tratado previamente con urea y se aplicó a una columna AP-2 20x300 mm (Waters) empacada con la resina Protino Ni-TED (Macherey-Nagel) acoplada a un sistema de cromatografía BioLogic DuoFlow™ (Bio-Rad). La elución de las proteínas de interés se llevó a cabo con 3 volúmenes de AS y una concentración escalonada de imidazol a un flujo de 2.5 mL/min a temperatura ambiente. Se colectaron muestras con la intención de observar en qué concentración de imidazol eluye cada proteína. Las concentraciones escalonadas de imidazol fueron 5, 25, 50, 125, 250 y 500 mM. Las fracciones colectadas se analizaron con geles SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie G-250.

6. Protocolo de replegamiento de AAC y de las versiones modificadas

Una vez que se purificaron las proteínas AAC, AACM.1, AACM.2, AACM.3, AACM.4 y AACM3.4 se realizaron los procesos de replegamiento a dos condiciones de pH (7.5 y 4.2). Durante los procesos de replegamiento se llevó a cabo la eliminación de la urea que se encontraba en las muestras colectadas. El primer paso fue la diálisis de 1 mL de muestra que se depositó en una membrana de celulosa (Sigma) contra 50 mL de amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl y 4 M urea por 2 h en agitador de rodillos. Posteriormente, se dializó contra amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl y 3 M urea por 2 h en agitación. Una vez que se cumplió el proceso, se recuperó la muestra de 1 mL y se volvió a dializar contra 50 mL de amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl y 1.5 M urea por 2 h en agitador de rodillos. Al terminar el proceso, nuevamente se dializó la muestra contra 50 mL de amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl y 0.5 M urea por 2 h en agitador de rodillos. Finalmente, las muestras de 1 mL se dializaron en dos ocasiones contra 50 mL de amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl por dos 2 h en el mismo agitador. Los tratamientos se realizaron a 4 °C y al finalizar los procesos de diálisis las muestras con proteína se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C. Al sobrenadante que se recuperó se le determinó la concentración de proteína resultante mediante el método del ácido bicinconínico

(BCA). En la siguiente Tabla se describen los tratamientos que se realizaron y los pasos secuenciales para cada uno.

Tabla 6. Tratamientos para el proceso de replegamiento de AAC, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4.

Amortiguador para diálisis	TRATAMIENTO	
	pH 7.5 0.02 M fosfatos	pH 4.2 0.02 M acetatos
0.2 M NaCl, 4 M urea (2 h)	pH 7.5	pH 4.2
0.2 M NaCl, 3 M urea (2 h)	pH 7.5	pH 4.2
0.2 M NaCl, 1.5 M urea (2 h)	pH 7.5	pH 4.2
0.2 M NaCl, 0.5 M urea (2 h)	pH 7.5	pH 4.2
0.2 M NaCl (en dos ocasiones por 2 h)	pH 7.5	pH 4.2

7. Obtención de anticuerpos para la detección de AAC y sus versiones modificadas

El anticuerpo policlonal anti AAC fue producido en conejos New Zeland. El esquema de inmunización consistió en cinco inoculaciones con siete días de intervalo cada una. La inmunización se realizó por vía intramuscular en distintos lugares del dorso del animal con 0.5 mL de AAC pura (1 mg/mL) y 0.5 mL de adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inoculación; las cuatro inoculaciones posteriores se hicieron con adyuvante incompleto de Freund (AIF), a la misma proporción con un volumen final de 0.5 mL de emulsión. Al finalizar el programa de inmunización se realizó el sangrado completo del conejo y la sangre se recolectó en tubos de ensayo; posteriormente, se incubó a 37 °C durante 45 minutos para permitir la formación del coágulo y se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm a 4 °C. El suero se dividió en alícuotas de 1.5 ml cada una y se guardó a -4 °C hasta su uso y a -20 °C para próximos ensayos. Para evaluar su eficiencia en la detección inmunológica se probaron tres diluciones 1:30000, 1:60000 y 1:90000 (volumen de suero inmune:volumen de amortiguador).

8. Análisis de las proteínas recombinantes

8.1 Mediciones espectroscópicas

8.1.1 Dicroísmo Circular

Los ensayos de dicroísmo circular (DC) se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan™ (Applied Photophysics) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience) para el control de temperatura. El espectro se registró de 195 a 260 nm de longitud de onda. La concentración de proteína que se utilizó para la obtención de los espectros fue de 0.2 mg/mL en amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl a una temperatura de 22 °C. La celda que se utilizó para las mediciones fue de 0.1 cm de paso de luz. La predicción de estructura secundaria se obtuvo mediante el servidor DICHROWEB (Whitmore y Wallace, 2004). Todos los espectros se corrigieron restando el blanco correspondiente y los datos colectados en miligrados se transformaron a elipticidad por residuo medio ($[\theta]_{mrw}$) mediante la siguiente expresión:

$$[\theta]_{mrw} = S * MRW / 10 * C_{mg/mL} * L \quad (1)$$

Donde S es la señal de DC observada en miligrados, MRW es el peso promedio de los residuos (peso molecular de la proteína dividido entre el número de residuos), $C_{mg/mL}$ es la concentración de proteína en mg/mL y L es la longitud de la celda utilizada (cm).

8.1.1.1 Desnaturalización por temperatura: DC

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que se puede utilizar para observar el desplegamiento de proteínas generado por cambios de temperatura, por lo tanto, los ensayos de desnaturalización por temperatura también se realizaron mediante esta metodología. La desnaturalización se determinó siguiendo el cambio en la señal de elipticidad a 207 nm en función de la temperatura que se varió de 20 °C a 90 °C. La concentración de proteína fue de 0.2 mg/mL en el amortiguador descrito anteriormente. Después de la desnaturalización por temperatura se obtuvo un espectro de DC de la muestra

tratada para observar algún cambio en la señal a causa del efecto de la temperatura. Los datos colectados durante los experimentos de transición por temperatura se normalizaron a fracción de proteína desplegada (F_d) mediante la siguiente expresión:

$$F_d = \frac{(y_t - y_f)}{(y_u - y_f)} \quad (2)$$

Donde, y_t es la señal espectroscópica observada a lo largo del experimento, y_f es la señal de la proteína nativa y y_u es la señal de la proteína desplegada.

Utilizando la curva de Van't Hoff de la desnaturalización se puede estimar la entalpía de desplegamiento (ΔH) a la T_m estimada para cada proteína. La constante K se determinó con la siguiente expresión:

$$K = \frac{F_d}{F_n} \quad (3)$$

Donde F_d y F_n son las concentraciones de la proteína desnaturalizada y proteína plegada, respectivamente.

ΔH se calculó a partir de los datos colectados de DC con la ecuación de Van't Hoff mediante un gráfico ($\ln K$ vs $1/T$):

$$m = \frac{-\Delta H}{R} \quad (4)$$

Donde m , es la pendiente de los gráficos de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$); y R , es la constante de los gases $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Es importante notar que los requerimientos de reversibilidad y equilibrio no se cumplen en las condiciones experimentales que se probaron. Por lo tanto, los valores de ΔH y T_m son aparentes y su uso es con fines comparativos por lo que deben ser considerados con precaución.

8.1.2 Ensayos de termofluor

Las proteínas recombinantes también se sometieron a ensayos de termofluor (Pantoliano y col., 2001). Para las determinaciones se utilizó el equipo ABI 7900 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Para la emisión de fluorescencia se utilizó el colorante fluorescente Sypro Orange (Invitrogen) que tiene una longitud de onda de emisión a 625 nm. 20 μ L de muestra (volumen final) con una concentración de 1 mg/mL de proteína y 5X del colorante Sypro Orange en AE. La temperatura se incrementó de 25 a 95 °C a una velocidad de calentamiento de 1°C/min. El tiempo de equilibrio fue de 5 s para cada temperatura. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, el programa Origin (version 6.0) (Northampton) se utilizó para obtener las curvas de transición y la temperatura media del desplegamiento. Los datos colectados se ajustaron a la ecuación (2) y a partir de la F_d se determinó la T_m .

8.1.3 Fluorescencia Intrínseca

Las mediciones de fluorescencia intrínseca (IF) se realizaron en un espectrofluorómetro PC1 (ISS) acoplado a un sistema Peltier (PolyScience) para mantener la temperatura. La concentración de proteína en estos experimentos fue de 0.1 mg/mL en amortiguador 0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl a una temperatura de 22 °C. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se midió la emisión en el intervalo de 310 a 410 nm y se colectaron los datos de emisión de fluorescencia cada 1 nm.

Con los datos colectados se determinó el centro espectral de masa (CEM) de cada proteína mediante la siguiente expresión:

$$CEM = \frac{\sum_i^j \lambda * I_\lambda}{\sum_i^j I_\lambda} \quad (5)$$

Donde I_λ es la intensidad de fluorescencia a cada longitud de onda de emisión (λ).

8.1.3.1 Desnaturalización química: urea

Los ensayos de desnaturalización se realizaron con la adición de diferentes concentraciones de urea a muestras de proteína pura y se monitorearon los cambios espectrales por fluorescencia. Las concentraciones de urea que se utilizaron fueron de 0 M (con incrementos de 0.5 M) hasta 7 M. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se midió la emisión en el intervalo de 310 a 410 nm y se colectaron los datos de emisión de fluorescencia cada 1 nm.

Para la determinación de la $C_{1/2}$ los datos se ajustaron a la ecuación (2).

8.2 Electroforesis

Mediante electroforesis SDS-PAGE se analizaron las muestras almacenadas durante los procesos de fermentación (en tubo, nivel matraz y nivel fermentador), es decir, se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%. En este método, se utilizó un amortiguador de carga compuesto por Tris-HCl 24 mM, pH 6.8; glicerol 10%; SDS 0.8%; 2- β -mercaptoetanol 5.76 mM; azul de bromofenol 0.04% (Laemmli, 1970), en este amortiguador se resuspendieron las pastillas celulares y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R-250 para poderlas visualizar en el gel. Se utilizaron los marcadores de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder y BenchMark™ prestained Protein Ladder (Invitrogen™ Co. Carlsbad, California, USA). El proceso de electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V por dos horas a temperatura ambiente en cámaras Miniprotean cell (Bio-Rad).

8.3 Análisis tipo Western blot

Se realizó la detección inmunológica de la proteína de acuerdo con Dumbroff y Gepstein (1993). Se separaron las proteínas en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana PVDF (Sequi-Blot™ Bio-Rad). Una vez realizada la transferencia, se lavaron la membrana con TTBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0.5%) por 15 minutos en agitación, posteriormente, la membrana se bloqueó con TTBS más seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (p/v) por dos horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavó la

membrana con el amortiguador TTBS; cada lavado duró 15 minutos. A continuación, se añadió el primer anticuerpo anti-amarantina (Osuna-Castro y col., 2000) o anti-AAC diluido en relación 1:60000 o 1:90,000 respectivamente (volumen anticuerpo:volumen amortiguador) en amortiguador TTBS y se incubó la membrana a temperatura ambiente con agitación suave por una hora. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana en tres ocasiones con TTBS (por 15 minutos cada lavado) y se adicionó el segundo anticuerpo, anti-conejo conjugado a la fosfatasa alcalina diluido en relación 1:3000 (GIBCO-BRL, Grand Island NY EUA). Después, se lavó la membrana con TTBS en tres ocasiones por 15 minutos y TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM) en tres ocasiones por 15 minutos cada lavado. Más tarde, en amortiguador (Tris-HCl 100 mM pH 9.0, NaCl 100 mM), se reveló con los sustratos BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato-toluidina) y NBT (cloruro de *p*-nitraziltetrazolio) (GIBCO-BRL, Grand Island NY EUA) con lo que se pudo observar la detección inmunológica de la proteína recombinante.

8.4 Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de la proteína se realizó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) que se basa en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con el cobre (Cu) en condiciones alcalinas. Esta reacción provoca la conversión de Cu^{+2} a Cu, este producto al reaccionar con BCA provoca la aparición de un color púrpura intenso con una abasorbancia máxima a 562 nm (Smith y col., 1985). La cuantificación de la proteína de interés se llevó a cabo densitométricamente con el programa Image Lab (Bio-Rad). En forma práctica, se determinó la concentración de proteína total por BCA en mg/mL con las muestras que se colectaron durante el proceso de fermentación. Una vez conocido este dato, se hicieron las determinaciones para cargar una cantidad conocida de proteína total en geles SDS-PAGE. Después de realizar la electroforesis, los geles se tiñeron y se escanearon para realizar la cuantificación. Para la determinación de proteína se usó la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

8.5 Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la proteína de interés

Se determinó el pI de la proteína de interés purificada mediante la técnica de enfoque isoeléctrico (IEF) (Katsube y col., 1994), se utilizaron tiras de 7 cm de longitud con valores de 3-10 y de 4-7 unidades de pH (IPG strip, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y se enfocaron en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) con 100 μ L de amortiguador (0.2 M NaCl, 0.02 fosfatos pH 7.5). Estas muestras se precipitaron con el kit ReadyPrep 2-D starter (Bio-Rad) al adicionar y mezclar con agitación vigorosa 300 μ L de precipitante, posteriormente, la muestra se incubó en hielo por 15 min., finalmente, se adicionaron a la mezcla 300 μ L de co-precipitante y el volumen total se agitó. La muestra se centrifugó a 13,300 g rpm por 5 min. a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante de la pastilla. Al precipitado se le agregaron 40 μ L de co-precipitante y se incubó en hielo por 5 min. A continuación, se centrifugó la muestra a 13,300 g 5 min. a temperatura ambiente y, una vez más, se separó el sobrenadante de la pastilla. A la fracción precipitada se le agregaron 25 μ L de agua destilada y se mezcló con agitación vigorosa por 10 seg. En seguida, se adicionó 1 mL de amortiguador de lavado (previamente enfriado a -20 °C) y 5 μ L de aditivo de lavado, esta mezcla se agitó en vortex hasta que la pastilla se dispersó; la muestra se almacenó a -20 °C por 30 min. con agitación cada 10 min. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 13,300 g por 5 min. a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante, la pastilla resultante se secó al aire por 5 min. Cumplido el tiempo, se resuspendió en 125 μ L de amortiguador de solubilización (Urea 8 M, CHAPS 4%, anfolitos acarreadores pH 3-10 0.5%, DTT 40 mM y azul de bromofenol 0.002%), esta mezcla se aplicó a la tira de acrilamida y se realizó una hidratación activa a un voltaje constante de 50 V por 12 h a 20 °C. Tras la rehidratación, se aplicó un acondicionamiento de la tira a 250 V por 15 min., posteriormente, se realizó un incremento de voltaje lineal a 4000 V en 2 h y, finalmente, el enfoque a 24,000 V-h. Después del proceso de enfoque, las tiras se equilibraron durante 10 min. en amortiguador de equilibrio (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, glicerol 20% y 130 mM DTT), que reduce los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Posteriormente, las tiras se incubaron con un segundo amortiguador de equilibrio

(Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, glicerol 20% y 135 mM iodoacetamida), que previene la reoxidación proteica durante la electroforesis y alquila los grupos sulfhidrilo residuales del DTT. Tras este tratamiento, la tira se colocó en la parte superior de los geles de SDS-PAGE al 12% de acrilamida para separarlas de acuerdo a su peso molecular y visualizarlas al momento de teñir el gel con azul de Coomassie G-250.

8.6 Proteínas solubles e insolubles

Para determinar en qué fracción se encontraba la proteína mutante se usaron algunas de las pastillas celulares que se almacenaron a -20 °C, estas se resuspendieron en amortiguador de lisis (0.2 M NaCl en amortiguador fosfatos 0.02M pH 7.5) 1:8 (peso de la pastilla: volumen de buffer). Posteriormente, las células resuspendidas se sometieron durante 5 min a sonicación al 15% de amplitud, seguido de un periodo de reposo de 5 min a 4 °C, este proceso se repitió por seis ciclos. Al terminar la sonicación, las muestras se centrifugaron a 15,500 g a 4 °C durante 30 min. En seguida, se separó el sobrenadante (fracción de proteína soluble) de la pastilla (fracción de proteína insoluble y restos celulares). La pastilla resultante se resuspendió en amortiguador de extracción (0.2 M NaCl en amortiguador fosfatos 0.02 M pH 7.5 y 6 M Urea) en relación 1:4 (peso de la pastilla: volumen de buffer) y se mantuvo en agitación por 4 h a 200 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 14,000 g a 4 °C, posteriormente, se recuperó el sobrenadante porque ahí se encontraba la fracción de proteína insoluble al igual que la proteína de interés.

8.7 Determinación de la actividad antihipertensiva de AAC y sus versiones modificadas (Evaluación IECA)

8.7.1 Digestión enzimática

Para determinar la posible capacidad antihipertensiva que poseen las proteínas se realizó el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Primero, se llevó a cabo una hidrólisis de las proteínas purificadas mediante la acción de las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. Este método se

desarrolló de acuerdo a lo descrito por Mallikarjun y col. (2006). Se incubaron las enzimas antes mencionadas con cada proteína recombinante a 37 °C en una relación de 2:100 (enzima:sustrato) por 18 h, posteriormente, se detuvo la reacción al desnaturalizar las enzimas por efecto de la temperatura a 95 °C por 10 min. Finalmente, la mezcla se filtró mediante una membrana de corte de 3000 NMWL a 4000 rpm por 5 min y se determinó la IECA del producto filtrado.

8.7.2 Determinación del IC₅₀ sobre la ECA

La actividad IECA se realizó mediante el método espectrofotométrico de Cushman y Cheung (1971), con las modificaciones propuestas por Hayes y col. (2007). Entonces, se realizó de manera análoga la acción de la ECA sobre la angiotensina I que libera la angiotensina II y el dipéptido His-Leu. En este caso, la enzima actuó sobre el sustrato Hipuril-histidil-leucina (HHL) que es el compuesto empleado en el método. Posteriormente, se realizó la medición espectrofotométrica de los productos de la reacción a una absorbancia de 228 nm de longitud de onda con la que se detecta el ácido hipúrico formado en la reacción. Los resultados se expresaron en IC₅₀ que se define como la cantidad de proteína necesaria para inhibir la actividad de la ECA en un 50%. A continuación, se describe el método:

A 200 µL de la solución de sustrato constituido por HHL (Sigma) a una concentración de 5 mM se agregaron 80 µL de muestra y se incubó por 5 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción enzimática se inició por la adición de 1 mU de ECA (EC 3.4.15.1 UI/mg) (Sigma), la mezcla de reacción se incubó y posteriormente se inactivó la enzima por descenso del pH al adicionar una cantidad de 250 µL de ácido clorhídrico a una concentración 1 N. Se realizó la extracción del ácido hipúrico formado por la reacción mediante agitación vigorosa con acetato de etilo. Finalmente, se centrifugó a 4000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase orgánica para su evaporación. El residuo obtenido de ácido hipúrico se disolvió en 1 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 228 nm en el espectrofotómetro. Se llevó a cabo un blanco de reacción en el que se añadió ácido clorhídrico previo a la acción de la ECA.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis de los modelos tridimensionales de AAC y de sus versiones modificadas

La Figura 5 muestra un esquema de la proteína AAC y de sus versiones modificadas que ilustra las inserciones realizadas en cada una de las regiones variables de AAC

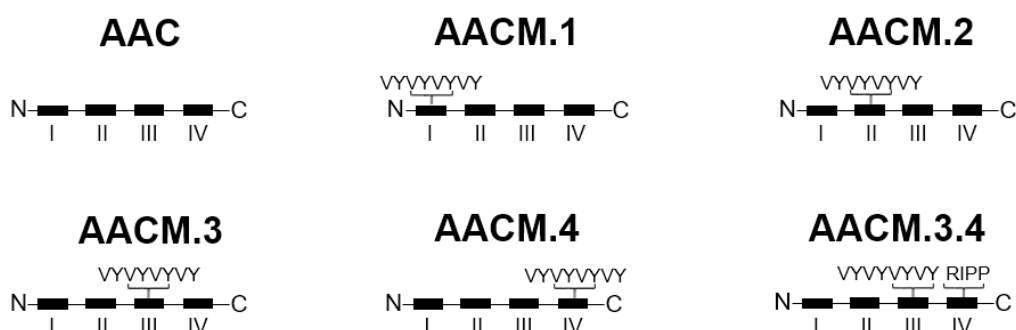


Figura 5. Esquema de las proteínas que se analizaron. Se ilustran las cuatro regiones variables (resaltadas en negro) y con número romano se enumeran. Los péptidos insertados se encuentran por encima de cada esquema y en la región variable correspondiente.

Mediante el servidor RaptorX se obtuvieron los modelos de las versiones modificadas del polipéptido ácido de la amarantina; los modelos que arrojó el servidor tienen un alto porcentaje de identidad (más del 90%) con el templado con número de acceso PDB 3QAC que corresponde a la proglobulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* L. obtenida mediante cristalografía de rayos X (Tandang-Silvas y col., 2012).

La evaluación con el servidor MolProbity de los modelos obtenidos mostró una buena calidad estereoquímica y mediante gráficos de Ramachandran se observó que la mayoría de los rotámeros se encuentran en regiones favorecidas (>95%). Los valores obtenidos para el análisis de choques intercatenarios se consideran aceptables (menores a 13.33). Finalmente, no se detectaron enlaces ni ángulos de torsión erróneos. En la Tabla 7 se muestra el resumen del análisis de cada uno de los modelos obtenidos. El RMSD (root mean square deviation) es una medida cuantitativa para comparar la similitud de las cadenas polipeptídicas de dos proteínas basados en la posición de sus C α y se obtiene mediante la

superposición de las estructuras (Kufareva y Abagyan, 2012). En la Tabla 7 se puede observar que todos los modelos mostraron diferencia con respecto a AAC. Los modelos con mayor diferencia son AACM.2 y AACM.3.4, seguidos de los modelos AACM.4 y AACM.3. El modelo tridimensional de AACM.1 fue el que mostró mayor similitud con AAC.

Tabla 7. Evaluación de los modelos tridimensionales de AAC y de sus versiones modificadas.

	AAC	AACM.1	AACM.2	AACM.3	AACM.4	AACM.3.4
^a Puntuación MollProbit	1.43	2.03	1.74	1.54	1.8	1.76
Ramachandran favorecidos (%)	95.7	94.1	96.9	96.2	94.5	95.9
Rotameros (%)	96.6	95.9	95.5	96.7	95.1	99.2
Choques	3.4	13.3	10.9	5	7.65	8.8
RMSD	0	3.86	7.26	4.08	4.52	5.43

^a la puntuación está normalizada a una escala similar a la de resolución por rayos X, para el resultado se toma en cuenta la puntuación por los choques, la puntuación de los rotameros y la evaluación por el Ramachandran.

La predicción de estructura secundaria que se obtuvo mediante el servidor PSIPRED coincide con la predicción que se obtuvo por el servidor RaptorX (Apéndice A). En la Figura 6 se muestran los modelos tridimensionales de cada proteína recombinante y se puede observar que en todos existen diferencias conformacionales. Al comparar las imágenes y animaciones de los polipéptidos modificados con la versión sin modificar (AAC) se puede observar que: el dominio β -barril, que es la estructura principal, se mantiene en todos los modelos y se aprecia que las modificaciones hechas en las regiones variables no comprometen esta estructura.

El modelo que corresponde a la proteína AAC muestra una cavidad entre el fragmento Ser191-Asn206 que corresponde a la región variable tres (Tandang-Silvas y col., 2012). Esta cavidad no se observa en el modelo de la proteína AACM.1 porque el fragmento que contiene el inserto VYVYVYVY (que corresponde con la región variable I Met1-Gln16) se desplazó y enmascara esta zona. También, en el modelo de AACM.1 se observa un fragmento de hélice en la región C-terminal. El modelo de la proteína AACM.4 reveló dos fragmentos que

adoptan una conformación más cerrada (Met86-Ile131 y Arg246-His290) y coinciden con las regiones variables dos y cuatro. El modelo de la proteína AACM.2 mostró una estructura más relajada porque el fragmento en la región N-terminal (que corresponde con los residuos que se encuentran entre Met1-Thr25) se aleja de la estructura principal de la proteína, también presentó una cavidad en su estructura. Así mismo, el modelo de la proteína AACM.3 mostró una estructura más distendida porque el fragmento His196-Arg210 que contiene el inserto VYVYVYVY y que corresponde con la región variable tres se aleja del motivo β -barril. El modelo de la proteína AACM.3.4 fue el más distendido porque en su estructura todas las regiones descritas previamente se alejan del dominio principal. También, fue el modelo que presentó menor contenido de hojas β . Las diferencias conformacionales de los modelos y las estructuras distendidas de AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4 pueden generar menor contenido de interacciones intercatenarias y con ello afectar sus propiedades termodinámicas. Los modelos presentan diferencias conformacionales como resultado de las inserciones realizadas, pero es importante notar que no hay una estructura cristalográfica o similar de AAC ni de las versiones mutantes, por lo tanto, su análisis se debe considerar con precaución porque el alcance de este estudio carece de evidencia experimental.

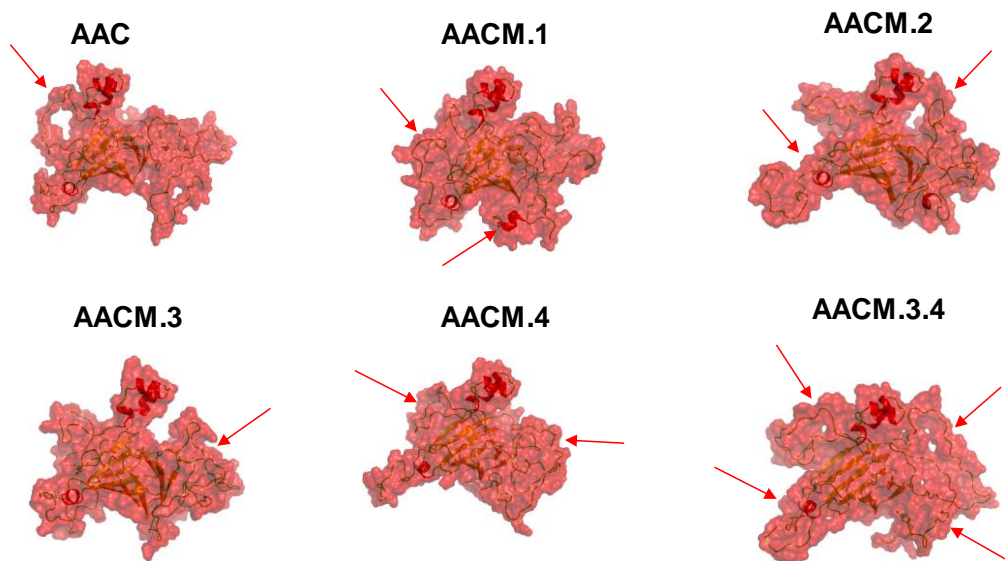


Figura 6. Modelos de AAC y sus versiones modificadas. Las flechas indican las zonas que se modifican con respecto a la proteína AAC.

2. Expresión de las proteínas a nivel matraz

La segunda etapa consistió en realizar la expresión de las proteínas AAC, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4 a nivel matraz para identificar la cepa de *E. coli* que mejor expresa las proteínas recombinantes de acuerdo al nivel de expresión y a su solubilidad. Para esto se realizaron fermentaciones a nivel matraz en medio LB con una relación de 1:6 (volumen de medio:volumen de medio). En la Figura 7 se observa el perfil electroforético del extracto total de proteínas que se obtuvo durante la expresión de AAC. Las dos cepas expresaron la proteína hasta por 24 h. En la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL los niveles de expresión son mayores al compararlos con Rosetta 2. La expresión de la proteína se confirmó mediante Western blot (Figura 8).

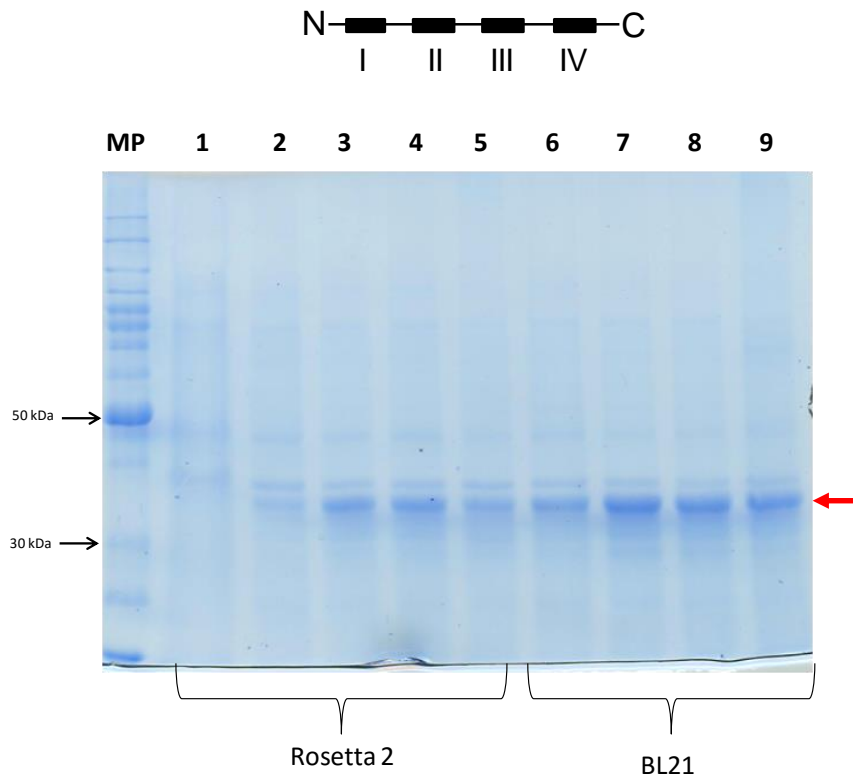


Figura 7. Esquema de AAC y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en *E. coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. **Carriles:** MP, marcador de peso; los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. La flecha roja indica la banda con el PM esperado. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína. El esquema representa AAC con sus cuatro regiones variables marcadas con número romano.

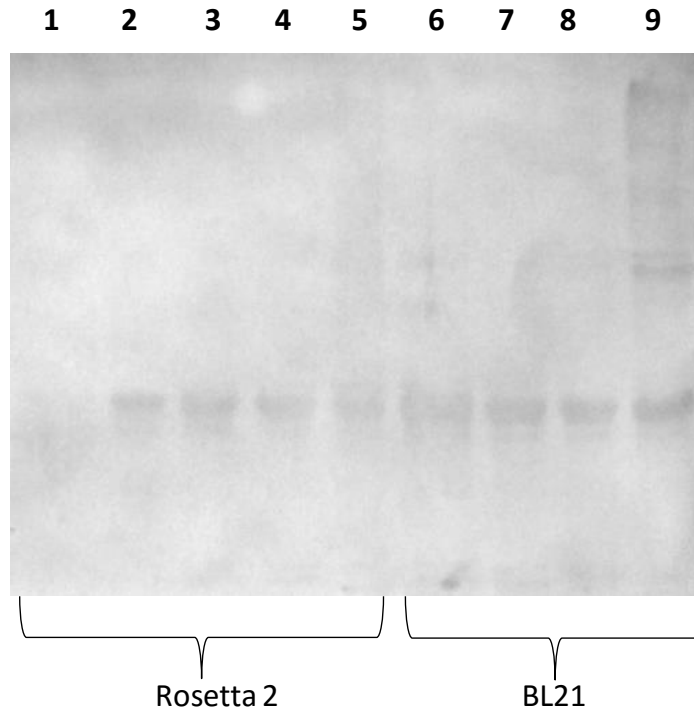


Figura 8. Western blot de la expresión de AAC a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína.

La expresión de la proteína AACM.3 en la cepa Rosetta 2 se mantuvo hasta las 6 h porque a las 24 h de expresión la proteína prácticamente desaparece (Figura 9). En la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL se puede apreciar que la proteína se mantuvo hasta por 24 h aunque la expresión en este tiempo también es menor al compararlo con las primeras horas (carriles 7 y 8). Parece que la tasa de síntesis (al igual que en AAC) disminuye conforme avanza el tiempo probablemente al existir menos nutrientes en el medio de cultivo la síntesis de proteínas recombinantes se ve afectada. Otra razón del efecto en la disminución de la síntesis de la proteína recombinante a las 24 h puede ser la naturaleza de las células porque al comparar solo los carriles que corresponden a 24 h de expresión (carriles 5 y 9) se aprecia la disminución de la expresión en la cepa Rosetta 2 a pesar de que las condiciones de cultivo (medio de cultivo, agitación, temperatura, etc) fueron las mismas para las dos cepas. En el Western blot (Figura 10) se confirma la presencia de la proteína de interés en las dos cepas. También se pueden apreciar en todos los carriles productos de menor peso molecular al de

AACM.3 que probablemente se originen por la hidrólisis de la proteína recombinante.

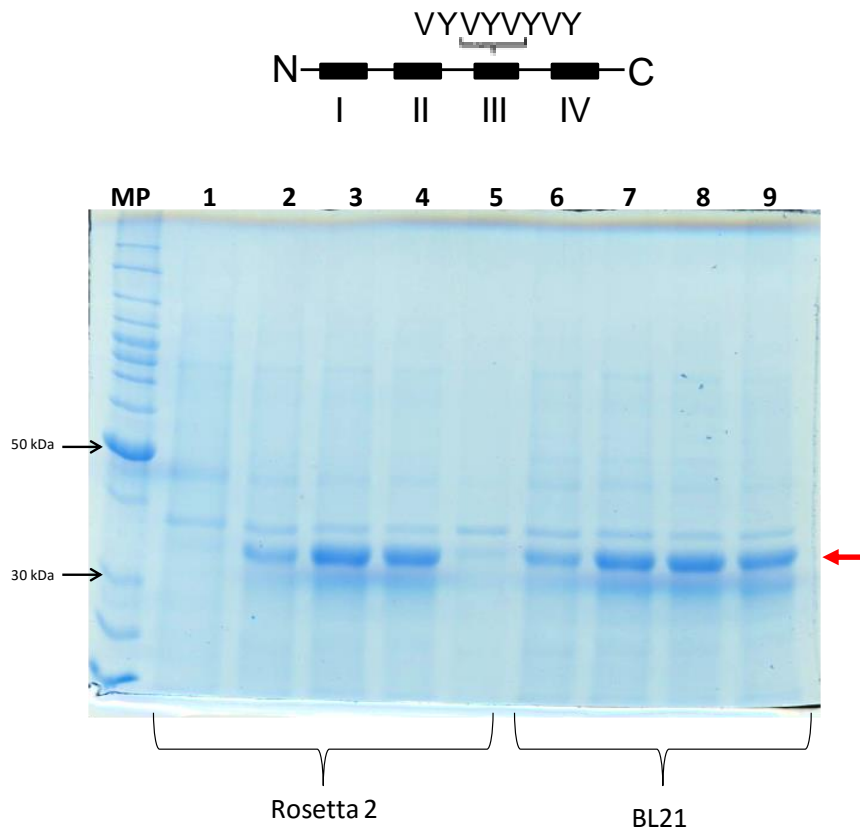


Figura 9. Esquema de AACM.3 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en *E. coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. **Carriles:** MP, marcador de peso; los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. La flecha roja indica la banda con el PM esperado. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína El esquema representa AACM.3 con sus cuatro regiones variables marcadas con número romano y la modificación en la región variable III.

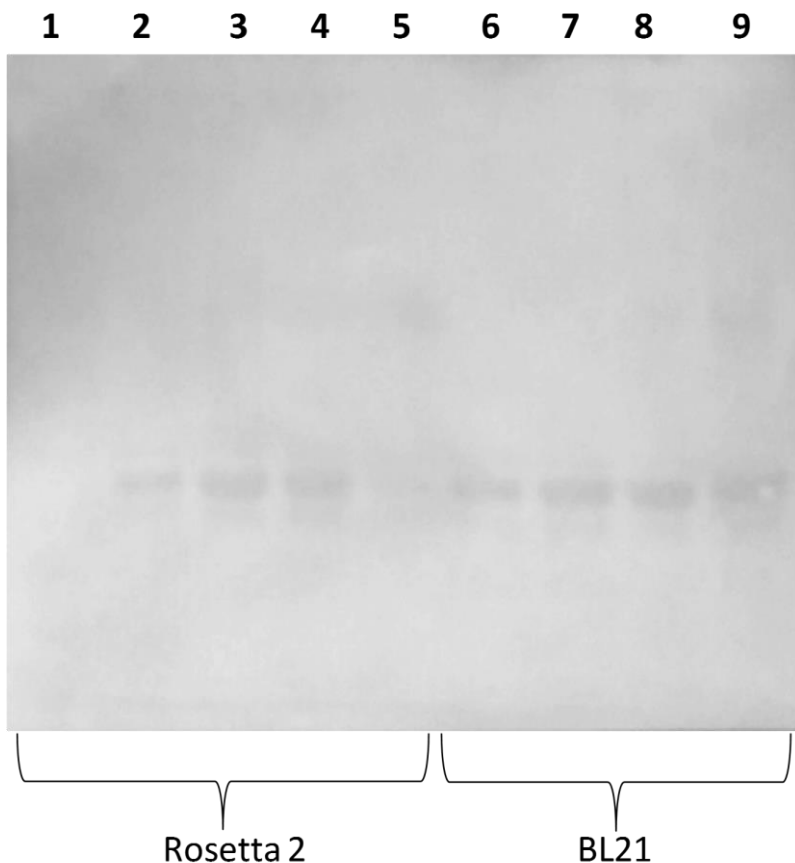


Figura 10. Western blot de la expresión de AACM.3 a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína.

El nivel de expresión de AACM.4 fue similar en las dos cepas de *E. coli* (Figura 11). El Western blot confirmó la expresión de la proteína AACM4 (Figura 12) y, a diferencia de AACM.3 no se observaron productos de menor peso molecular al esperado.

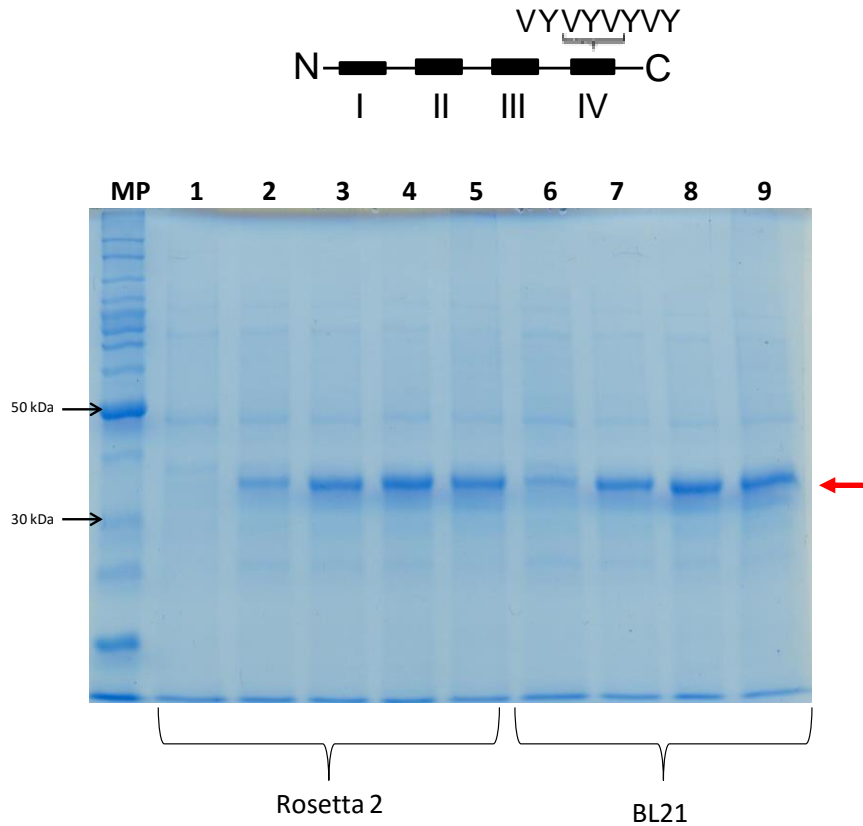


Figura 11. Esquema de AACM.4 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. **Carriles:** MP, marcador de peso. Los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. La flecha roja indica la banda con el PM esperado. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína. El esquema representa a AACM.4 con sus cuatro regiones variables marcadas con número romano y la modificación en la región variable IV.

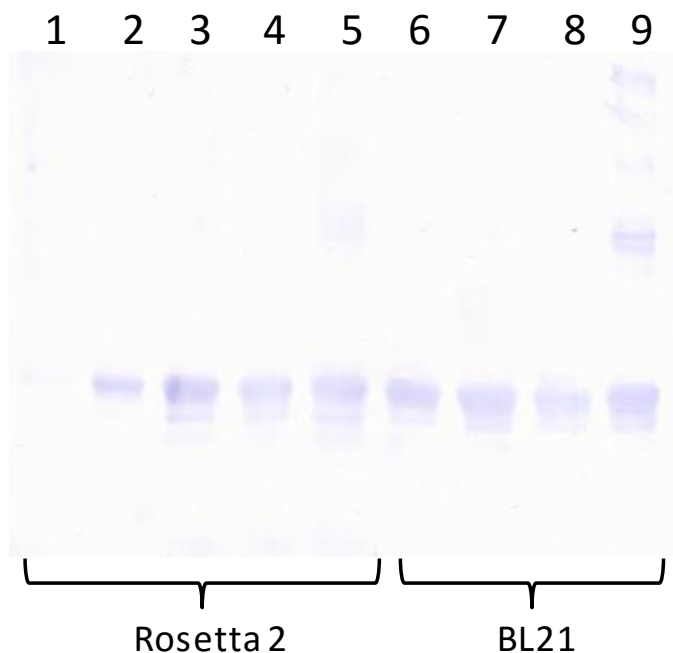


Figura 12. Western blot de la expresión de AACM.4 a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína.

Finalmente, los niveles de expresión de la proteína AACM.3.4 fueron similares en ambas cepas. La cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL expresó una mayor cantidad (Figura 13). La Figura 14, que corresponde al Western blot, confirma la expresión de la proteína AACM.3.4.

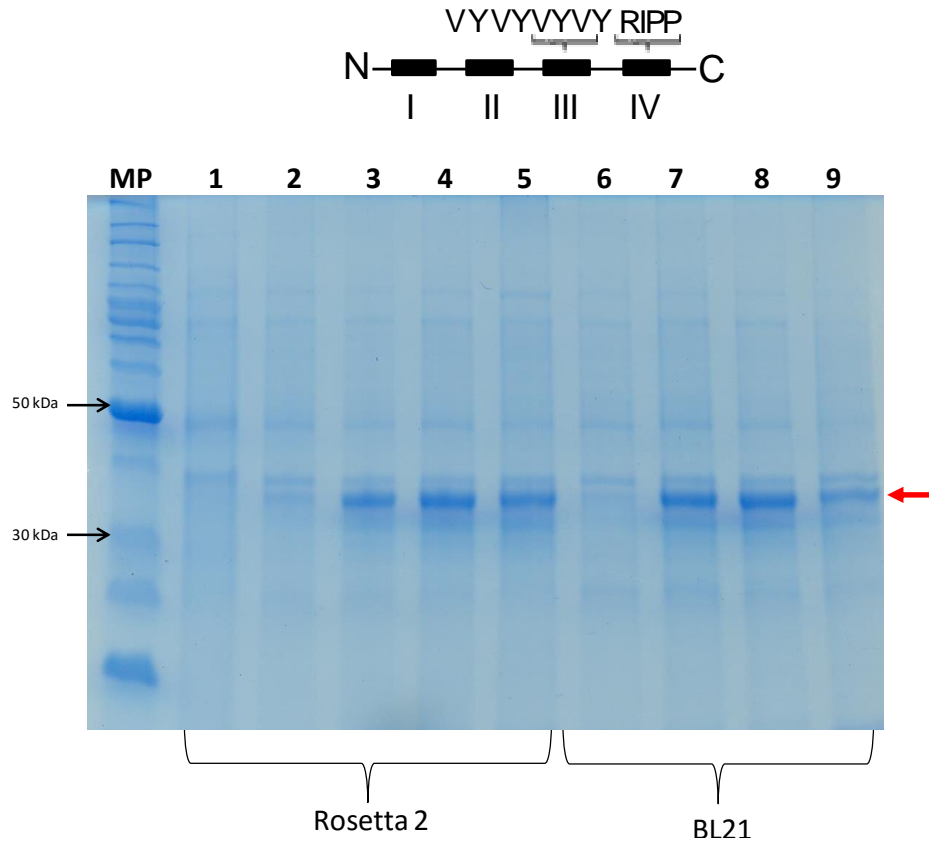


Figura 13. Esquema de AACM.3.4 y SDS-PAGE de su expresión a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. **Carriles:** MP, marcador de peso. Los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. La flecha roja indica la banda con el PM esperado. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína. El esquema representa AACM.3.4 con sus cuatro regiones variables marcadas con número romano y las modificaciones en las regiones variables III y IV.

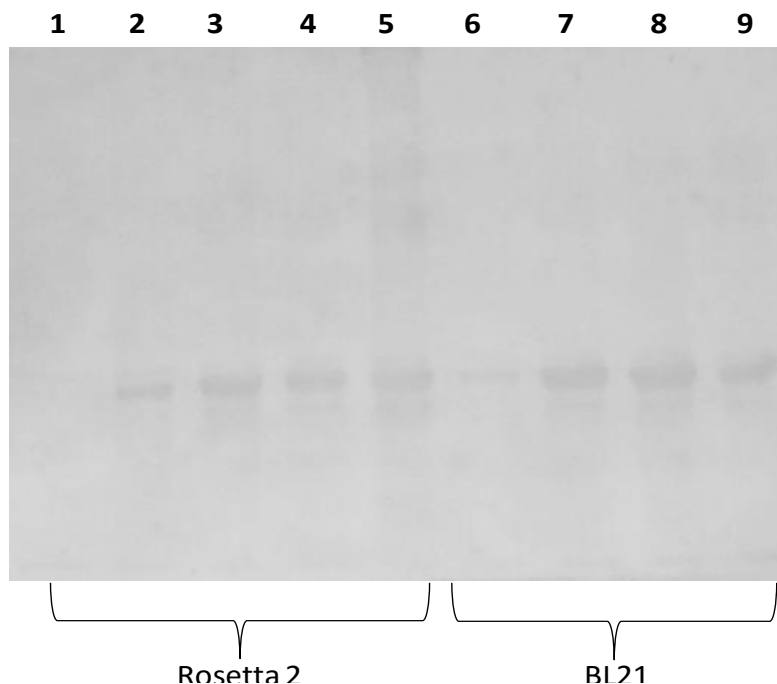


Figura 14. Western blot de la expresión de AACM3.4 a nivel matraz en *E.coli* Rosetta 2 y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. **Carriles: MP**, marcador de peso. Los números de los carriles corresponden a distintos tiempos de expresión en cada una de las cepas: **1**, 0 h; **2 y 6**, 1.5 h; **3 y 7**, 3 h; **4 y 8**, 6 h; **5 y 9**, 24 h. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína. Se cargaron aproximadamente 3 ug de proteína.

La Tabla 8 muestra los rendimientos obtenidos de cada proteína en g/L según la determinación densitométrica a partir de los geles SDS-PAGE que se obtuvieron (Apéndice B). Se observó que en todas las versiones se mantuvo la expresión hasta por 24 h. También es evidente que la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL es la que expresó en mayor cantidad las proteínas recombinantes. Este fenómeno puede ser el resultado de una mayor carga metabólica en Rosetta 2, lo que provoca una alteración bioquímica y fisiológica de las células huésped, lo cual provoca la disminución de la cantidad de proteína heteróloga sintetizada (Chou, 2007; Glick, 1995).

Tabla 8. Expresión de la subunidad ácida de la amarantina y sus versiones modificadas (g/L).

<i>E. coli</i> (cepa)	Proteína	Tiempo de inducción (h)		
		3	6	24
Rosetta 2	AAC	0.28 ^a	0.53 ^c	0.83 ^f
	AACM.3	0.20 ^b	0.46 ^d	0.18 ^k
	AACM.4	0.27 ^a	0.47 ^d	0.71 ^g
	AACM.3.4	0.19 ^b	0.30 ^e	0.48 ^h
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	AAC	0.30 ^a	0.56 ^c	0.95 ⁱ
	AACM.3	0.22 ^b	0.44 ^d	0.69 ^g
	AACM.4	0.33 ^a	0.56 ^c	0.81 ^f
	AACM.3.4	0.20 ^b	0.33 ^e	0.56 ^j

El resultado que se presenta es el promedio de tres ensayos.

Letras diferentes en cada uno de los tiempos indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Al comparar la productividad (g/L*h) de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL para cada proteína recombinante no se observa diferencia significativa entre las 3 y las 6 h de expresión ($p < 0.05$) (Figura 15). Aunque a las 6 h existe una mayor acumulación en el rendimiento obtenido (Figura 16). Por esta razón, a partir de las muestras cosechadas a las 6 h se realizó el análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes. A las 24 h se detectó la menor productividad de todas las proteínas.

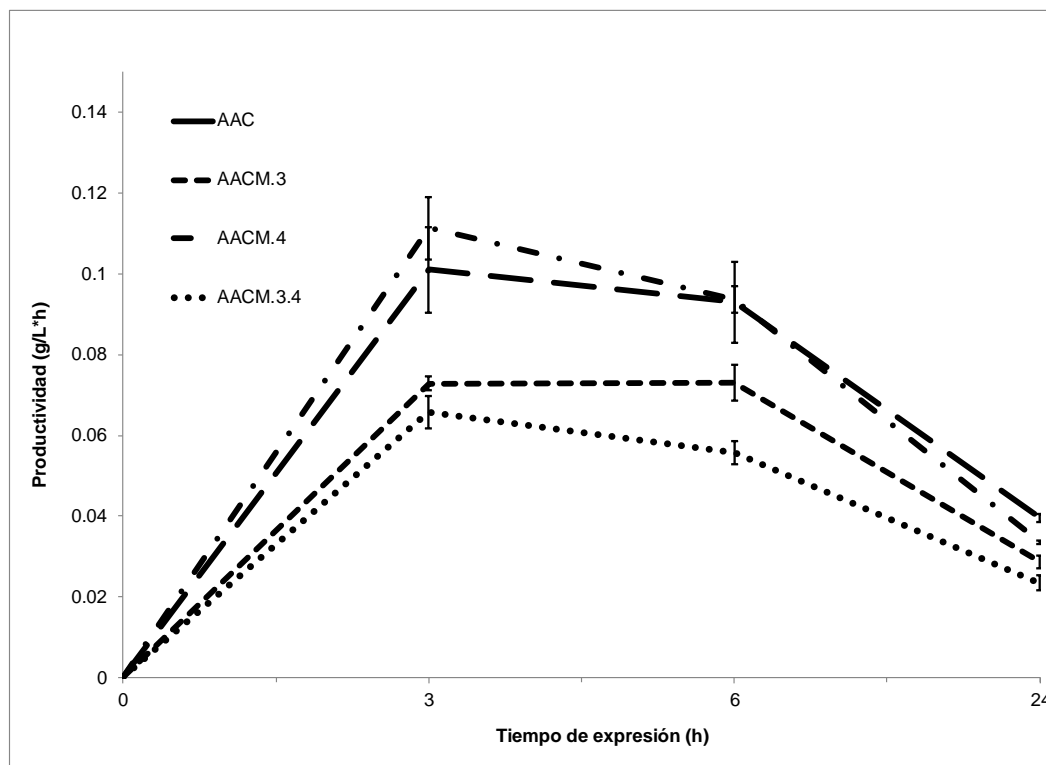


Figura 15. Productividad de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL en la expresión de AAC y de sus versiones modificadas.

En la Figura 16 se puede observar el rendimiento que se obtuvo por la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL para las cuatro versiones de AAC. A las 3 h de expresión no existe diferencia significativa entre AAC y AACM.4; así mismo, AACM.3 y AACM.3.4 no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). Este mismo fenómeno se observa a las 6 h para AAC y AACM.4. En cambio, AACM.3 y AACM.3.4 muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). A las 24 h de expresión todas las versiones muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). Con base en la productividad y en los rendimientos obtenidos se determinó que el mejor tiempo para la expresión es a las 6 h después de la inducción. Los resultados que se obtuvieron para AAC y sus versiones modificadas en esta investigación (entre 300 y 560 mg/L) son mayores a los reportados previamente para AAC, AACM.3 y AACM.3.4 que fueron de 32 mg/L, 60 mg/L y 196 mg/L, respectivamente (Arano-Varela y col., 2012; Luna-Suárez y col., 2008; Luna-Suárez y col., 2010). Este incremento puede ser el resultado de la combinación de distintos factores como la cepa de expresión y el uso de lactosa como inductor, el cual es una fuente extra de carbono que aporta nutrientes para el crecimiento celular y para la síntesis de

proteínas y, que en los estudios previos no se había utilizado (Donovan y col., 1995; Krause y col., 2010; Wang y Zhang, 2009).

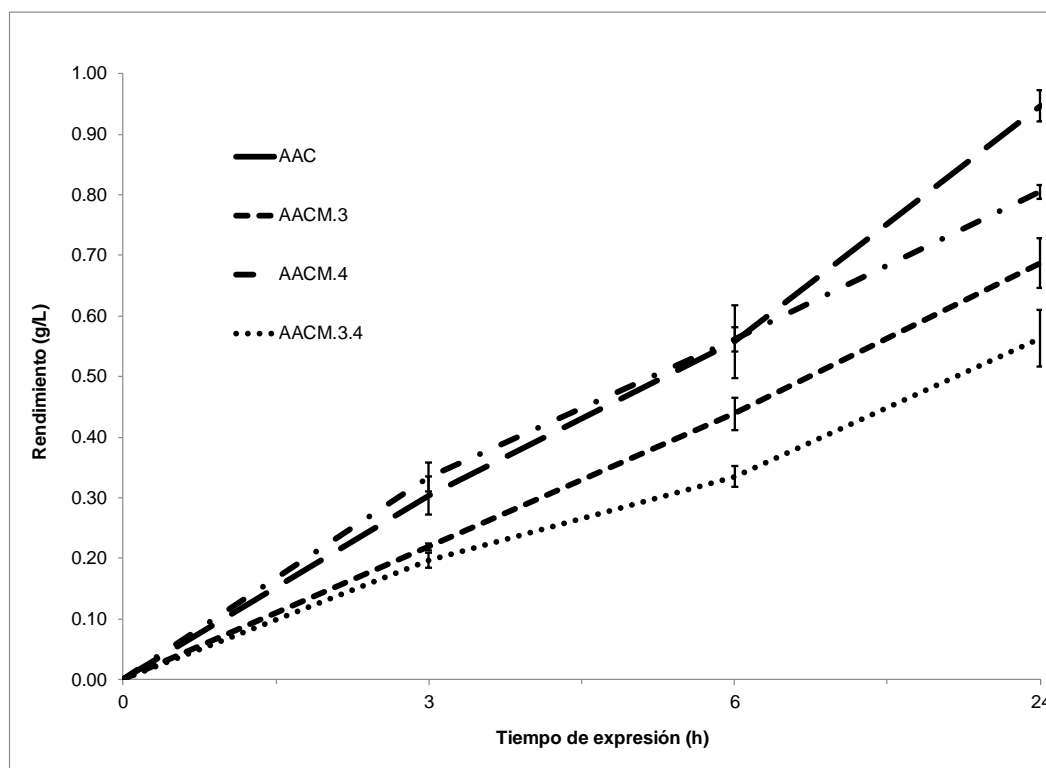


Figura 16. Rendimientos de la expresión de AAC y de sus versiones modificadas.

La acumulación de las diferentes versiones se puede representar en la siguiente expresión:

$$AAC \geq AACM.4 > AACM.3 \geq AACM.3.4$$

Para analizar si las proteínas se acumulaban como cuerpos de inclusión se realizaron las extracciones de las fracciones solubles e insolubles de muestras tomadas a las 6 h de expresión de las diferentes versiones. En las Figuras 17 y 18 se puede observar que todas las proteínas recombinantes se expresan mayoritariamente de forma insoluble o como cuerpos de inclusión en las dos cepas de *E. coli* que se emplearon para la expresión (carriles 2, 4, 6 y 8). En la Figura 18 se puede observar que hay una cantidad de proteína AACM.4 que se expresa de forma soluble (carril 1) pero los niveles son mínimos comparados con la expresión de la misma proteína de forma insoluble. Los resultados mostraron que la subunidad ácida de la amaratina y todas sus versiones se expresan como

cuerpos de inclusión, lo cual coincide con lo reportado previamente (Luna-Suárez y col., 2008; Luna-Suárez y col., 2010; Castro-Martínez y col., 2012). Por otra parte, se ha reportado que la insolubilidad de las proteínas recombinantes es un fenómeno que puede ocurrir por el plegamiento anómalo generado por una tasa elevada de la traducción (Chen y col., 2004). También, en el estudio de la conformación de la glicinina (globulina 11S de soya) se reportó que la interacción de regiones hidrofóbicas provoca la formación de agregados insolubles y para evitar tal situación es importante que se mantenga la integridad del dominio básico de la proteína (Dickinson y col., 1990). Por lo tanto, es probable que al no existir la subunidad básica en AAC y en sus versiones modificadas éstas adopten una conformación anómala.

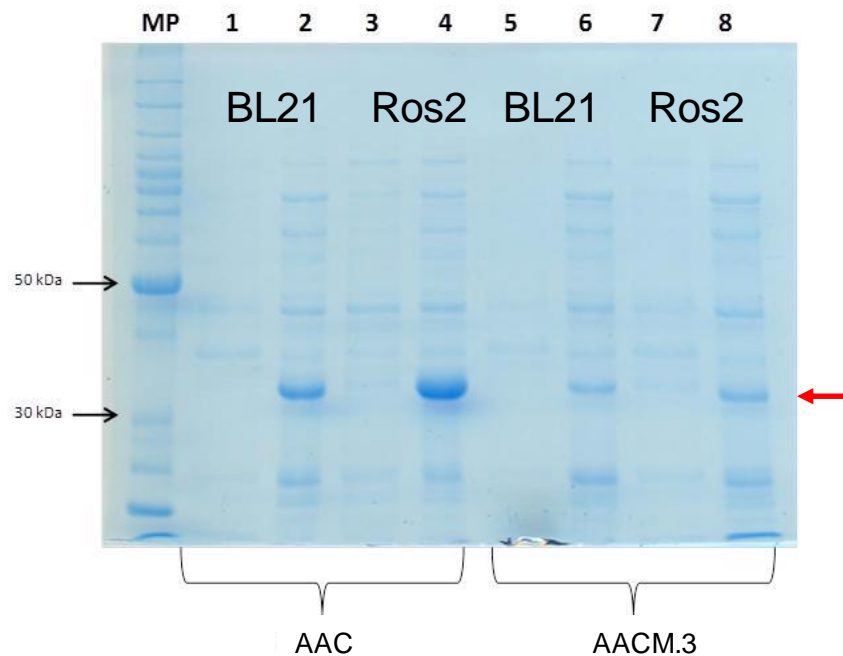


Figura 17. Expresión de AAC y AACM.3 en forma de cuerpos de inclusión. **Carriles:** MP, marcador de peso; **1**, fracción soluble en BL21; **2**, fracción insoluble en BL21; **3**, fracción soluble en Rosetta 2; **4**, fracción insoluble en Rosetta 2; **5**, fracción soluble en BL21; **6**, fracción insoluble en BL21; **7**, fracción soluble en Rosetta 2; **8**, fracción insoluble en Rosetta 2. La flecha roja indica la banda con el PM esperado.

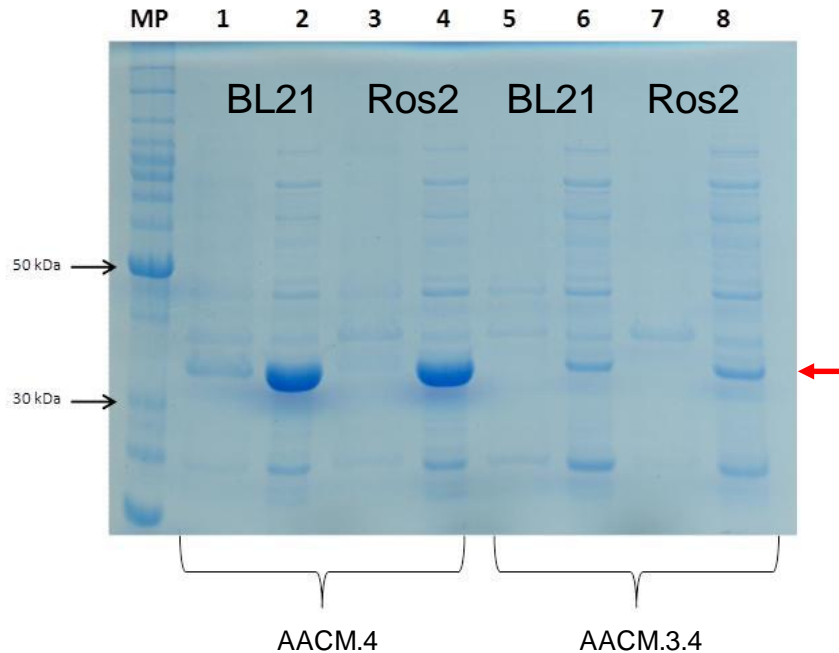


Figura 18. Expresión de AACM.4 y AACM.3.4 en forma de cuerpos de inclusión. **Carriles:** MP, marcador de peso; **1**, fracción soluble en BL21; **2**, fracción insoluble en BL21; **3**, fracción soluble en Rosetta 2; **4**, fracción insoluble en Rosetta 2; **5**, fracción soluble en BL21; **6**, fracción insoluble en BL21; **7**, fracción soluble en Rosetta 2; **8**, fracción insoluble en Rosetta 2. La flecha roja indica la banda con el PM esperado.

3. Expresión a nivel fermentador

Después de la identificación de BL21-CodonPlus(DE3)-RIL como la mejor cepa para la síntesis de AAC y de sus versiones modificadas se realizó la expresión de las proteínas recombinantes a nivel fermentador. Se cosecharon las células que expresaron las proteínas después de 6 h a partir de la inducción con lactosa. Por cada 400 mL de caldo de cultivo (a nivel fermentador) se obtuvo una pastilla de aproximadamente 4 g (peso húmedo). Las cuáles se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

Las proteínas AAC, AACM.1, AACM.2, AACM.3, AACM.4 y AACM.3.4 se expresaron y tras su cuantificación se observó un incremento casi tres veces mayor que en la expresión en matraz. Los resultados mostraron que el rendimiento de AAC fue de $1.6 (\pm 0.09)$ g/L, seguido de AACM.4 con $1.55 (\pm 0.04)$ g/L. Finalmente las proteínas AACM.3 y AACM.3.4 con $1.37 (\pm 0.08)$ g/L y $1.32 (\pm 0.09)$ g/L, respectivamente. Para las proteínas AACM.1 y AACM.2 los rendimientos que se obtuvieron fueron de $1.65 (\pm 0.13)$ g/L and $1.37 (\pm 0.08)$ g/L. Se pudo observar que la

tendencia en la expresión de las proteínas a nivel fermentador se mantuvo con respecto a la expresión a nivel matraz; la siguiente expresión refleja los resultados a nivel fermentador después de 6 h de la inducción:

$$AAC \geq AACM.4 \geq AACM.1 > AACM.2 \geq AACM.3 \geq AACM.3.4$$

Las proteínas con menor nivel de expresión son las que tienen modificaciones en la región variable III (AACM.3 y AACM.3.4) y en la región variable II (AACM.2). AAC, AACM.4 y AACM.1 mostraron los mayores rendimientos y no mostraron diferencia significativa a las 6 h de expresión ($p < 0.05$). El incremento en los rendimientos que se obtuvieron en el fermentador puede ser el resultado de una mejor distribución del oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Como consecuencia del mantenimiento constante de la aireación y la agitación a lo largo del proceso de fermentación lo cual incrementa la síntesis de proteínas recombinantes (Rosano y Ceccarelli, 2014).

El análisis de la solubilidad de AAC y sus versiones modificadas mostró que todas las proteínas se expresan como cuerpos de inclusión. En la Figura 19 se presenta el gel SDS-PAGE de los extractos solubles e insolubles de cada una de las proteínas recombinantes expresadas por BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Al igual que en matraz, todas las versiones de AAC se expresaron de forma insoluble. Se ha establecido que una proteína modificada es estable si su solubilidad y sus niveles de expresión en *E. coli* son similares a los niveles y solubilidad de la proteína nativa (Gidamis y col., 1995; Utsumi y col., 1993). En ese sentido, de acuerdo a los niveles de expresión y a solubilidad de las proteínas recombinantes, AAC presentó la mayor estabilidad seguida de AACM.4 y AACM.1. Las proteínas menos estables fueron AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4.

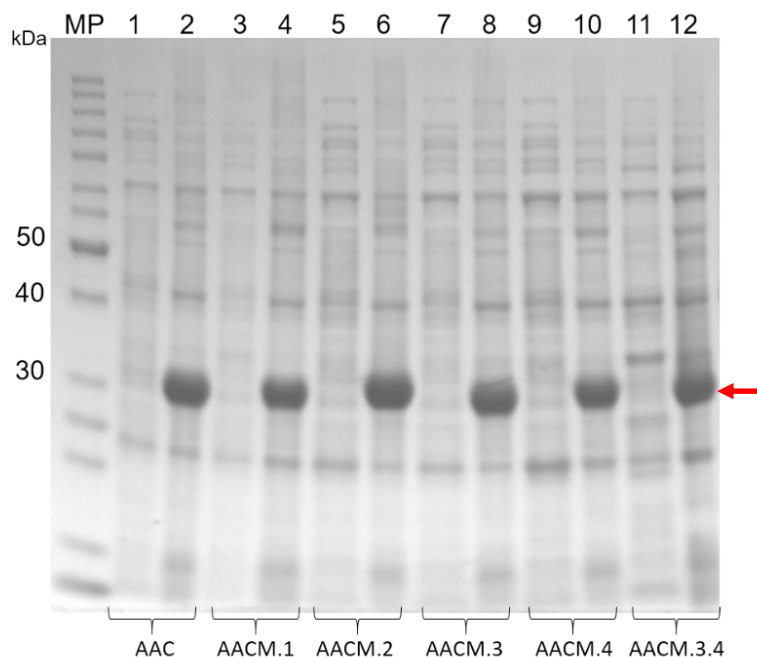


Figura 19. Análisis de la solubilidad de AAC y de sus versiones modificadas. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1, 3, 5, 7, 9 y 11**, fracciones solubles; **2, 4, 6, 8, 10 y 12**, fracciones insolubles. En las fracciones insolubles se cargaron aproximadamente 5 ug de proteína. La flecha roja indica la banda con el PM esperado.

4. Purificación y replegamiento de las proteínas recombinantes

Los extractos insolubles aislados a partir de las pastillas celulares cosechadas a las 6 h de expresión se trataron con urea (6 M) para solubilizar las proteínas recombinantes. Posteriormente, se inyectaron 5 mL a la columna empacada con la resina Protino Ni-TED. Para ilustrar el proceso de purificación de AAC en la Figura 20 se presenta el cromatograma que se obtuvo.

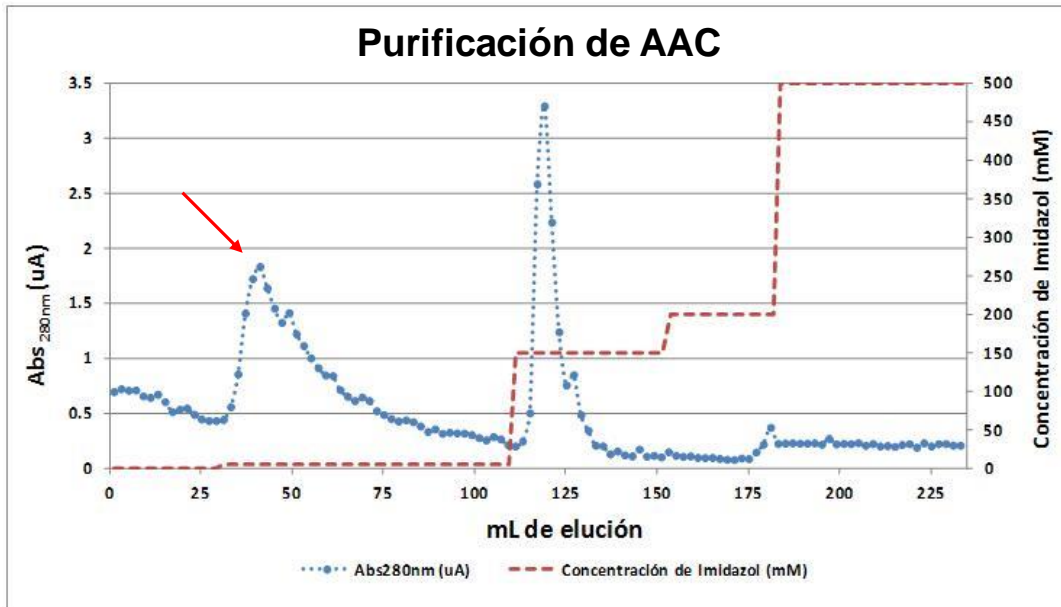


Figura 20. Cromatograma de la purificación de AAC.

En el cromatograma sobresalen dos picos los cuáles son un indicio de la existencia de proteína. El primero se encontró entre la fracción 31 a 100 y corresponde a la elución con 5 mM de imidazol; el segundo pico, que comprende de la fracción 111 a la 133, corresponde a la elución con 150 mM de imidazol. Al analizar mediante SDS-PAGE las fracciones colectadas se observó que AAC eluyó con un mayor grado de pureza en 5 mM de imidazol (Figura 21), es decir, en el primer pico que se observa en el cromatograma (Figura 20). La presencia de la proteína de interés en las muestras colectadas se confirmó mediante análisis tipo Western blot (Figura 22).

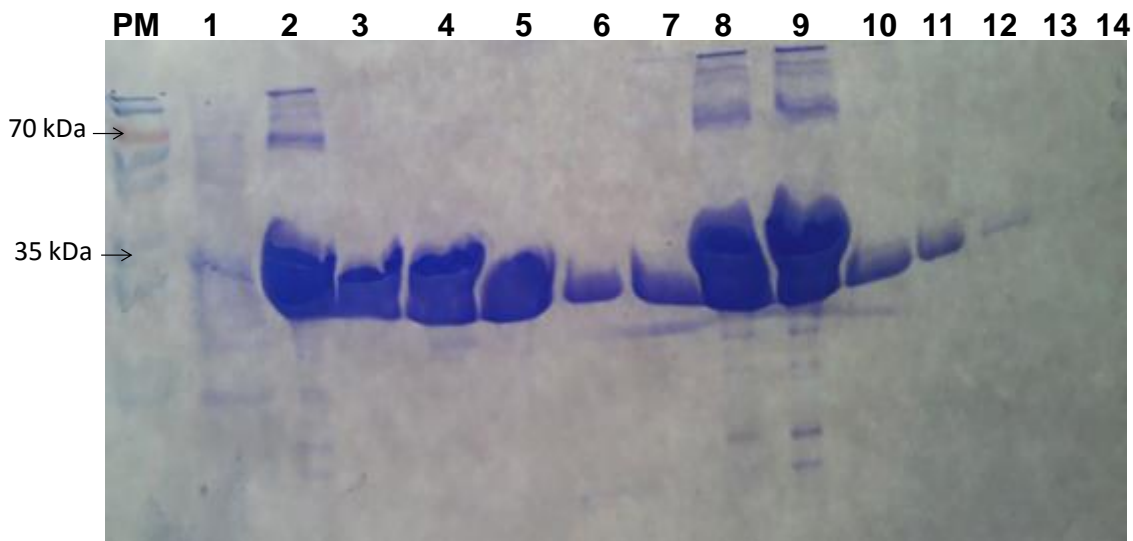


Figura 21. Análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de AAC. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1**, volumen muerto; **2**, fracción 121; **3 a 7**, fracciones que corresponden al primer pico en el cromatograma 35; **8 a 13**, fracciones que corresponden al segundo pico en el cromatograma **14**, fracción final (500 mM imidazol).



Figura 22. Western blot de las fracciones colectadas durante la purificación de AAC. **Carriles:** MP, marcador de peso molecular; **1**, volumen muerto; **2**, fracción 121; **3 a 7**, fracciones que corresponden al primer pico en el cromatograma 35; **8 a 13**, fracciones que corresponden al segundo pico en el cromatograma **14**, fracción final (500 mM imidazol).

En el cromatograma de la purificación de AACM.3.4 se observa que sobresalen dos picos al igual que en AAC. El primero, entre la fracción 15 a la 35 que corresponde a 5 mM de imidazol y, el segundo, entre las fracciones 56 a 73 que eluyó a una concentración de 150 mM de imidazol (Figura 23).

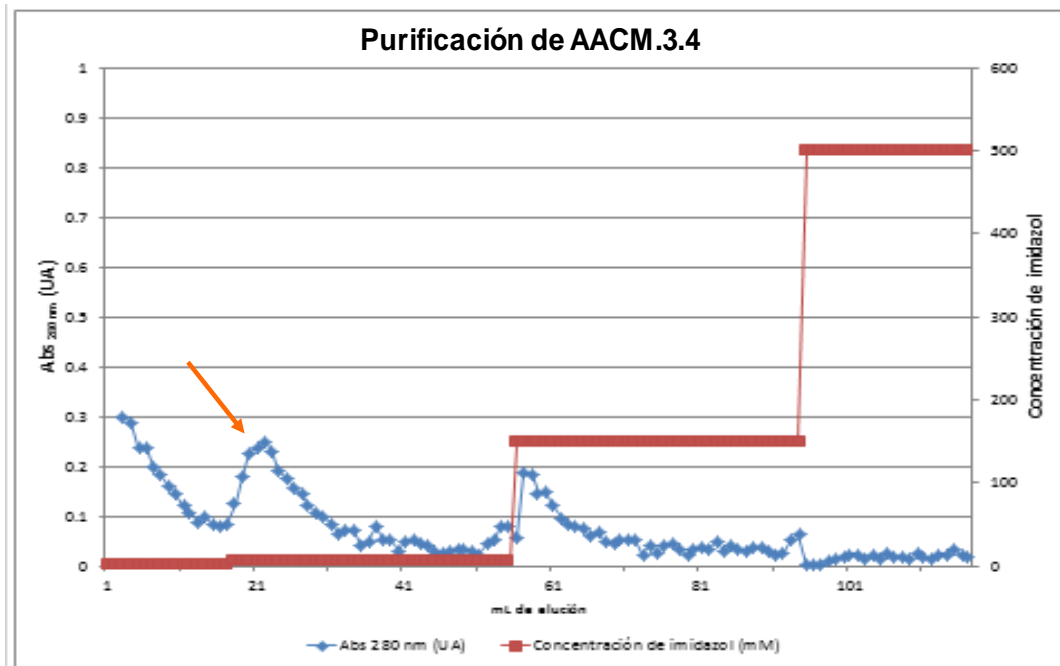


Figura 23. Cromatograma de purificación de AACM.3.4.

El análisis SDS-PAGE de las fracciones colectadas (Figura 24) reveló que AACM.3.4 se obtuvo en menor cantidad con respecto a la proteína sin modificar (AAC) probablemente porque el péptido RIPP que se encuentra en la región C-terminal de AACM.3.4 bloquea la interacción que se debe establecer entre el epítipo de histidinas y el níquel de la resina. Por lo tanto, la cantidad de proteína que se logra purificar es menor. La proteína AACM.3.4 eluyó a una concentración de 5 mM de imidazol al igual que AAC.

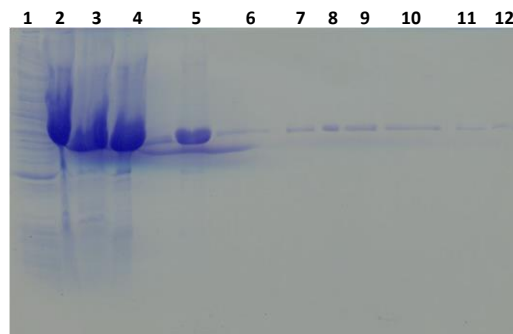


Figura 24. Análisis de las fracciones colectadas durante la purificación de AACM.3.4. **Carriles:** 1, proteína soluble; 2, proteína insoluble; 3, proteína insoluble (repetición), 4, proteína insoluble filtrada; 5, proteína no pegada; 6 a 12, fracciones que corresponden al primer pico en el cromatograma.

El proceso de purificación no fue similar en todas las proteínas recombinantes, es decir, no todas las proteínas eluyeron a la misma concentración de imidazol. La proteína AACM.3 eluyó a 50 mM de imidazol; en cambio, las proteínas AACM.1, AACM.2 y AACM.4 eluyeron a 125 mM de imidazol. Las proteínas puras se presentan en la Figura 25. El resto de los cromatogramas y su correspondiente análisis SDS-PAGE se presenta en el Apéndice C.

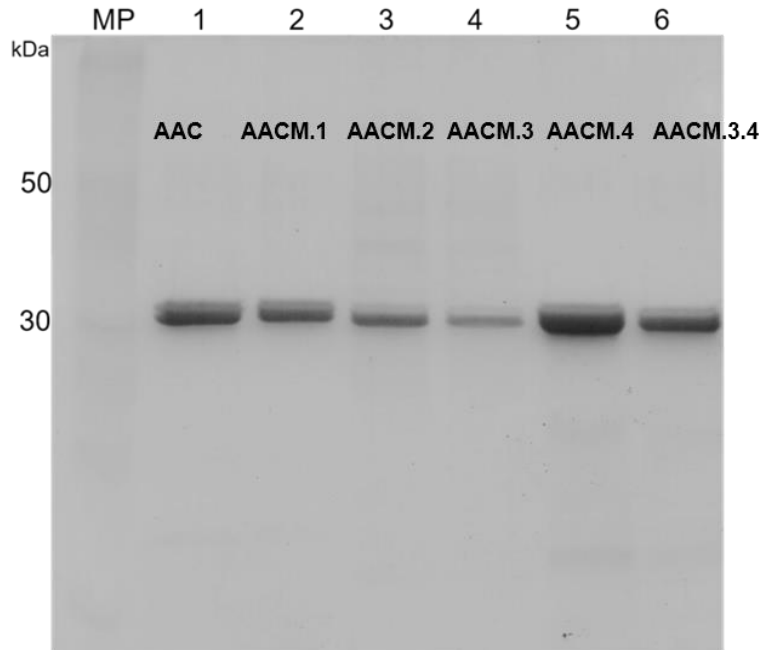


Figura 25. SDS-PAGE de AAC y sus versiones purificadas.

Después de purificar cada proteína, se les aplicó el protocolo de replegamiento. El proceso se realizó mediante diálisis y con ello se eliminó la urea de las fracciones puras de las proteínas recombinantes. Para estandarizar el proceso de replegamiento, se probaron dos amortiguadores (amortiguador fosfatos y amortiguador acetatos); los resultados indicaron que el amortiguador fosfatos (0.02 M fosfatos pH 7.5, 0.2 M NaCl) es la mejor opción al permitir la recuperación del 20% de AAC (Figura 22). En cambio, el proceso con el amortiguador acetatos pH 4.2 (0.02 M acetatos, 0.2 M NaCl), resultó en la formación de agregados de AAC con nula recuperación de la proteína de forma soluble (Tabla 8).

El resultado del replegamiento de AACM.3.4 con el amortiguador fosfatos permitió la recuperación del 30% de proteína en forma soluble. Mientras que, de

forma similar con AAC, la recuperación de AACM.3.4 fue nula con el amortiguador acetatos.

La proteína AACM.4 fue la que se recuperó en mayor cantidad de forma soluble, a diferencia de AACM.3 que se recuperó en menor proporción. Las proteínas AACM.1 y AACM.2 se recuperaron en una proporción del 23% y 21%, respectivamente. Ninguna proteína se recuperó de forma soluble con el amortiguador acetatos (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del replegamiento de AAC y sus versiones modificadas.

Proteína	Replegamiento en fosfatos	Replegamiento en acetatos
	(pH 7.5) (%)	(pH 4.2) (%)
AAC	20	> 1
AACM.1	23	> 1
AACM.2	26	> 1
AACM.3	18	> 1
AACM.4	35	> 1
AACM.3.4	30	> 1

El resultado electroforético de las proteínas puras y replegadas se presenta en la Figura 26. A partir de estas muestras se realizó la caracterización de AAC y de sus versiones modificadas. Los resultados en los niveles de expresión de cada proteína, las diferencias en el proceso de purificación y en el proceso de replegamiento son consecuencia de las modificaciones realizadas en cada versión de AAC porque todas las proteínas se trataron bajo los mismos protocolos el y a pesar de ello resultado fue distinto en cada una.

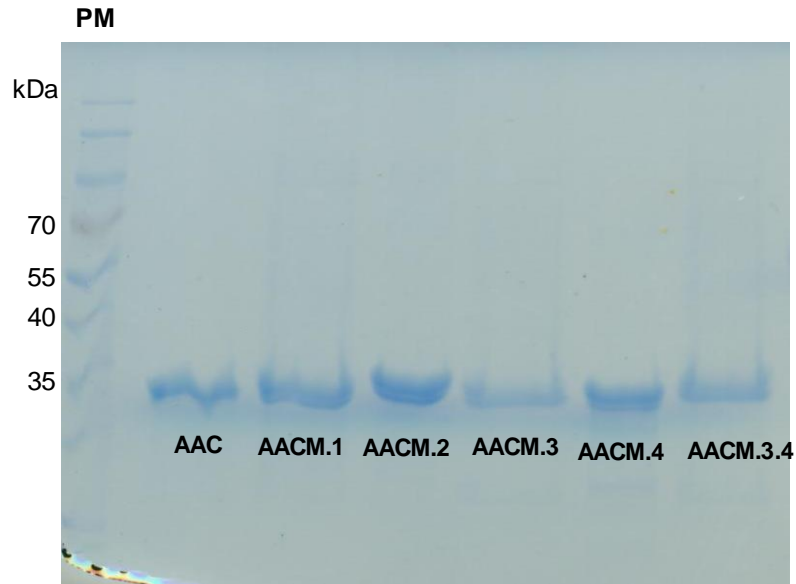


Figura 26. Proteínas recombinantes puras y replegadas en amortiguador fosfatos (0.2 M NaCl, 0.02 M fosfatos pH 7.5).

Al eliminar la urea de las muestras de proteína pura se generan interacciones no covalentes entre las mismas moléculas (entre superficies hidrofóbicas expuestas) y esto genera la formación de agregados (Clark, 2001; Yamaguchi y Miyazaki, 2014). Por lo tanto, en el proceso de replegamiento con el amortiguador acetatos existe una mayor cantidad de estas interacciones y en consecuencia nula recuperación de las proteínas recombinantes. Además, durante el proceso de diálisis con este amortiguador existe una transición en el pH del medio (de pH 7.5 a 4.2); probablemente este cambio, en algún momento del proceso de diálisis coincide con el punto isoeléctrico de las proteínas recombinantes causando también la formación de agregados insolubles.

Mediante la remoción gradual del desnaturizante se pueden alcanzar altos niveles de proteína replegada (Tsumoto y col., 2003; Umetsu y col., 2003), por tal motivo, al incluir varias etapas durante el proceso de replegamiento se logró la recuperación de AAC y sus versiones modificadas con el amortiguador fosfatos. Las proporciones finales de proteína recuperada mediante el amortiguador fosfatos son comparables a lo reportado por Zhi y col. (1992) que recuperaron del 3 al 40% de la enzima citrato sintasa. Este grupo probó distintas condiciones de diálisis para eliminar la urea y con ello permitir su replegamiento. La duración de

los tratamientos que reportan tuvo una duración de uno a dos días, lo cual es de dos a cuatro veces más tiempo que en el tratamiento con fosfatos pH 7.5 que se aplicó para el replegamiento de AAC y sus versiones modificadas en este trabajo.

5. Anticuerpos para la detección de AAC y sus versiones modificadas

La inmunización se realizó con la proteína AAC replegada en amortiguador fosfatos. Se recuperaron aproximadamente 60 mL de suero inmune y se realizaron los ensayos de detección inmunológica. Los resultados mostraron que una dilución 1:90,000 (volumen de anticuerpo:volumen de buffer) es suficiente para observar la presencia de la proteína de interés, esto es, aproximadamente 30% menos anticuerpo que lo reportado por Osuna-Castro y col. (2000) para la detección de la amarantina. En la Figura 27 se muestran los resultados.

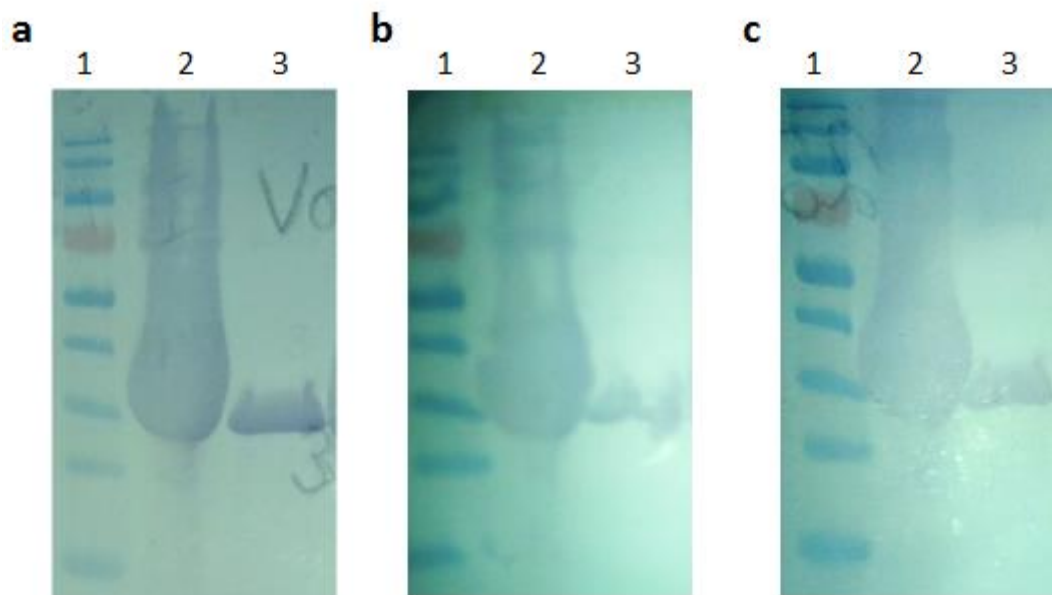


Figura 27. Western blot obtenidos a diferentes diluciones de anticuerpo primario. **a**, 1:30,000; **b**, 1:60,000; **c**, 1:90,000.

6. Caracterización espectroscópica de las proteínas recombinantes

6.1 Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca se obtuvieron con las proteínas puras y replegadas. Se compararon los espectros de cada proteína antes y después del replegamiento para observar si el replegamiento tiene un efecto sobre la conformación de AAC y sus versiones mutantes, es decir, se

comparó la longitud de onda de máxima emisión (λ_{\max}) de la proteína desnaturalizada (con urea) con la λ_{\max} de la misma proteína después de eliminar la urea (Figura 28).

Los espectros de las proteínas desnaturalizadas y replegadas mostraron diferencias en la λ_{\max} . En las proteínas replegadas la λ_{\max} se encuentra desplazada hacia longitudes de onda menores (Figura 28, véase cuadros azules), mientras que, la λ_{\max} de las proteínas desnaturalizadas se encuentra en regiones de mayor longitud de onda (Figura 28, véase círculos rojos). En general se puede observar que los espectros no presentan un comportamiento gaussiano; esto puede ser el resultado de una mayor exposición a un ambiente hidrofílico de al menos uno de los tres triptófanos que se encuentran en las proteínas estudiadas. Esto, provoca la emisión de un pico separado de la señal más intensa (340 nm); o bien, en las muestras existen distintas especies proteicas, es decir, proteína estructurada con diferentes formas que generan una emisión aproximada a 360 nm (Khatib y col., 2005)

En la Tabla 10 se describe el máximo de emisión para cada proteína de acuerdo a sus espectros de fluorescencia. La mayor diferencia se presentó en la proteína AAC porque existen 16 nm entre la condición replegada y desnaturalizada; la proteína AACM.3 mostró la menor diferencia entre las dos condiciones y el resto, presentó diferencias de entre 6 y 9 nm.

Tabla 10. Parámetros determinados mediante espectroscopía de fluorescencia.

Proteína	λ_{\max} replegada (nm)	λ_{\max} desnaturalizada (nm)	CEM replegada (nm)	CEM desnaturalizada (nm)	Área expuesta de Trp ⁺ (A ²)
AAC	337	353	350.4	358.6	225.1
AACM.1	334	340	348	354.4	122.9
AACM.2	337	344	350.4	356.1	380.3
AACM.3	342	345	350.9	356.5	280.2
AACM.4	340	348	348.1	356.8	236.9
AACM.3.4	341	350	351.6	356.9	227.6

La longitud de onda de excitación en los experimentos de fluorescencia fue de 295 nm.

+ A partir de los modelos obtenidos se determinó el área de los 3 Trp expuesta al solvente en cada una de las proteínas

Es sabido, que los residuos de triptófano (Trp) por sus propiedades espectroscópicas y su carácter hidrofóbico se usan como reporteros para obtener información estructural y conformacional de proteínas mediante espectroscopía de fluorescencia. Los triptófanos por su hidrofobicidad tienden a formar parte del núcleo hidrofóbico de la proteína y su exposición a un ambiente hidrofílico provoca la emisión de fluorescencia a longitudes de onda mayores. Cuando una proteína se desnaturaliza, se propicia la pérdida de la conformación y con ello la exposición de los Trp a un ambiente polar, por lo tanto, la λ_{\max} se desplaza hacia longitudes de onda mayores (Moon y Fleming, 2011; So y Dong, 2002). En ese sentido, por las diferencias en la λ_{\max} entre la condición desnaturalizada y replegada, se puede decir que el protocolo de replegamiento permitió que las proteínas recombinantes adoptaran una conformación con los triptofanos parcialmente escondidos del solvente.

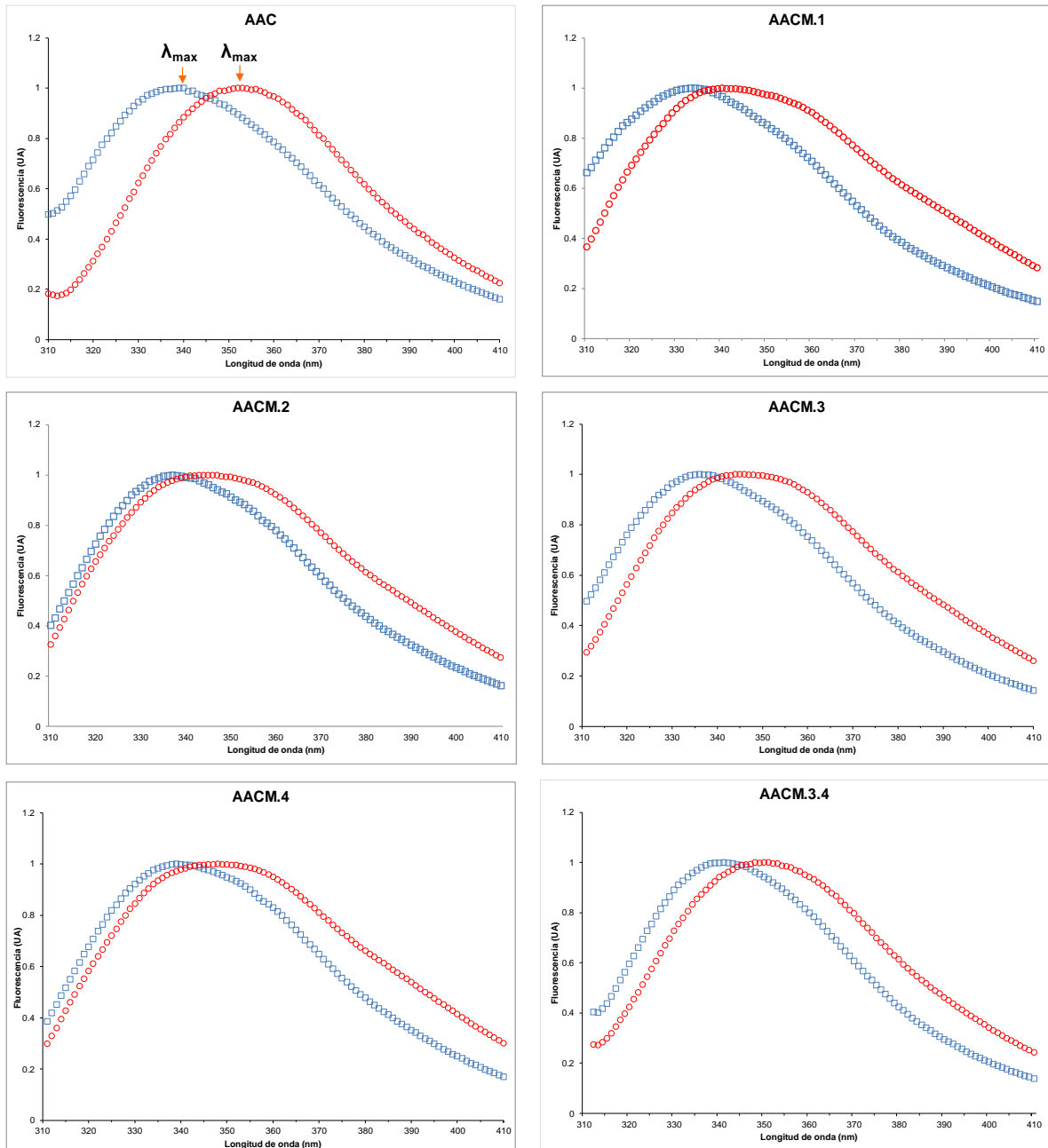


Figura 28. Espectros de fluorescencia antes y después del protocolo de replegamiento. Espectros en cuadros azules corresponden a las proteínas replegadas y espectros en círculos rojos corresponden a las proteínas desnaturalizadas. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm.

Al comparar los espectros de fluorescencia de AAC y de sus versiones modificadas se pueden observar diferencias como resultado de los distintos arreglos conformacionales adoptadas por las proteínas (Figura 29).

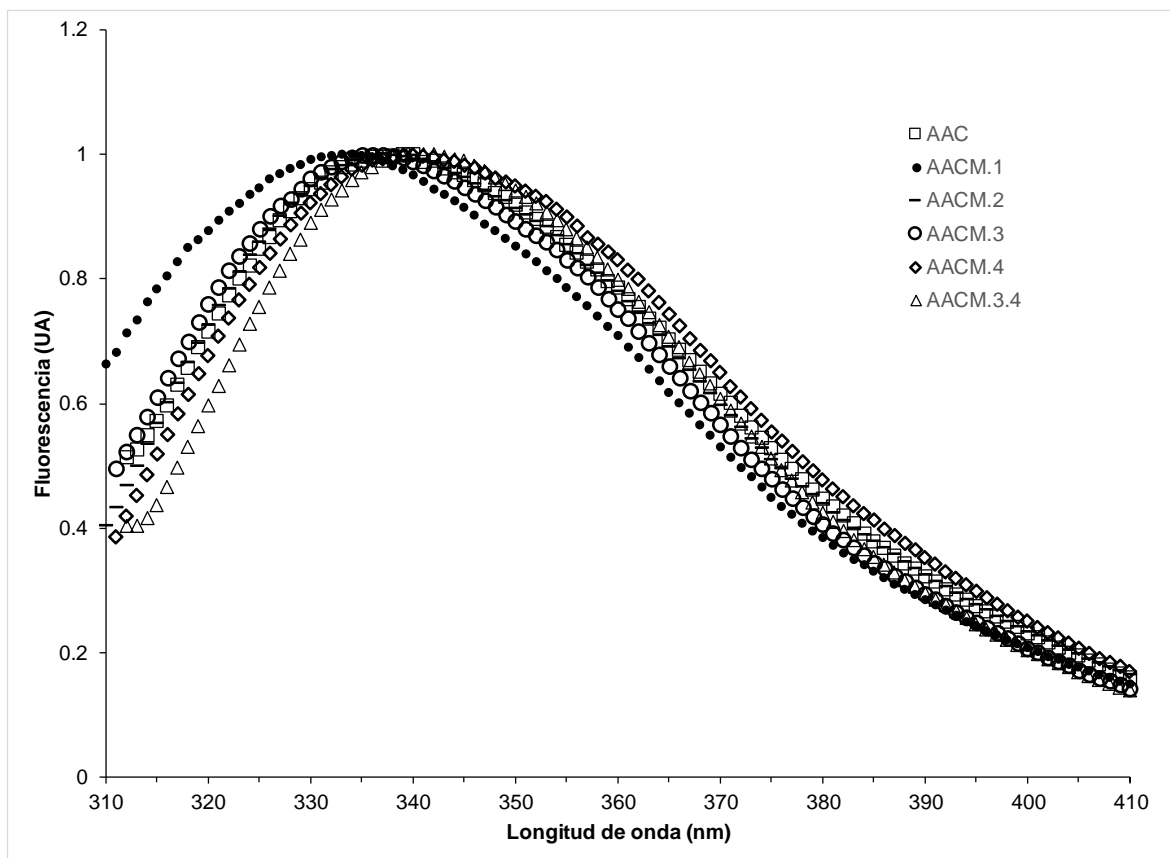


Figura 29. Espectros de fluorescencia de AAC y sus versiones modificadas. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm.

En la Figura 29, se observa que el espectro de la proteína AACM.1, se encuentra desplazado a la izquierda, probablemente porque adopta una conformación con menor exposición de sus Trp al medio acuoso y/o porque adquiere una conformación más compacta que el resto de las proteínas, lo que genera una señal de fluorescencia a menores longitudes de onda. El resto de las proteínas presentó un espectro con mayor similitud entre ellas, posiblemente porque sus Trp tienen un grado similar de exposición al medio acuoso.

A partir de los datos colectados en los ensayos de fluorescencia, se calculó el *CEM*, los resultados se muestran en la Tabla 9. El *CEM* fue menor en las proteínas AACM.1 y AACM.4; contrario a esto, las proteínas modificadas en la región variable III (AACM.3 y AACM.3.4) mostraron el mayor *CEM*, con base en estos resultados, es probable que AACM.3 y AACM.3.4 tengan una conformación más distendida y, por lo tanto, exista mayor exposición de sus Trp al medio hidrofílico. La proteína nativa AAC y la mutante AACM.2 tienen el mismo *CEM*,

probablemente porque el inserto VYVYVYVY en AACM.2 no genera modificaciones que cambien el grado de exposición de sus Trp con respecto a los Trp de AAC. A partir de los modelos obtenidos se calculó el área de los Trp expuesta al solvente y, como se puede observar en la Tabla 9, el modelo de la proteína AACM.1 es el que tiene menor área expuesta, seguido de los modelos de las proteínas AAC, AACM.4 y AACM.3.4. Los modelos de AACM.3 y AACM.3.4 son los que tienen mayor área expuesta de sus Trp. De acuerdo a estas observaciones y con base a los espectros obtenidos es posible que la proteína AACM.1 adopte una conformación más compacta.

6.2 Espectroscopía de dicroísmo circular

Los experimentos de DC también mostraron diferencias espectrales entre la condición replegada y desnaturalizada de las proteínas recombinantes (Figura 30). Esto coincide con las diferencias detectadas mediante espectroscopía de fluorescencia; por lo tanto, el protocolo de replegamiento permite que todas las proteínas adquieran cierta conformación al eliminar la urea. Los espectros de proteína replegada (línea azul) mostraron la máxima intensidad en la señal de DC entre 203 y 208 nm.

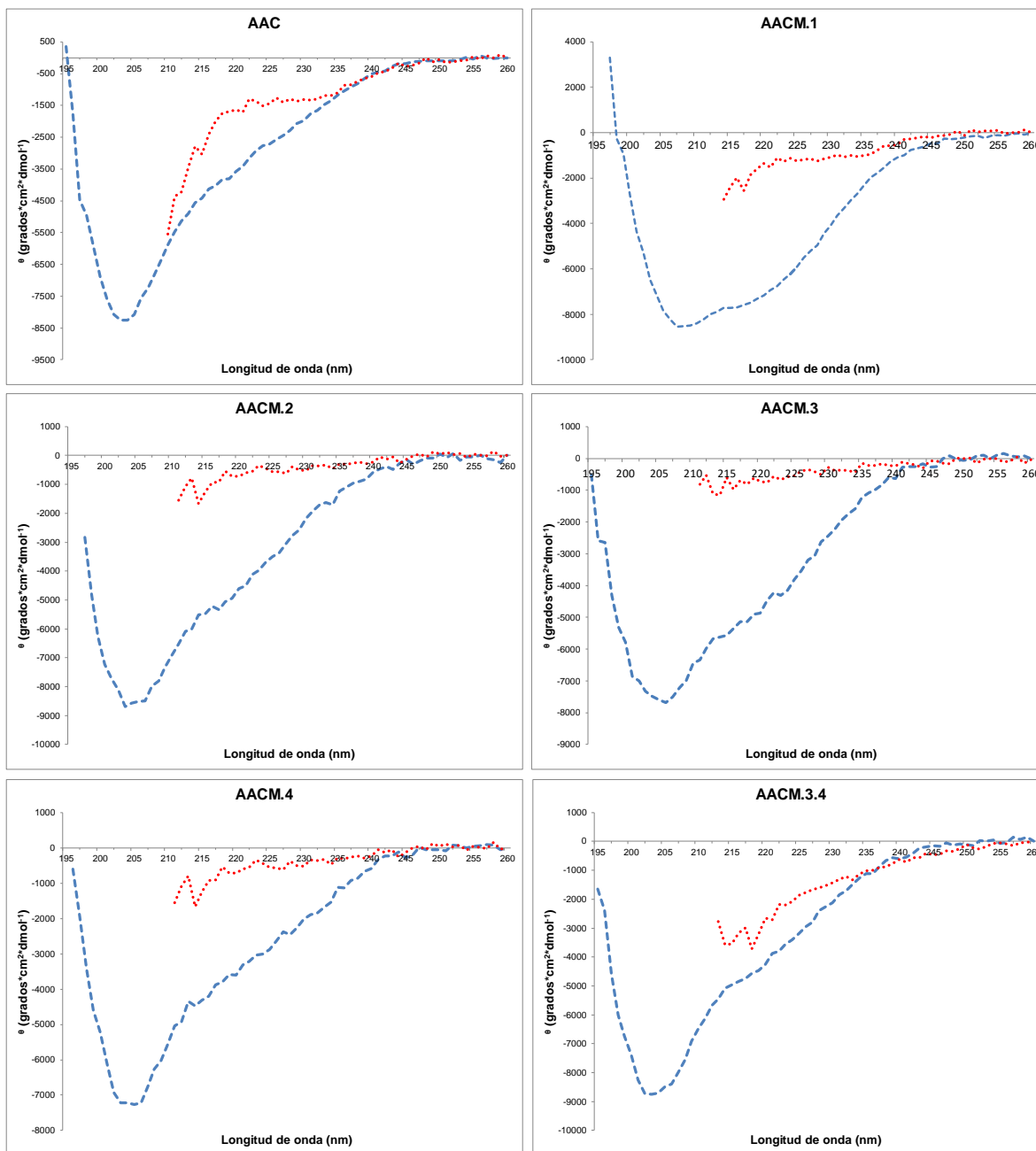


Figura 30. Espectros de DC antes y después del repliegamiento.

Los espectros de AAC y sus versiones modificadas presentan diferencias entre ellos como resultado de las distintas conformaciones que adopta cada proteína (Figura 31). En todos los espectros se observa una banda entre 215 y 235 nm, es evidente que en AACM.1 esta característica es más prominente. La proteína nativa AAC y la modificada AACM.4 siguen un trazo muy similar en el espectro de

DC. Esta misma característica se aprecia en los espectros de las proteínas modificadas AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4.

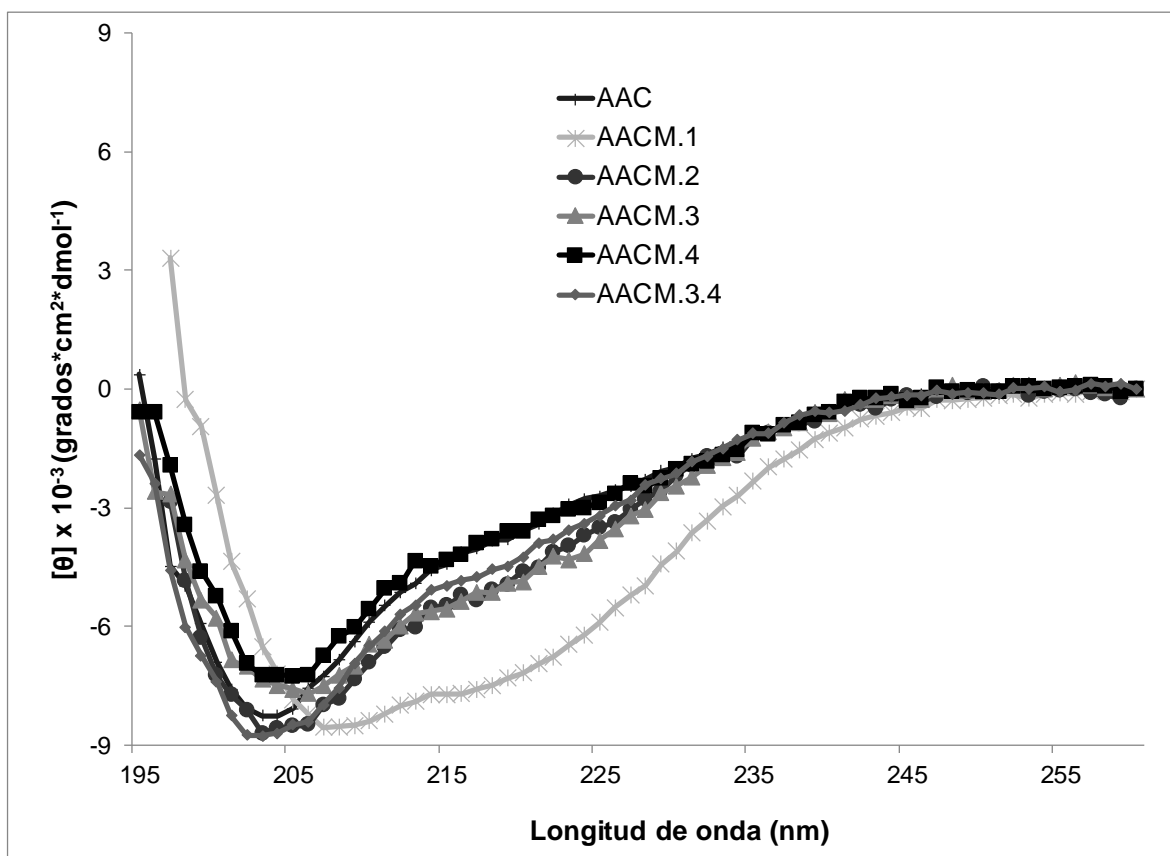


Figura 31. Espectros de DC de AAC y sus versiones modificadas.

Los datos colectados mediante los ensayos de DC se utilizaron para determinar el contenido de estructura secundaria con el servidor Dichroweb, para esto, se analizaron los datos con distintos programas. El programa CDSSTR fue el que mejor se ajustó a los datos colectados (Apéndice D). La proteína modificada AACM.1 presentó el mayor contenido de estructura secundaria tipo hélice y menor proporción en asas y giros. El contenido de estructura secundaria de la proteína nativa AAC y de la proteína modificada AACM.4 es muy similar; de acuerdo a la deconvolución también son las que contienen la mayor proporción de estructura secundaria del tipo β . Las proteínas modificadas AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4 presentaron la misma proporción de estructura secundaria (Tabla 11). Los modelos obtenidos también mostraron un alto contenido de asas y giros aunque

en menor porcentaje que en la deconvolución de los datos colectados por DC. También se puede observar la misma tendencia en cuanto al contenido de estructura secundaria, es decir, AAC y AACM.4 tienen el mismo contenido de estructura secundaria. Así mismo las proteínas AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4 muestran resultados muy parecidos. Finalmente, AACM.1 es la proteína con el mayor porcentaje de estructura en hélice (Tabla 12).

Tabla 11. Contenido de estructura secundaria de las proteínas recombinantes.

Proteína	Hélice (%)	Beta (β) %	Asas y giros %
AAC	7	36	56
AACM.1	19	35	46
AACM.2	8	34	58
AACM.3	8	34	58
AACM.4	8	36	56
AACM.3.4	8	34	58

Tabla 12. Contenido de estructura secundaria de los modelos obtenidos.

Proteína	Hélice (%)	Beta (β) %	Asas y giros %
AAC	7	22	71
AACM.1	11	17	72
AACM.2	10	19	71
AACM.3	9	19	72
AACM.4	7	22	71
AACM.3.4	9	19	71

Las proteínas estudiadas presentaron estructuras del tipo β_{II} ; la cual, es una subclasificación de proteínas que contienen estructura secundaria β y un alto contenido de estructura desordenada (asas y giros). Los espectros de DC de proteínas β_{II} presentan un mínimo negativo alrededor de una longitud de onda de 200 nm y, en algunos casos, presentan una banda positiva de menor magnitud alrededor de una longitud de onda de 190 nm. En ocasiones, este tipo de

proteínas también presentan una banda negativa aproximadamente a una longitud de onda de 220 nm (Sreerama y Woody, 2003).

6.3 Determinación del punto isoeléctrico: electroforesis 2D

Las proteínas replegadas se resolvieron mediante electroforesis 2D para determinar su pI (Figura 32). La proteína AAC mostró un pI de 6, el pI de AACM.3 fue de 6.1 y el pI de AACM.3.4 fue de 6.3. El pI teórico de AAC y AACM.3 es de 5.97, mientras que para AACM.3.4 es de 6.07, las diferencias entre el pI experimental y el teórico podrían ser por la falta de enfoque. La proteína AACM.4 posee un pI teórico de 5.97 y experimentalmente la proteína replegada mostró dos puntos muy cercanos (Figura 32) que corresponden a un pI de 5.9 y 6.3; probablemente esto es un artefacto producto de las tiras que contienen el gradiente de pH o, en su defecto, existen dos proteínas con un pI distinto y un PM muy cercano. En cambio, en los geles de las muestras AAC, AACM.3 y AACM.3.4 se puede observar que la proteína mayoritaria corresponde a las proteínas recombinantes.

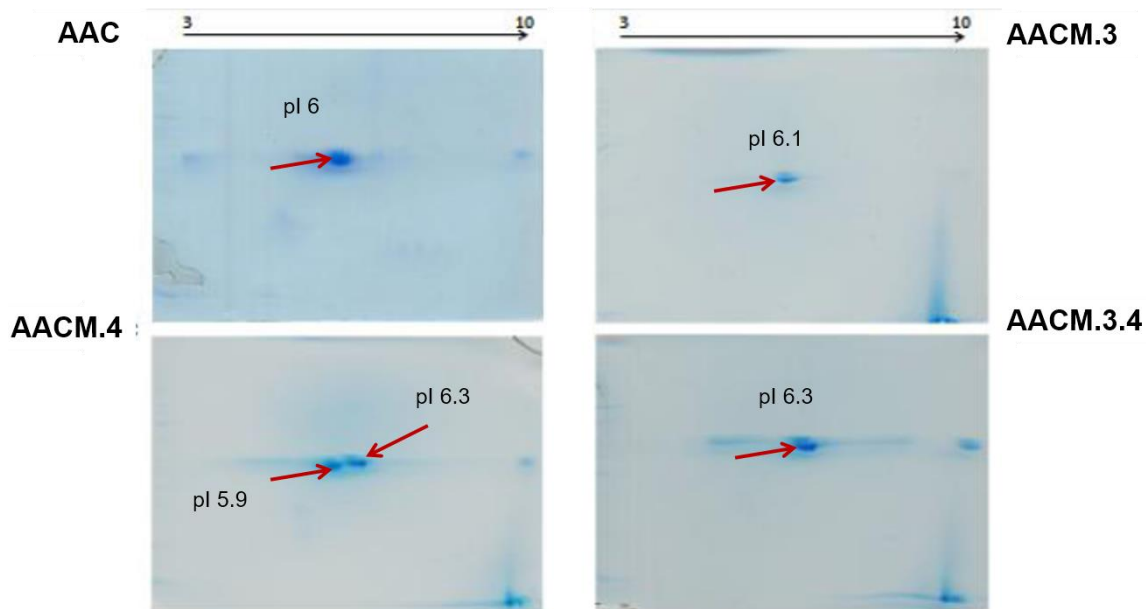


Figura 32. Electroforesis 2D de proteínas recombinantes pH 3-10.

Para tener una mejor resolución en la electroforesis 2D, todas las proteínas se resolvieron con tiras de pH de 4-7. En cada uno de los geles se puede observar

más de una mancha, es decir, en cada gel se encuentran entre tres y seis proteínas enfocadas y una de ellas en mayor proporción (Figura 33).

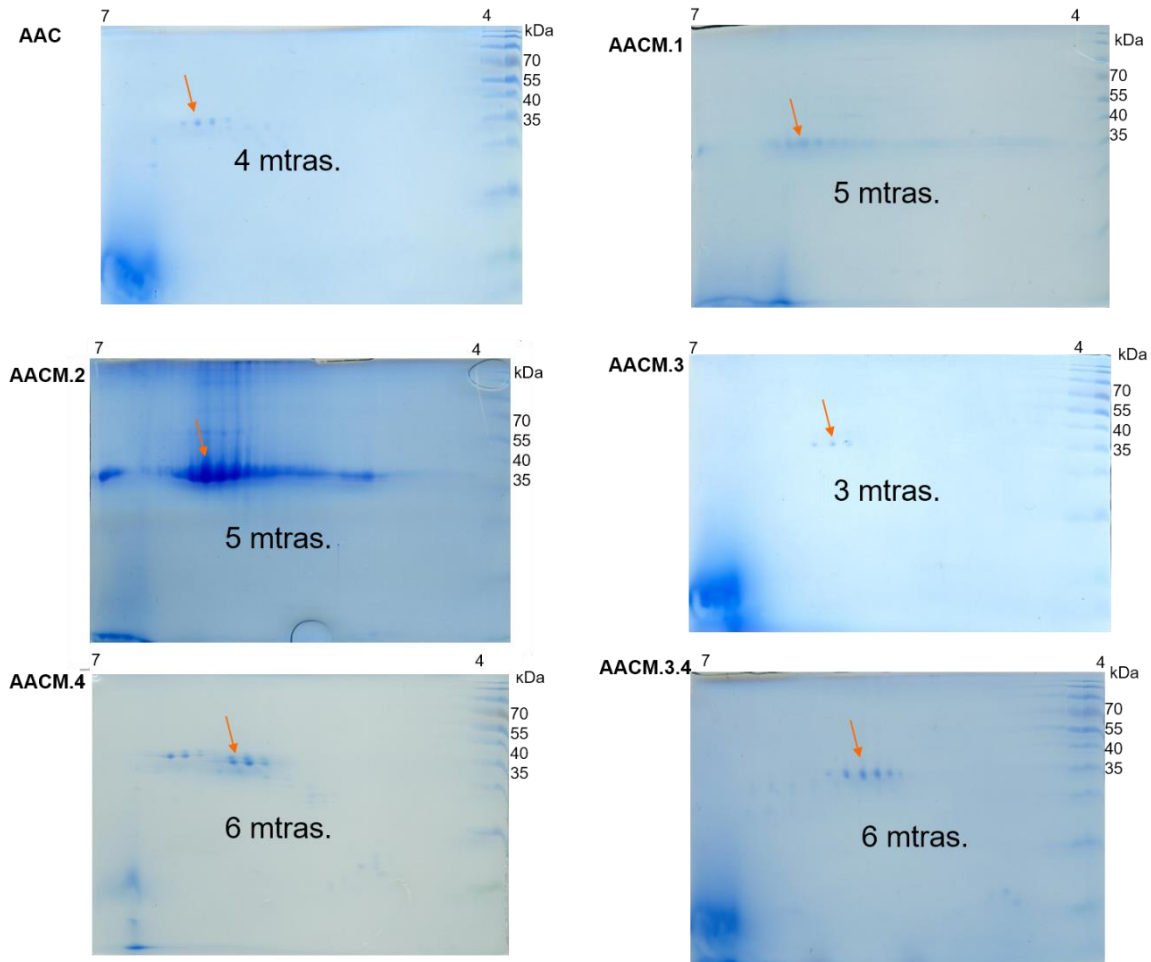


Figura 33. Electroforesis 2D de proteínas recombinantes pH 4-7.

Existen reportes de la existencia de mecanismos que degradan proteínas truncas, desestructuradas o con plegamiento anómalo en *E. coli*. Estos mecanismos, funcionan mediante etiquetas de degradación (también conocidas como degrones) y corresponden a pequeñas secuencias de aminoácidos que se agregan en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína a degradar. Las etiquetas de degradación son reconocidas por distintas proteasas; en *E. coli*, la ClpXP fue la primera enzima con actividad proteolítica que se aisló y caracterizó. Algunas de las secuencias que esta enzima reconoce para realizar la degradación y que se agregan en el C-terminal de la proteína blanco son LAA, NVA y NAA, entre otras; las secuencias que se agregan en el N-terminal son SQNTLKV, TNTAKI,

SLSDAQVA, entre otras (Baker y Sauer, 2012; Flynn y col, 2003; Humbard y col., 2013). Entonces, de acuerdo con los resultados y con base en lo anterior, es posible que AAC y sus versiones modificadas sean marcadas con etiquetas de degradación que provoquen la aparición de proteínas con distintos pl.

6.4 Termoestabilidad y estabilidad química

El DC y el TRF son técnicas para estudiar la estabilidad de biomacromoléculas a partir de la determinación de las curvas de transición que se generan por el desplegamiento térmico. Las proteínas replegadas AAC, AACM.1 y AACM.4 fueron las únicas que mostraron transición por efecto de la temperatura. El resto de las proteínas replegadas (AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4) no presentaron transición; por DC, no se observó cambio en la señal por efecto de la temperatura (Figura 28, véase panel izquierdo), y en los experimentos por TRF desde el inicio de los experimentos se registró una elevada intensidad en la señal de fluorescencia (Figura 28, véase panel derecho). Esto puede ser producto de una mayor exposición de regiones hidrofóbicas que hacen que la señal de fluorescencia sea muy elevada desde el inicio de los ensayos (Lavinder y col., 2009).

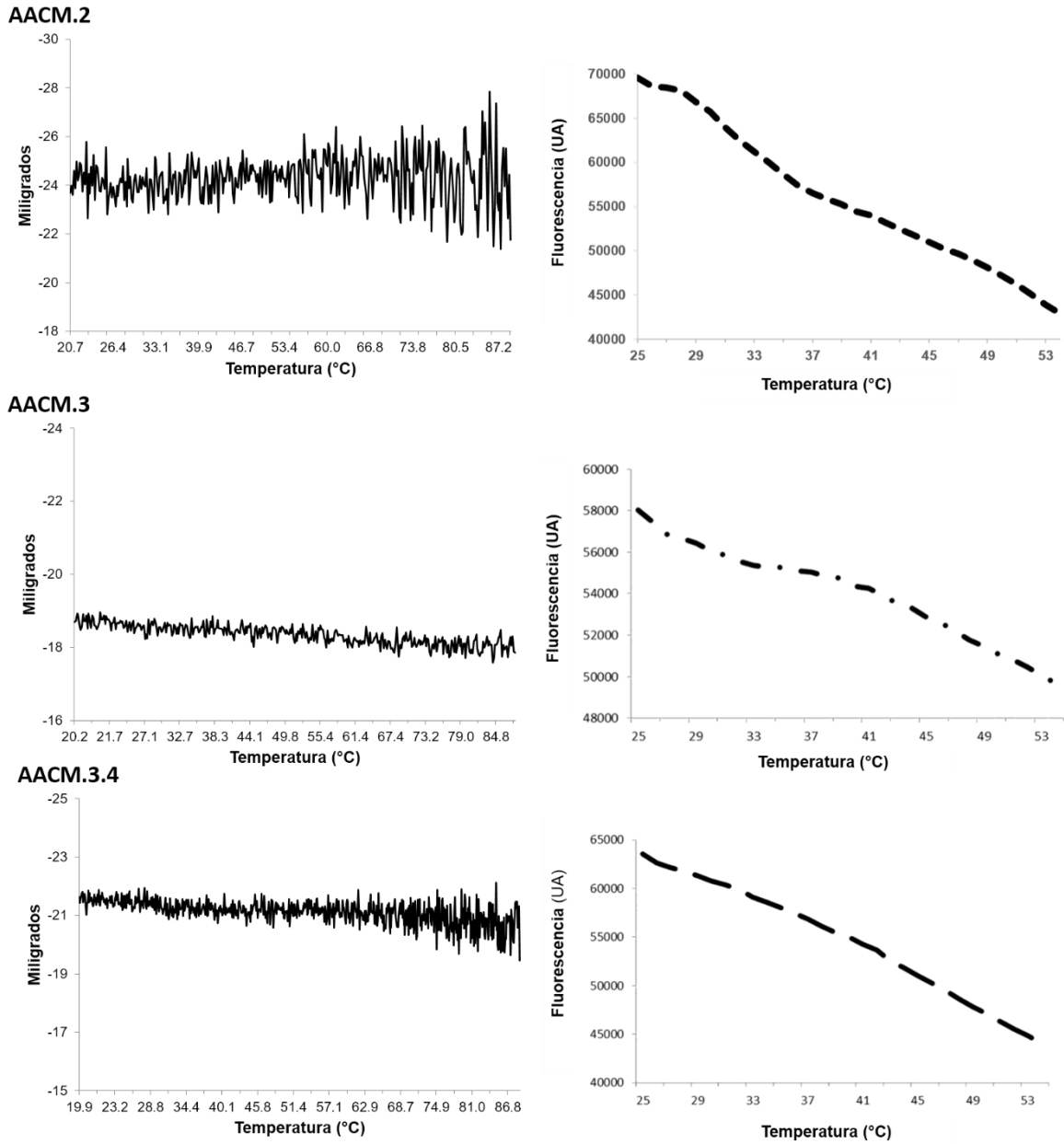


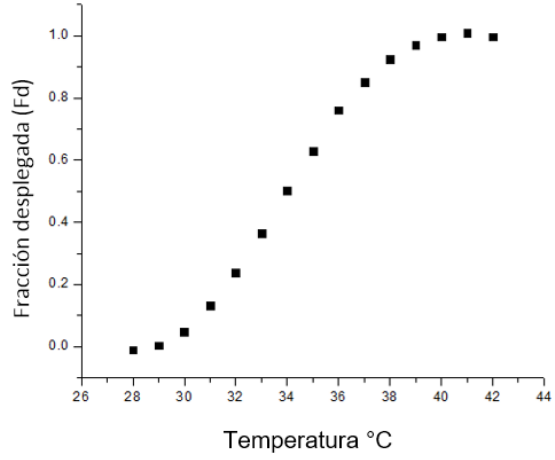
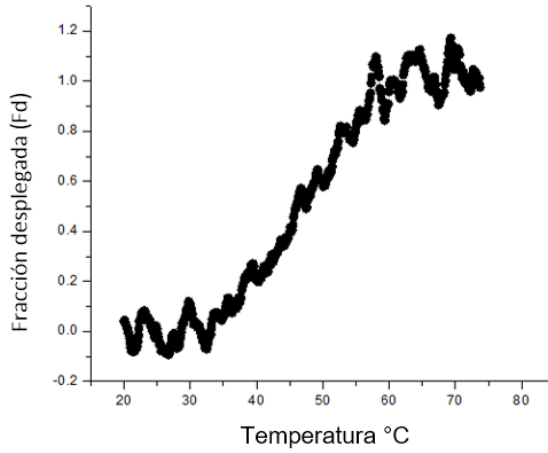
Figura 34. Desnaturalización por temperatura monitoreada por DC y TRF. A la izquierda se muestran los espectros por DC y a la derecha los espectros por TRF.

Con base en las curvas de transición se calculó la T_m de AAC, AACM.1 y AACM.4 (Figura 35). La T_m de las proteínas a partir de los ensayos de DC fue mayor que la T_m calculada por TRF (Tabla 11). En ambos casos, las proteínas modificadas mostraron mayor termoestabilidad que la proteína nativa AAC. Lo que sugiere que las modificaciones generan mayor estabilidad estructural posiblemente porque en

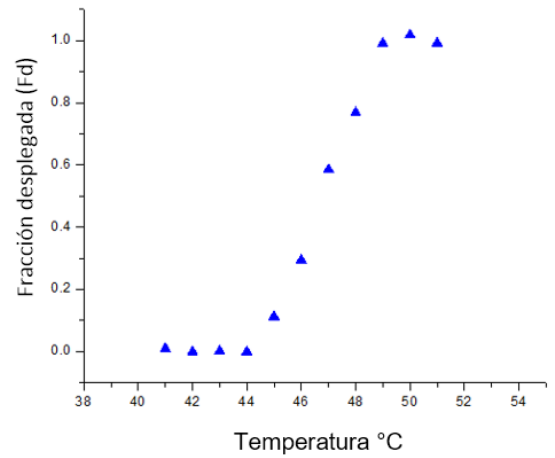
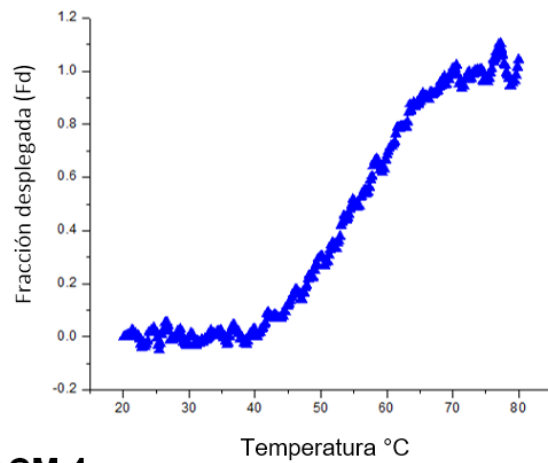
las regiones variables I y IV se establece un mayor número de interacciones que estabilizan a la molécula.

Se ha reportado que la amarantina posee una temperatura de desnaturalización (Td) que oscila entre 99 a 103 °C (Sanfeng y Paredes-López, 1997). Además, diferentes reportes han señalado que la glicinina (proteína de reserva 11S que se encuentra en la soya) es resistente a la desnaturalización por altas temperaturas, las cuáles oscilan entre 92.8 a 98 °C (Tezuka y col., 2004). Con base en lo anterior, la eliminación de la subunidad básica que se realizó en AAC desde su generación afecta las propiedades térmicas de esta y de las proteínas modificadas que presentaron transición (AACM.1 y AACM.4).

AAC



AACM.1



AACM.4

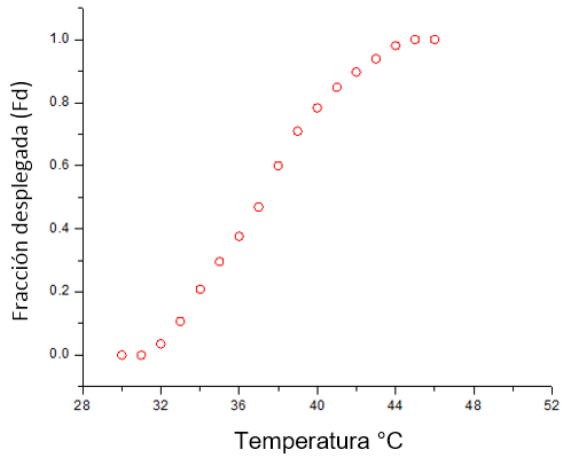
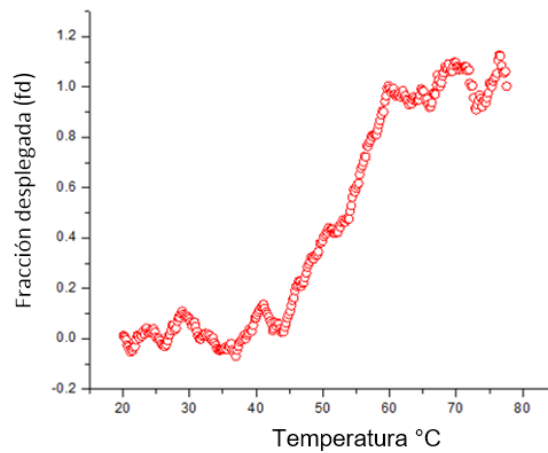


Figura 35. Curvas de transición mediante DC y TRF. A la izquierda se muestran los espectros por DC y a la derecha los espectros por TRF.

Los datos colectados de la transición por DC se usaron para obtener la curva de van't Hoff ($\ln K_{eq\text{aparente}} \text{ vs } 1/T$) (ver Apéndice E) y a partir de estos resultados conocer el cambio de entalpía (ΔH) en el proceso de desplegamiento. Cabe recordar que los resultados termodinámicos son aparentes y se usan únicamente con fines comparativos. ΔH y T_m son dos términos termodinámicos que expresan la estabilidad de una proteína; por lo tanto, es común que se usen para realizar comparaciones. El ΔH se refiere a la cantidad de energía calorífica requerida para que una proteína pase de un estado plegado o nativo a un estado desnaturalizado (N→D); la T_m , corresponde a la temperatura en el punto medio de la transición de N→D (Grimsley y col., 1999; Xu y col., 1998).

Los valores de ΔH mostraron que el desplegamiento de las proteínas modificadas se lleva a cabo con valores de entalpía mayores, esto significa que el cambio es más cooperativo (Tabla 13). La diferencia en la T_m obtenida por TRF y DC podría indicar que el desplegamiento no es de dos estados.

Tabla 13. Parámetros termodinámicos de AAC y sus versiones modificadas.

Proteína	TRF T_m (°C)	DC T_m (°C)	ΔH (kJ/mol)
AAC	34	46	160.5
AACM.1	48.6	55	175
AACM.2	NM	NM	NM
AACM.3	NM	NM	NM
AACM.4	37.2	54	214.1
AACM.3.4	NM	NM	NM

La carencia de curvas de transición en las proteínas AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4 durante los ensayos de DC, una señal elevada en la fluorescencia en los experimentos de TRF y los resultados de espectroscopía de fluorescencia (en los que se observó que λ_{max} de cada proteína cambia en la condición desnaturalizada y en la condición replegada) sugieren que estas proteínas podrían adoptar una conformación tipo glóbulo fundido o parcialmente plegadas (Kuwahima, 1989; ; Rosen y col., 2014), es decir, estas variantes de AAC solo

adquieren una conformación con cierto contenido de estructura secundaria pero carecen de estructura terciaria.

Por lo anterior, se puede concluir que las inserciones con los péptidos antihipertensivos afectan la estabilidad de las proteínas AACM.2, AACM.3 y AACM.3.4.

Los parámetros termodinámicos correspondientes a las proteínas AACM.1 y AACM.4 se incrementaron comparados con los parámetros que corresponden a la proteína nativa AAC, es decir, estas versiones modificadas podrían presentar mayor estabilidad porque los datos son aparentes (Rees y Robertson, 2001). Además, se ha reportado que el aumento en el parámetro ΔH es el resultado de un mayor número de interacciones que pueden generar estructuras proteicas con un mayor grado de compactación molecular (Liu y col., 2000; Rezaei-Tavirani y Dehghan-Nayeri, 2015).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente y con base en los resultados, las proteínas AACM.1 y AACM.4 que se modificaron con el péptido antihipertensivo VYVYVYVY en las regiones I y IV, respectivamente, mejoran su estabilidad porque establecen un mayor número de interacciones y, probablemente, forman estructuras más compactas.

6.5 Desnaturalización química

A las proteínas que mostraron cambios en estructura secundaria por efecto de la temperatura también se les analizó sus cambios conformacionales por efecto de la concentración de urea. Para esto, la proteína AAC y las proteínas modificadas AACM.1 y AACM.4 se desnaturalizaron con distintas concentraciones de urea y se analizaron sus espectros de fluorescencia. En la Figura 36 se presentan los espectros de fluorescencia de AAC a distintas concentraciones de urea.

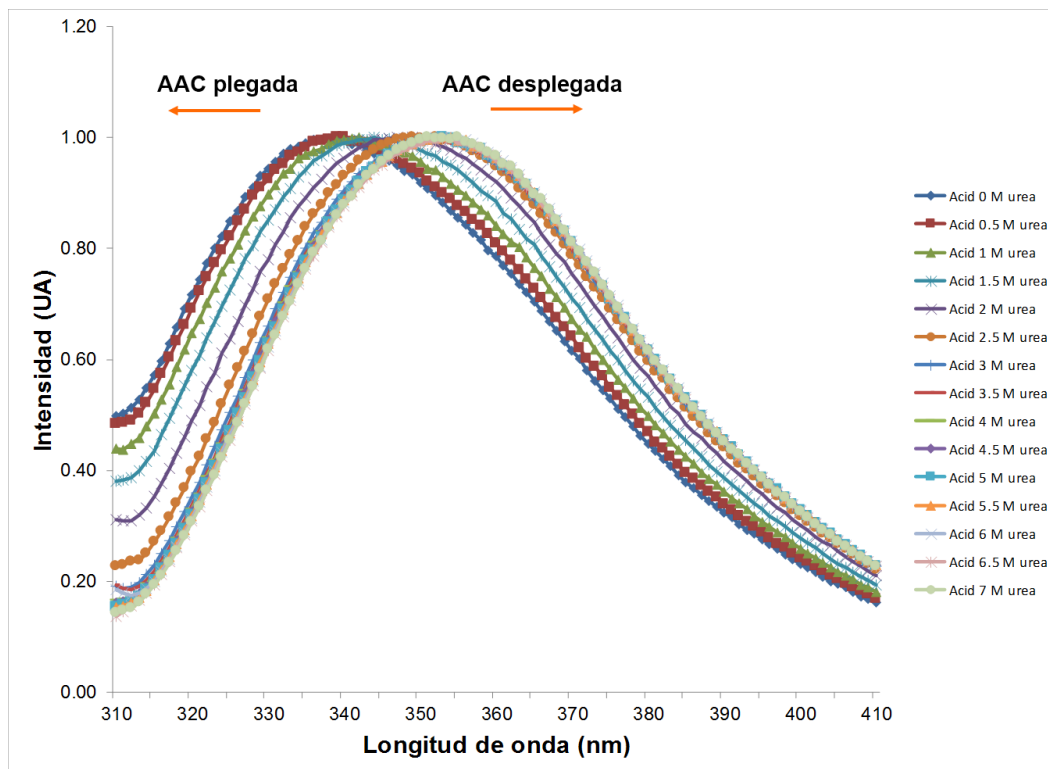


Figura 36. Desnaturalización de AAC con urea. La longitud de onda de excitación en los experimentos de fluorescencia intrínseca fue de 295 nm.

Es evidente que los espectros de AAC muestran un desplazamiento del máximo de emisión (λ_{max}) al aumentar la concentración del agente desnaturalizante (Figura 36). Este desplazamiento es hacia longitudes de onda mayores lo que indica que la proteína cambia su conformación al exponer sus residuos de Trp. El mismo resultado se observó en AACM.1 y AACM.4 (Figuras 37 y 38, respectivamente).

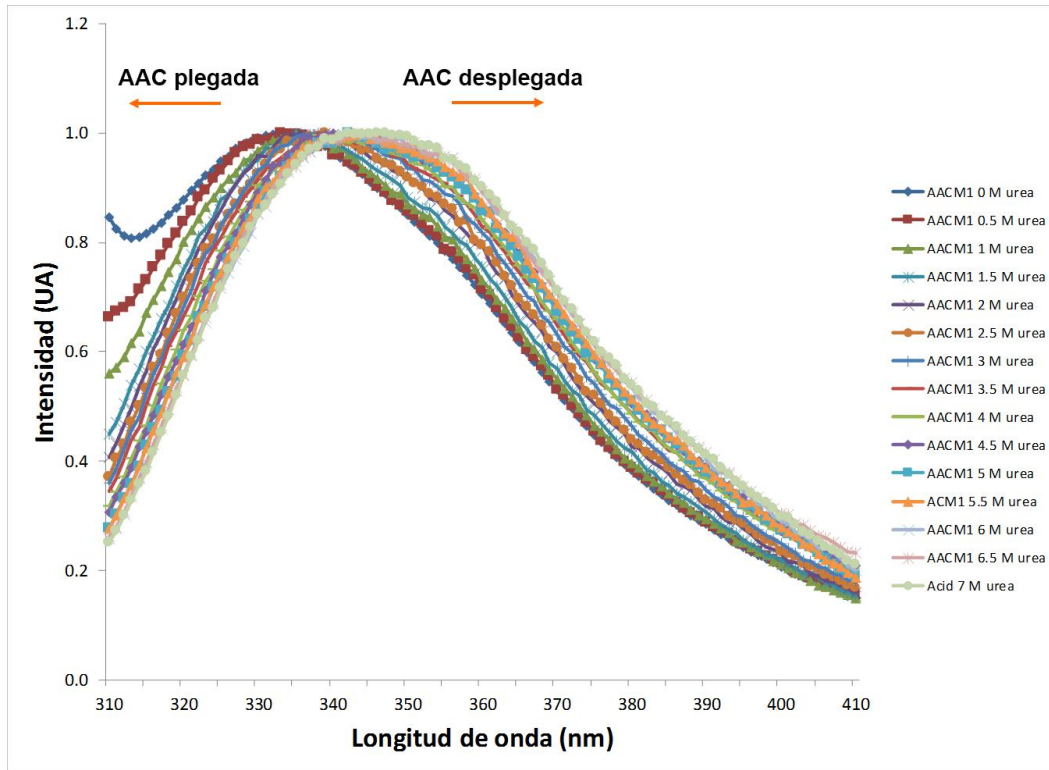


Figura 37. Desnaturalización de AACM.1 con urea. La longitud de onda de excitación en los experimentos de fluorescencia intrínseca fue de 295 nm.

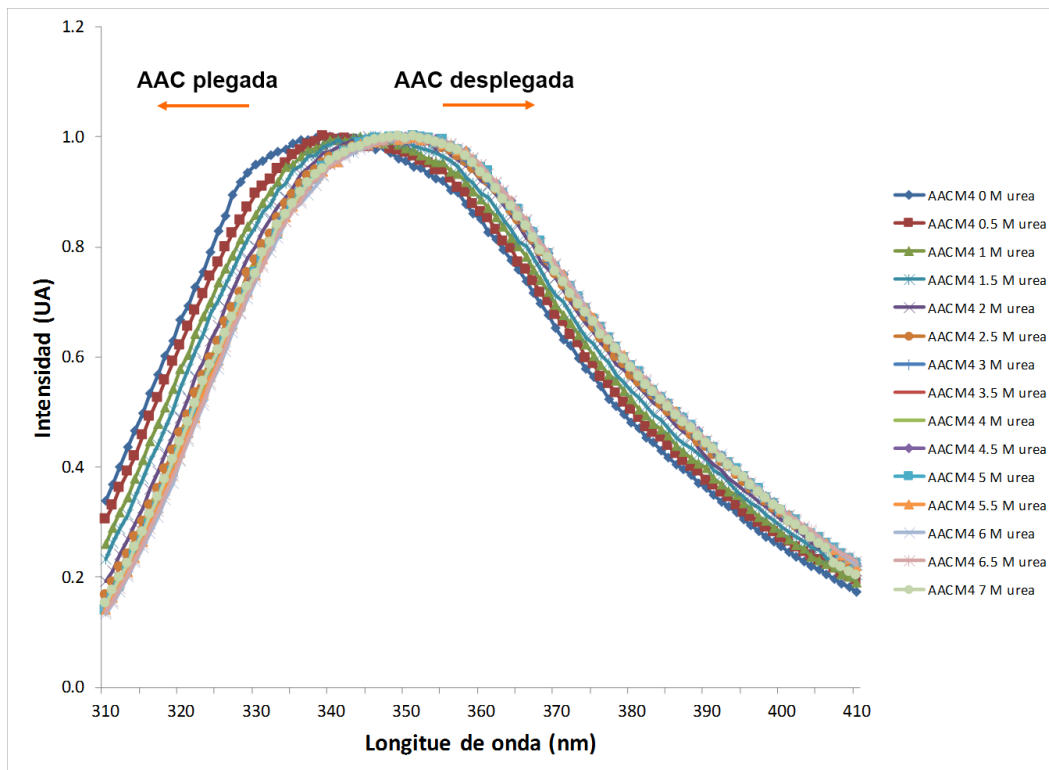


Figura 38. Desnaturalización de AACM.4 con urea. La longitud de onda de excitación en los experimentos de fluorescencia intrínseca fue de 295 nm.

Con los datos colectados se calculó el CEM (ver sección 8.1.3 de Materiales y métodos) de las proteínas en cada condición de agente desnaturante y se obtuvieron sus curvas de transición (Figura 39). A partir de estas curvas se estimó la concentración de urea a la cual se alcanza el punto medio de la transición del desplegamiento químico ($C_{1/2}$).

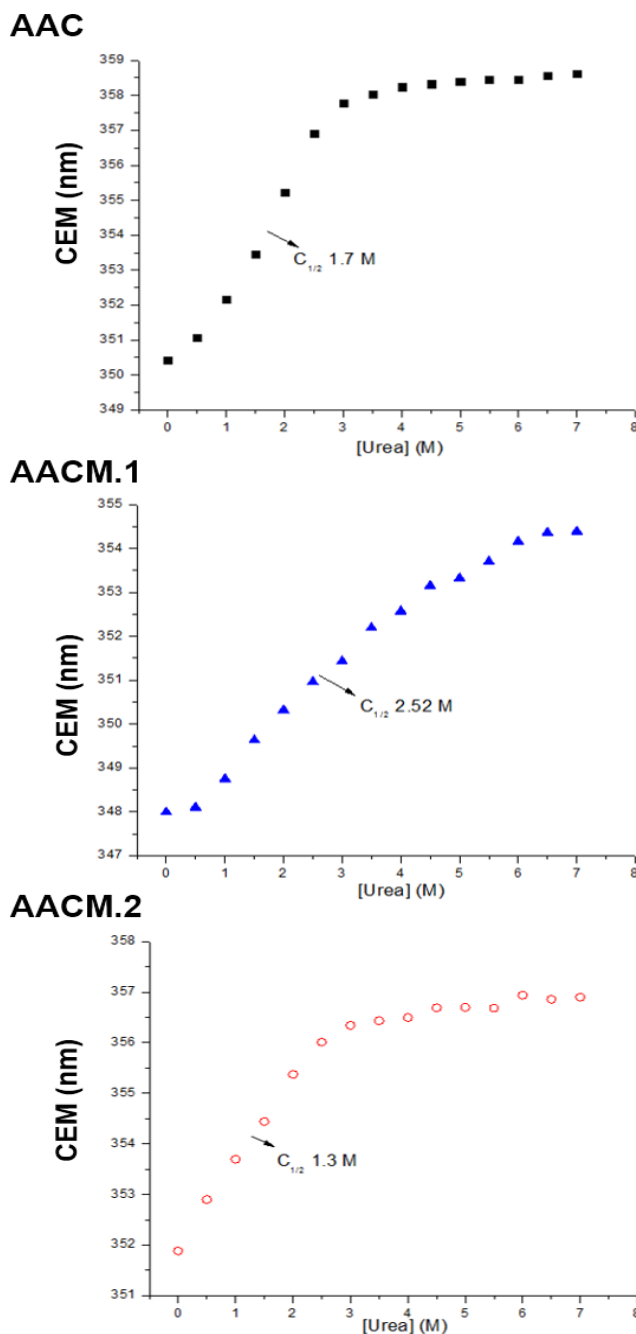


Figura 39. Curvas de desnaturalización química de AAC, AACM.1 y AACM.4.

La proteína AACM.1 presentó la mayor estabilidad a diferencia de AACM.4 esto debido a que su $C_{1/2}$ tiene el valor más alto. En todos los casos existe cooperatividad en el proceso de desplegamiento, lo cual coincide con los resultados desnaturalización por temperatura.

6.6 Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

Se realizaron ensayos *in vitro* para observar la capacidad inhibitoria de AAC y de las proteínas modificadas sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA). En las primeras determinaciones, se estimó la actividad inhibitoria (expresada por el IC_{50}) que posee el captopril, que es uno de los principales medicamentos utilizados en el tratamiento de la hipertensión. El valor IC_{50} que se obtuvo para este fármaco fue de $0.003 \cdot 10^{-6}$ mg/mL; este valor coincide con los resultados reportados por Ben y col. (2013). Posteriormente, el producto de la actividad trípica y quimotríptica de cada una de las proteínas recombinantes se utilizó para determinar la inhibición de la ECA.

La mayor inhibición se detectó con la proteína AACM.3.4, el IC_{50} que mostró es de 0.047 mg/mL; las proteínas AACM.2, AACM.3 y AACM.4 mostraron un IC_{50} muy similar entre ellas y es casi ocho veces menor que AACM.3.4 (Tabla xx). Las proteínas AAC y AACM.1 mostraron un IC_{50} de 0.48 y 0.52 mg/mL, respectivamente.

En general, todas las proteínas inhiben la actividad de la ECA y es posible que sean efectivas como agentes antihipertensivos. A excepción de AACM.1, que presentó un IC_{50} muy cercano al de la proteína nativa AAC, los resultados indican que las modificaciones con los péptidos antihipertensivos en las variantes de AAC mejoran la capacidad inhibitoria sobre la ECA. Estos resultados son similares a lo reportado previamente por Luna-Suárez y col. (2010). Además, la mayoría de las proteínas modificadas en este estudio muestran mayor capacidad inhibitoria que los aislados de proteína de amaranto (IC_{50} 0.12 mg/mL) analizados por Fritz y col. (2011); también, AAC y sus versiones modificadas presentaron mejores resultados que los péptidos obtenidos por la hidrólisis de residuos de mojarra como producto

de la actividad enzimática de una proteasa alcalina (IC_{50} 0.57 mg/mL) (Fahmi y col., 2004; Wijesekara y Kim, 2010).

La caracterización de la proteína AAC y sus versiones modificadas presentan diferencias que son el resultado de las modificaciones por la inserción de péptidos bioactivos (Tabla 12).

Tabla 12. Rendimientos, purificación y caracterización fisicoquímica y funcional de AAC y sus versiones modificadas.

	PROTEÍNA					
	AAC	AACM.1	AACM.2	AACM.3	AACM.4	AACM.3.4
*Rendimiento a nivel matraz (g/L)	0.56	0.54	0.47	0.44	0.56	0.33
Proteína insoluble	✓	✓	✓	✓	✓	✓
*Rendimiento a nivel fermentador (g/L)	1.59 (± 0.09)	1.65 (± 0.13)	1.37 (± 0.08)	1.35 (± 0.1)	1.57 (± 0.04)	1.32 (± 0.09)
Elución con imidazol (mM)	5	125	125	50	125	5
Proteína replegada (%)	20	23	26	18	36	30
λ máxima emisión IF (nm)	337	334	337	342	340	341
λ mínima DC (nm)	204	207	204	208	204	203
*Estructura hélice (%)	7	19	8	8	8	8
*Estructura β (%)	36	35	34	34	36	34
*Estructura asas y giros (%)	56	46	58	58	56	58
<i>T_m</i> por DC (°C)	46	55	NM	NM	54	NM
<i>T_m</i> por TRF (°C)	34	48.6	NM	NM	37.2	NM
ΔH (kJ/mol)	160.5	175	NM	NM	214.1	NM
$C_{1/2}$ [urea; M]	1.7	2.52	NM	NM	1.3	NM
pI	6	6	6.1	6.1	5.9	6.3
IC ₅₀ (mg/mL)	0.483	0.540	0.063	0.064	0.061	0.047

+, Proteína obtenida seis horas después de la inducción; ± desviación estándar; *, predicción de estructura secundaria hecha con el servidor DICHROWEB a partir de los datos colectados por DC; NM, no mostró.

VIII. CONCLUSIONES

- El análisis *in silico* reveló que la modificación de AAC con péptidos bioactivos genera cambios estructurales, lo cual es consistente con la predicción del contenido de estructura secundaria, con la caracterización espectroscópica (IF y DC) y con los resultados de IECA para cada proteína.
- Con base al mayor nivel de expresión, la mejor cepa para la obtención de la AAC y de sus versiones modificadas es *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. La expresión por 6 h de las proteínas recombinantes fue suficiente para obtener altos rendimientos; esta cantidad facilitó su purificación en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a Ni en un sistema FPLC. A pesar de que las proteínas se expresaron como cuerpos de inclusión, fue posible estandarizar un protocolo de replegamiento para llevar a cabo los estudios estructurales.
- AACM.2, AACM.3 y AACM3.4 mostraron menor estabilidad; es decir, la modificación de las regiones variables II y III desestabiliza a la proteína AAC (muy probablemente por la pérdida de interacciones). En cambio, las proteínas AACM.1 y AACM.4 mostraron mayor estabilidad al someterlas a cambios de temperatura y fuerza iónica; es decir, las modificaciones en las variables I y IV son toleradas y mejoran la estabilidad de la proteína.
- El efecto de inhibición de la ECA resultó mayor en las proteínas modificadas, a excepción de AACM.1. Esta diferencia probablemente es consecuencia de la conformación compacta que AACM.1 adopta.
- Las proteínas que presentaron menor estabilidad mantuvieron su actividad nutracéutica. Es decir, pareciera que a mayor estabilidad en las proteínas estudiadas el efecto inhibitorio sobre la ECA se reduce.

IX. PERSPECTIVAS

Durante la electroforesis 2D de cada proteína recombinante se observó la presencia de más de una mancha que, se sospecha, corresponde a más de una proteína; por lo tanto, es preciso secuenciar cada una de las manchas para identificar si su aparición es producto del etiquetado para la degradación de las proteínas.

Una parte importante para el uso o aplicación de las proteínas analizadas en este estudio es su bioseguridad y efectividad como agente terapéutico; por lo tanto, es necesario realizar pruebas *in vivo* para evaluar su efectividad como antihipertensivos y/o conocer los efectos secundarios que se pudieran generar tras su consumo.

Las propiedades funcionales como actividad espumante, actividad gelificante y actividad emulsificante, así como pruebas de vida acelerada, entre otras; son criterios importantes para el uso o aplicación de proteínas como agentes aditivos (para la generación de alimentos y/o nuevos productos); por lo tanto, se sugiere realizar las pruebas precisas para determinar las propiedades funcionales de las proteínas que presentaron mayor estabilidad (AACM.1 y AACM.4).

El estudio tridimensional de las proteínas permite un mayor entendimiento de sus propiedades fisicoquímicas. Por tal razón, es pertinente realizar estudios (*in vitro* e *in silico*) a nivel atómico de las proteínas que mostraron cambios en la estabilidad (AACM.1 y AACM.4). Para ello, se podrían realizar ensayos de cristalografía de rayos X, o de resonancia magnética nuclear (RMN), o bien simulaciones de dinámica molecular.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agyei D. y Danquah M. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 29, 272-277.
- Ahhmed A. M. y Muguruma M. 2010. A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science* 86, 110-118.
- Arano-Varela H., Domínguez-Domínguez J. y Paredes-López O. 2012. Effect of environmental conditions on the expression levels of a recombinant 11S amaranth globulin in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology* 6, 23-31.
- Arihara K. 2006 Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 74, 219-229.
- Baker T. A y Sauer R. 2012. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 15-28.
- Baldwin R.L. 1975. Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry* 44, 453-475.
- Barba de la Rosa A. P., Gueguen J., Paredes-López O. y Viroben G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 931-936.
- Ben H. Y., Labidi A., Arnaudin I., Bridiau N., Delatouche R., Maugard T., Piot J. M., Sannier F., Thiéry V. y Bordenave-Juchereau S. 2013. Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 10685-90.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. y Stryer L. 2002. *Biochemistry*, W. H. Freeman (Ed.) 5th edition. New York

- Bertucci C., Pistolozzi M. y De Simone A. 2011. Structural characterization of recombinant therapeutic proteins by circular dichroism. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10, 1508-16
- Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Rojas-Martínez R., Pedroza A., Medina-García C. y Barquera-Cervera S. 2013. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud pública en México* 55, 2.
- Carrasco-Peña L, Osuna-Castro J. A., De León-Rodríguez A., Maruyama N., Toro-Vazquez J. F., Morales-Rueda J. A. y Barba de la Rosa A. P. Modification of solubility and heat-induced gelation of amaranth 11S globulin by protein engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6, 3509-16.
- Casey R. 1999. Distribution and some properties of seed globulins. En *Seed Proteins*. Shewry P.R. y Casey R. (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda pp. 159-169.
- Castro-Martínez C., Luna-Suárez S. y Paredes López O. 2012. Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *Journal of Biotechnology* 158, 59-67.
- Chan C.H, Tsai C. J. y Chiang Y. W. 2015. Side-chain packing interactions stabilize an intermediate of BAX protein against chemical and thermal denaturation. *The Journal of Physical Chemistry* 119, 54-64.
- Chen D., Duggan C., Ganley J. P., Kooragayala L. M., Reden T. B., Texada D. E. y Langford M.P. 2004. Expression of enterovirus 70 capsid protein VP1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 37, 426-433.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy D. A. 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological* 66, 12-21.

- Chou C. P. 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 521-532.
- Clark E. D. B. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 202–207.
- Cobo-Abreu C. y Fabián San Miguel M. G. Tratamiento de la hipertensión arterial sistémica en pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias* 20, 1.
- Corzo-Martínez M., Carrera-Sánchez C., Moreno F. J., Rodríguez-Patino J. M. y Villamiel M. 2012. Interfacial and foaming properties of bovine β -lactoglobulin: Galactose Maillard conjugates. *Food Hydrocolloids* 27, 438-447.
- Costantino H. R., Langer R. y Klivanov A. M. 1995. Aggregation of lyophilized pharmaceutical protein, recombinant human albumin: Effect of moisture and stabilization by experiments. *Biotechnology* 13, 493-496.
- Cushman D. W. y Cheung H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20, 1637-1648.
- Danielsson C. E. 1949. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. *Biochemical Journal* 44, 387-400.
- Delgado-Vargas F. Paredes-López O. 2000. Natural colorants for foods and nutraceutical uses. p 259 CRC PRESS, United States of America.
- Dickinson C. D., Scott M. P., Hussein E. H., Argos P. y Nielsen N. C. 1990. Effect of structural modifications on the assembly of a glycinin subunit. *Plant Cell* 2, 403-413.
- Donovan R. S., Robinson C. W., Glick B. R. (1995). Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 16, 145-154.

- Dumbroff E. B. y Gepstein F. 1993. Immunological methods for assessing protein expression in plants. En: *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. P 207 CRC Press, United States of America.
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77, 67-82.
- Erdmann K., Cheung B. y Shroder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 643-654.
- Fahmi A., Morimura S. Guo H. C., Shigematsu T., Kida K. y Uemura Y. 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry* 39, 1195-1200.
- Fersht A. 1999. Structure and mechanisms in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman, New York. pp. 85.
- Flynn J. M., Neher S. B., Kim Y.I., Sauer R. T., Baker T. A. 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Molecular Cell* 11, 671-683.
- Fritz M., Vecchi B., Rinaldi G., y Añón M. C. 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry* 126, 878-884.
- Fukushima D. 1991. Structure of plant storage protein and their functions. *Food Reviews International* 7, 353-381.
- Gidamis A. B., Wright P., Haque Z., Katsube T., Kito M. y Utsumi S. 1995. Modification of tolerability of soybean ploglycinin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59, 1593-1595.
- Gierasch L. M. y King J. 1990. Protein folding: Deciphering the second half of the genetic code. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC.

- Glick B. R. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* 2, 247-261.
- Gobetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. y Addeo F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis ssp. Cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3898-3904.
- Gorinstein S. 1993. Relationship between amino acid sequence and secondary structures of proteins in plants and cereals. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57, 1617-1623.
- Grimsley G. R., Shaw K. L., Fee R., Alston R., Huyghues-Despointes B., Thurlkill R., Scholtz J. y Pace C. N. 1999. Increasing protein stability by altering long-range coulombic interactions. *Protein Science* 8, 1843-1849.
- Li G. H., Le G. W., Shi Y. y Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 24, 469-486.
- Gupta P., Hall C. K. y Voegler A. C. 1998. Effect of denaturant and protein concentrations upon protein refolding and aggregation: a simple lattice model. *Protein Science* 12, 2642-2652.
- Hartmann R. y Meisel H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 163-9.
- Hayes M., Stanton C., Slattery H., O'Sullivan O., Hill C., Fitzgerald G. F. y Ross R. P. 2007. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4658-4667.
- Herman E. M. y Larkins B. A. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell* 11, 601-613.
- Hernández A. 2003. Fermentación. En *Microbiología Industrial* (1ª. Ed.). p 35 EUNED, Costa Rica.

- Hernández-Ledesma B., Contreras M. y Recio I. 2010. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165, 23-35.
- Higgins T. J. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of plant Physiology* 35, 191-221.
- Hu F., Zhao Y., Qi X., Cui H., Gao Y., Gao H., Liu C., Wang Y., Zhang Y., Li K., Wang X. y Wang Y. 2015. Soluble expression and enzymatic activity evaluation of protease from reticuloendotheliosis virus. *Protein expression and purification* 114, 64-70.
- Humbard M. A., Surkov S., Donatis G. M., Jenkins L. M y Maurizi M. 2013. The N-degradome of *Escherichia coli*: limited proteolysis in vivo generates a large pool of proteins bearing N-degrons. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 28813-28824.
- Källberg M., Wang H., Wang S., Peng J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511-1522.
- Kamionka M. 2011. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12, 268-274.
- Katsube T., Gidamis A. B., Kanamori J., Kang I. J., Utsumi S. y Kito M. 1994. Modification tolerability of the hypervariable region of soybean proglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2639-2645.
- Kawasaki T., Seki E., Osajima K., Yoshida M., Asada K. y Matsui T. 2000. Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *Journal of Human Hyertension* 14, 519-523.
- Khatib K. A., Herald T. J. y Muiño P. L. 2005. The characterization of soybean varieties by fluorescence spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology* 40, 545-555.
- Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millet I. y Fink A. 2001. Partially folded intermediates as critical precursors of light

- chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 40, 3525-3535.
- Kim C-S., Kamiya S, Sato T, Utsumi S, Kito M. 1990. Improvement of nutritional value and functional properties of soybean glycinin. *Protein Engineering* 3, 725-33.
- Kits D. D. y Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309-23.
- Konishi Y. y Yoshimoto H. 1989. Amaranth globulins as a heat-stable emulsifying. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 3327-3328.
- Korhonen H. y Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1297-1308.
- Krause M., Ukkonen K., Haataja T., Ruottinen M., Glumoff T., Neubauer A., Neubauer P. y Vassala A. 2010. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories* 9, 11.
- Krieger E., Joo K., Lee J. y Lee J. 2009. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* 9, 114-22.
- Kufareva I. y Abagyan R. 2012. Methods of protein structure comparison. *Methods in Molecular Biology* 857, 231-257.
- Kuwahima K. 1989. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6, 87-103.
- Lang G. J., Zhang M. Y., Li B. L., Yu L. L., Lu X. M. y Zhang C. X. 2010. Molecular characterization and inhibition analysis of the acetylcholinesterase gene from the silkworm maggot, *Exorista sorbillans*. *BMB Reports* 43, 573-8.

- Lavinder J. L., Hari S. B., Sullivan B. J. y Magliery T. 2009. High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *Journal of American Chemical Society* 131, 3794-3795.
- Liu L, Yang C y Guo QX. 2000. A study on the enthalpy-entropy compensation in protein unfolding. *Biophysical Chemistry*. 15, 239-51.
- Lopez A. D. y Murray C. C. 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Medicine* 4, 1241-3.
- Luna-Suárez S. 2008. Introducción de péptidos bioactivos de interés nutracéutico en una globulina de amaranto. Tesis de doctorado, CINVESTAV-IPN, Irapuato.
- Luna-Suárez S., Medina-Godoy S., Cruz-Hernández A. y Paredes-López O. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. *Biotechnology Journal* 3, 209-219.
- Luna-Suárez S., Medina-Godoy S., Cruz-Hernández A. y Paredes-López O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 148, 240-247.
- Majumder K. y Wu J. 2014. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 256-83.
- Mallikarjun G. K. G., Gowda L. R., Rao A. y Prakash V. 2006. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4568-4573.
- Martínez J. L., Liu L., Petranovic D. y Nielsen J. 2012. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 965-971.
- Matoba N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M. 1999. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated

- vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters* 452,181-4.
- Medina-Godoy S. 2005. Producción de la globulina 11S de amaranto en *E. coli* y *Pichia pastoris* y modificación de la estructura primaria mediante ingeniería de proteínas. Tesis de doctorado, CINVESTAV-IPN, Irapuato.
- Medina-Godoy S., Nielsen N. C. y Paredes-López O. 2004. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 20,1749-1756.
- Meisel H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* 21, 55-61.
- Mizuno S., Nishimura S., Matsuura K., Gotou T. y Yamamoto N. 2004. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science* 87,3183-3188.
- Moon C. P. y Fleming K. G. 2011 Using tryptophan fluorescence to measure the stability of membrane proteins folded in liposomes. *Methods in Enzymology* 492, 189-211.
- Moore J. 2005. Hipertensión: Catching the silent killer. *The Nurse Practitioner* 30, 16-18.
- Morales-Camacho J. I., Domínguez-Domínguez J. y Paredes-López O. 2013. Overexpression of a Modified Amaranth Protein in *Escherichia coli* with Minimal Media and Lactose as Inducer. *Recent Patents on Biotechnology* 10, 61-70.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. y Takano T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science* 78, 777-783.
- Neumann N y Snatzke G.1990. Circular dichroism of proteins. In: BradshawRA, PurtonM, eds. *Proteins: Form and function*. Elsevier:New York, pp107–117.

- Nielsen N. C., Jung R., Nam Y. W., Beaman T. W., Oliveira L. D. y Bassüner R. 1995. Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* 145, 641-647.
- Onishi K., Nobuyuki M., Yamada Y., Doyama N., Maruyama N., Utsumi S. y Yoshikawa M. 2004. Optimal designing of β -conglycinin to genetically incorporate RPLKPW, a potent anti-hypertensive peptide *Peptides* 25, 37-43.
- Osborne T.B. 1924. *The vegetable proteins*, Longmans Green.
- Osuna-Castro J. A., Rascón Cruz Q., Napier J., Fido R. J., Shewry P. R. y Paredes-López O. 2000. Overexpression, purification and *in vitro* refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. *Journal and Agricultural and Food Chemistry* 48, 5249-5255.
- Pace C. N. 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymology* 131, 266-80.
- Pace C. N., Shirley B. A. y Thomson J. A. 1990. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein structure: A practical approach* (ed. T.E. Creighton), pp. 311–330. IRL Press, Oxford, UK.
- Pantoliano M. W., Petrella E. C., Kwasnoski J. D., Lobanov V. S., Myslik J., Graf T., Carver, Asel E., Springer B. A., Lane P. y Salemme F. R. 2001. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening* 6, 429-440.
- Patrias K. 2007. *Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers*. 2nd ed. Wendling D.L., technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine, USA.
- Persson K. M. y Gekas V. 1994. Factors influencing aggregation of macromolecules in solution. *Process Biochemistry* 29, 89-98.
- Phillips K. y Hernández de la Peña. 2011. The combined use of the thermofluor and thermoQ analytical software for the determination of protein stability and

- buffer optimization as an aid in protein crystallization. *Current Protocols in Molecular Biology* 10.28.1-10.28.15.
- Rezaei-Tavirani N. y Dehghan-Nayeri M. 2015. The interpretation of protein structure through relationship of melting point (T_m) and enthalpy of unfolding (ΔH_u). *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 1, 47-50
- Romero-Zepeda H. y Paredes-López O. 1996. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *Journal of Food Biochemistry* 19, 329-339.
- Rosano G. L y Ceccarelli E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5, 172.
- Rossen L, Conell K. y Marqusee S. 2014. Evidence for close side-chain packing in an early protein folding intermediate previously assumed to be a molten globule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 14746-14751.
- Rullier B., Novales, B. y Axelos M. A. V. 2008. Effect of protein aggregates on 660 foaming properties of β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 330, 96-102.
- Ryan J. T., Ross R. P., Bolton D., Fitzgerald G. F. y Stanton C. 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* 3, 765-791
- Sanfeng C. y Paredes-López O. 1997. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *Journal of Food Biochemistry* 21, 53-65.
- Santiago-López L, Hernández-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Mata-Haro V y González-Córdova A. F. 2016. Food-derived immunomodulatory peptides. *Journal of the Science of Food Agriculture*. En prensa.
- Secretaría de Salud. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales México, D.F. p.p 113-114.

- Segura-Nieto M., Barba de la Rosa A. P. y Paredes López O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In: Amaranth-Biology, Chemistry and technology. Paredes-López O. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 76-95.
- Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T. y Korpela R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77, 326-330.
- Shewry P.R. 1995. Plant storage proteins. *Biology Review* 70, 375-426.
- Skoog D.A., Crouch S. R. y Holler F. J. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th. Edition. Thomson Brooks/Cole.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. y Klenk D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- So P. T. C. y Dong, C. Y. 2002. Fluorescence spectrophotometry. *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Sreerama N. y Woody R. W. 2003. Structural composition of β_I - and β_{II} -proteins. *Protein Science* 12, 384-388.
- Staswick P. E., Hermodson M. A. y Nielsen N. C. 1984. Identification of the cystines which link acidic and basic components of the glycinin subunits. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13431-13435.
- Takenaka Y., Utsumi S. y Yoshikawa M. 2000. Introduction of enterostatin (VPDPR) an a related sequence into soybean proglycinin A_{1a}B_{1B} subunit by site-directed mutagenesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 2731-2733.
- Tandang-Silvas M. R., Cabanos C. C., Carrasco-Peña L., Barba de la Rosa A. P. 2012. Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: insight into its physico-chemical properties. *Food Chemistry* 135, 819-826.

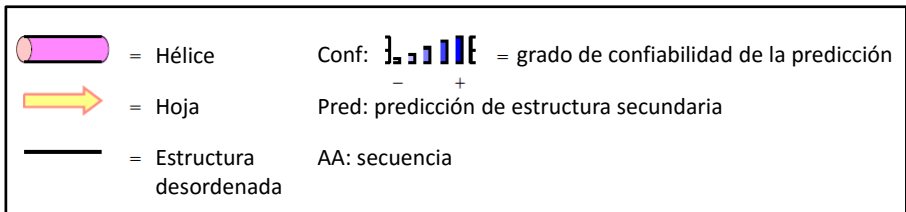
- Tandang-Silvas M. R., Tecson-Mendoza E. M., Mikami B., Utsumi S. y Maruyama N. 2011. Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 2, 59-73.
- Tezuka M., Yagasaki K. y Ono T. 2004. Changes in Characters of Soybean Glycinin Groups I, IIa, and IIb Caused by Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 1693-9.
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I. y Arakawa T. 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 1, 1-8.
- Umetsu M., Tsumoto K., Hara M., Ashish K., Goda S., Adschiri T. y Kumagai I. 2003. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *The Journal Biological Chemistry*. 278, 8979-87.
- Utsumi S., Gidamis A. B., Mikami B. y Kito M. 1993 Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 223, 177-178.
- Vivian J. T. y Callis P. R. 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical Journal* 80, 2093-2109.
- Wang Y y Zhang Y.H. 2009. Overexpression and simple purification of the *Thermotoga maritima* 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Escherichia coli* and its application for NADPH regeneration. *Microbial Cell Factories* 8, 30-40.
- Wetzel R. (1997) Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Advances in Protein Chemistry* 50, 182-242.
- Whitmore L. y Wallace B. A. 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, 668-673.

- Wijesekara I. y Kim Se-Kwon. 2010. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Marine Drugs* 8, 1080-1093.
- World Hypertension League. 2016. *Healthy Lifestyle Healthy Blood Pressure*. Disponible en <http://www.worldhypertensionleague.org/index.php/j-stuff/hypertension-globally>
- Wright D. J. 1988. The seed globulins- Part II. En *Developments in Food Proteins*. Hudson B. J. F (Ed.). Elsevier Applied Science pp. 119-177.
- Wright D. J. 1988. The seed globulins-Part II. In: Hudson B. J. F. (Ed.), *Developments in food proteins*. Elsevier Applied Science pp. 119-177.
- Xu J., Baase W. A., Baldwin E. y Matthews B.W. 1998. The response of T4 lysozyme to large-to-small substitutions within the core and its relation to the hydrophobic effect. *Protein Science* 7, 158-177.
- Yamaguchi H. y Miyazaki M. 2014. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* 4, 235-251.
- Zhi W., Landry S. J., Gierasch L. M., Srere P. A. 1992. Renaturation of citrate synthase: Influence of denaturant and folding assistants. *Protein Science* 1, 522-529.

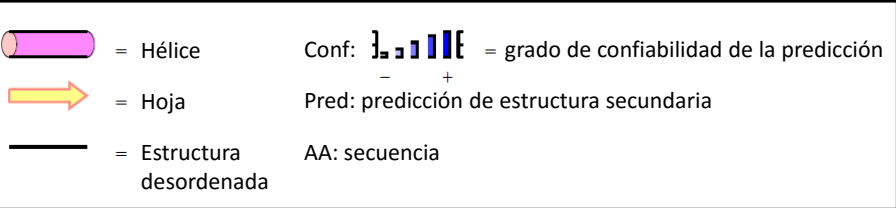
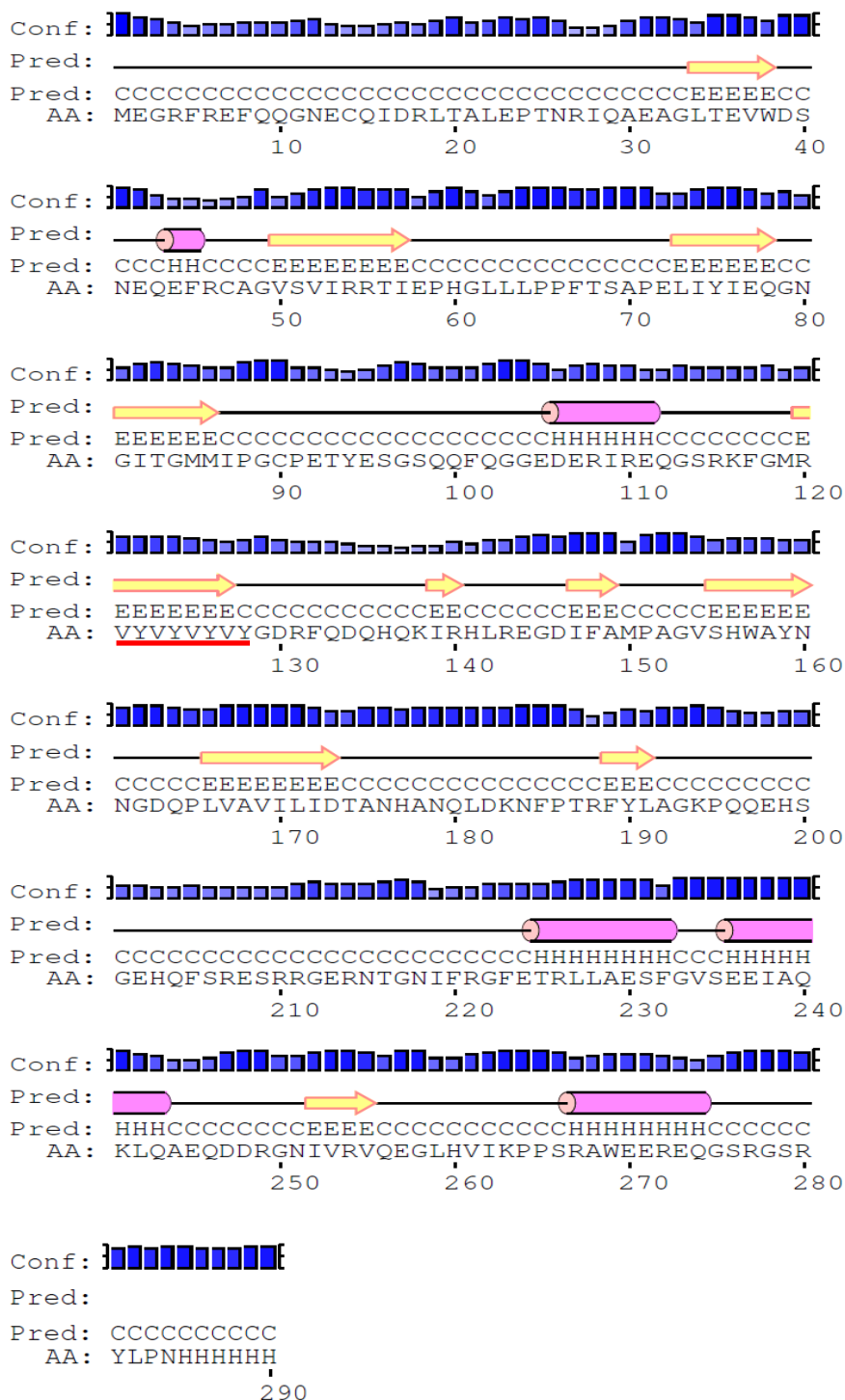
Apéndice A

Predicción de estructura secundaria con el servidor PSIPRED. El contenido de hebras β , hélice y estructura desordenada (asas y giros) coincide con la predicción del servidor RaptorX. En cada una de las ilustraciones que a continuación se presentan se describe el contenido de estructura secundaria de las proteínas recombinantes, también se muestra la secuencia de aminoácidos que corresponde a cada proteína y subrayado en rojo se resalta el(los) inserto(s) o insertos según corresponda.

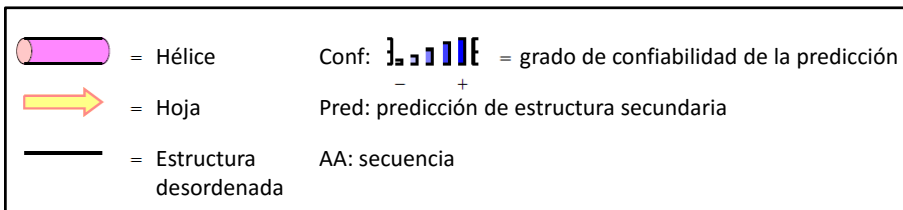
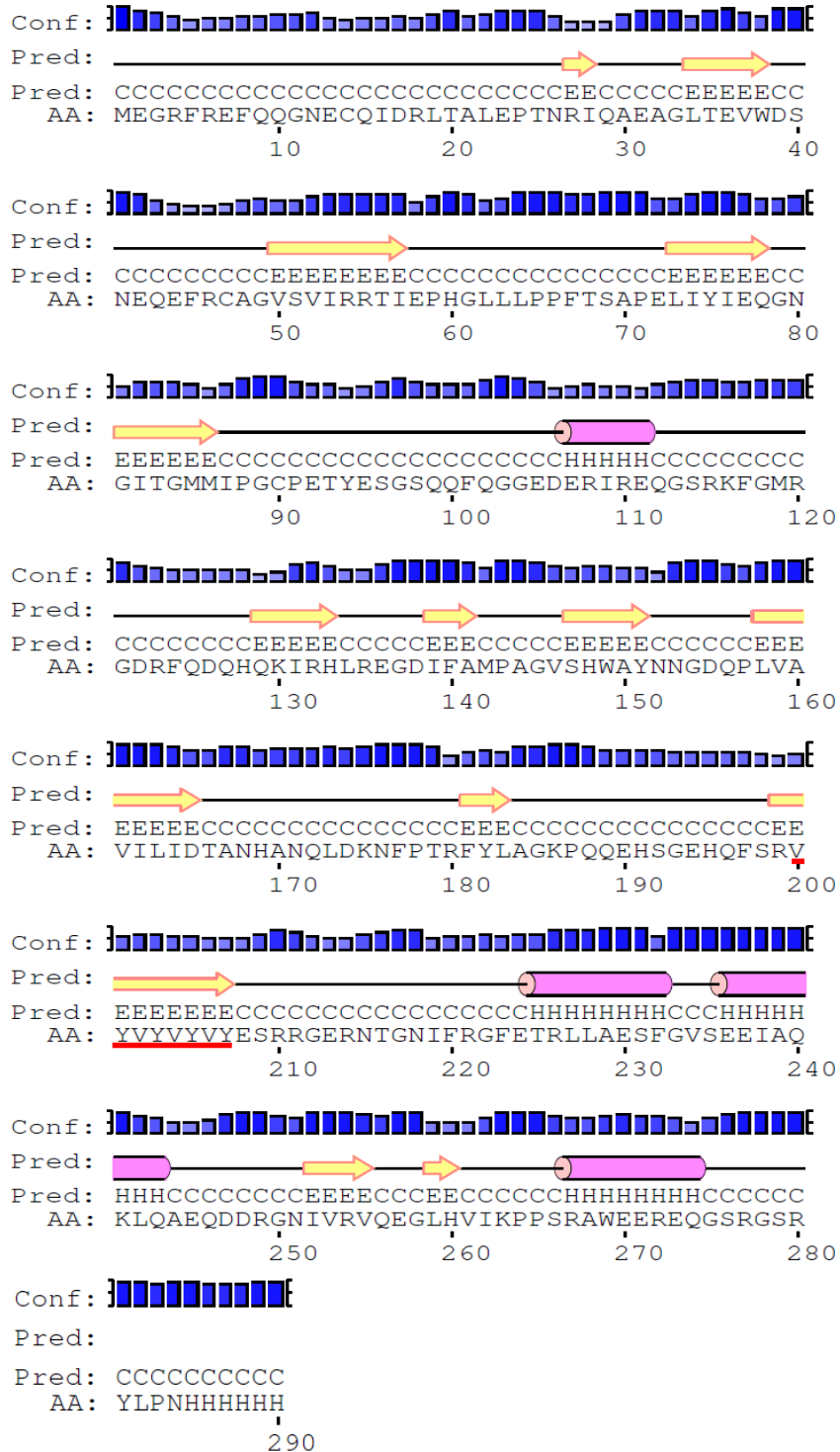
AAC



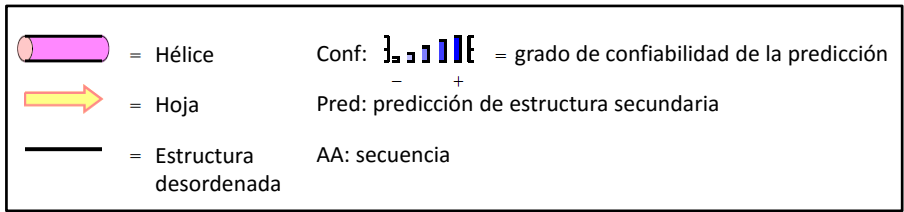
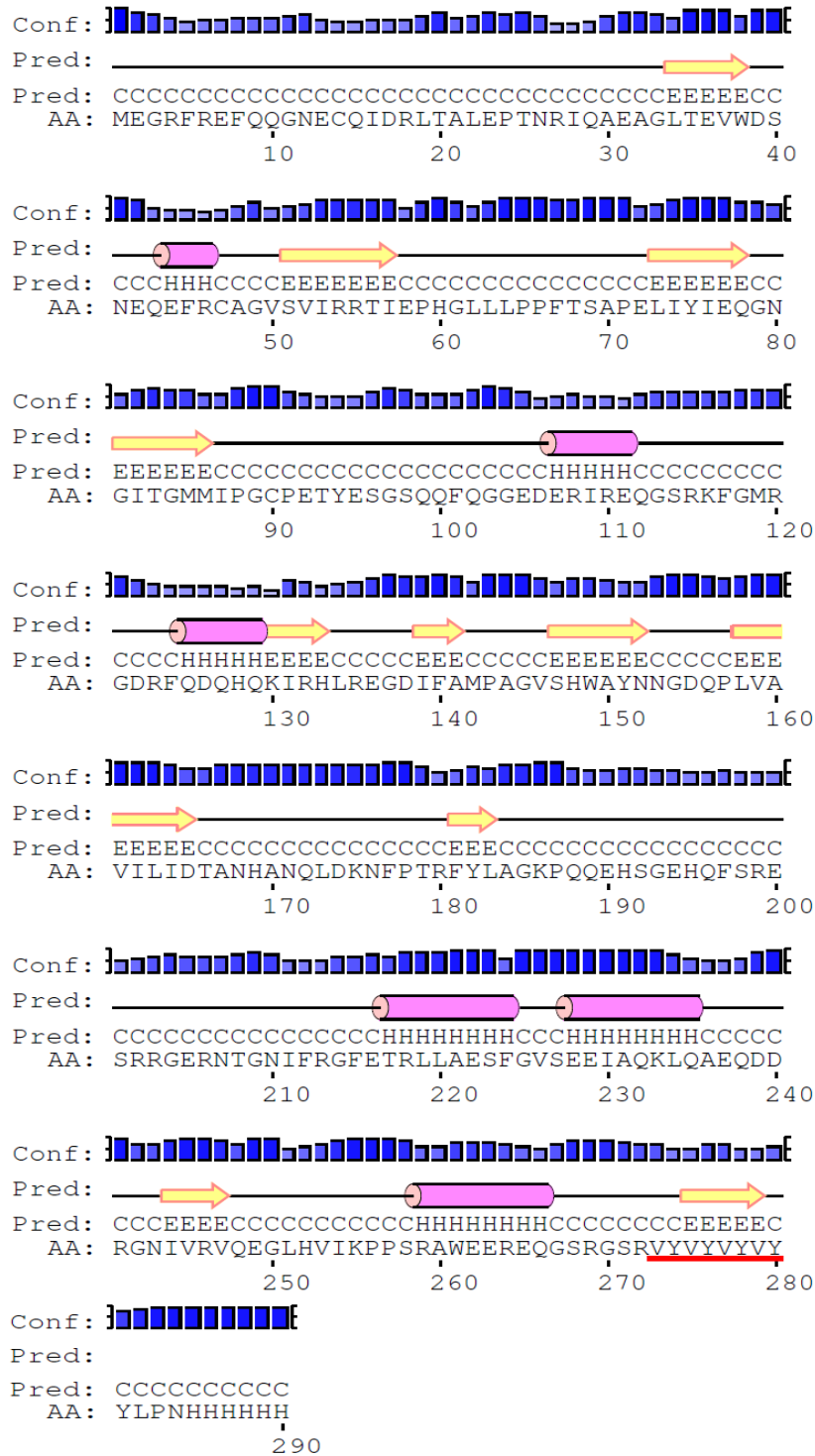
AACM.2



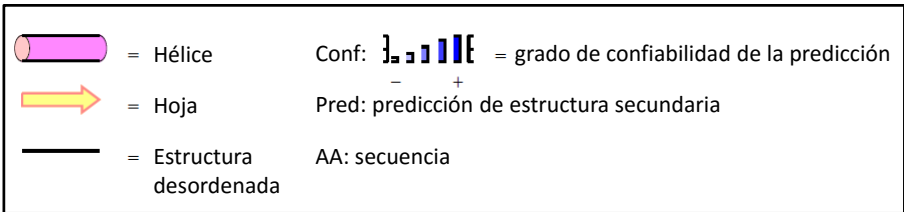
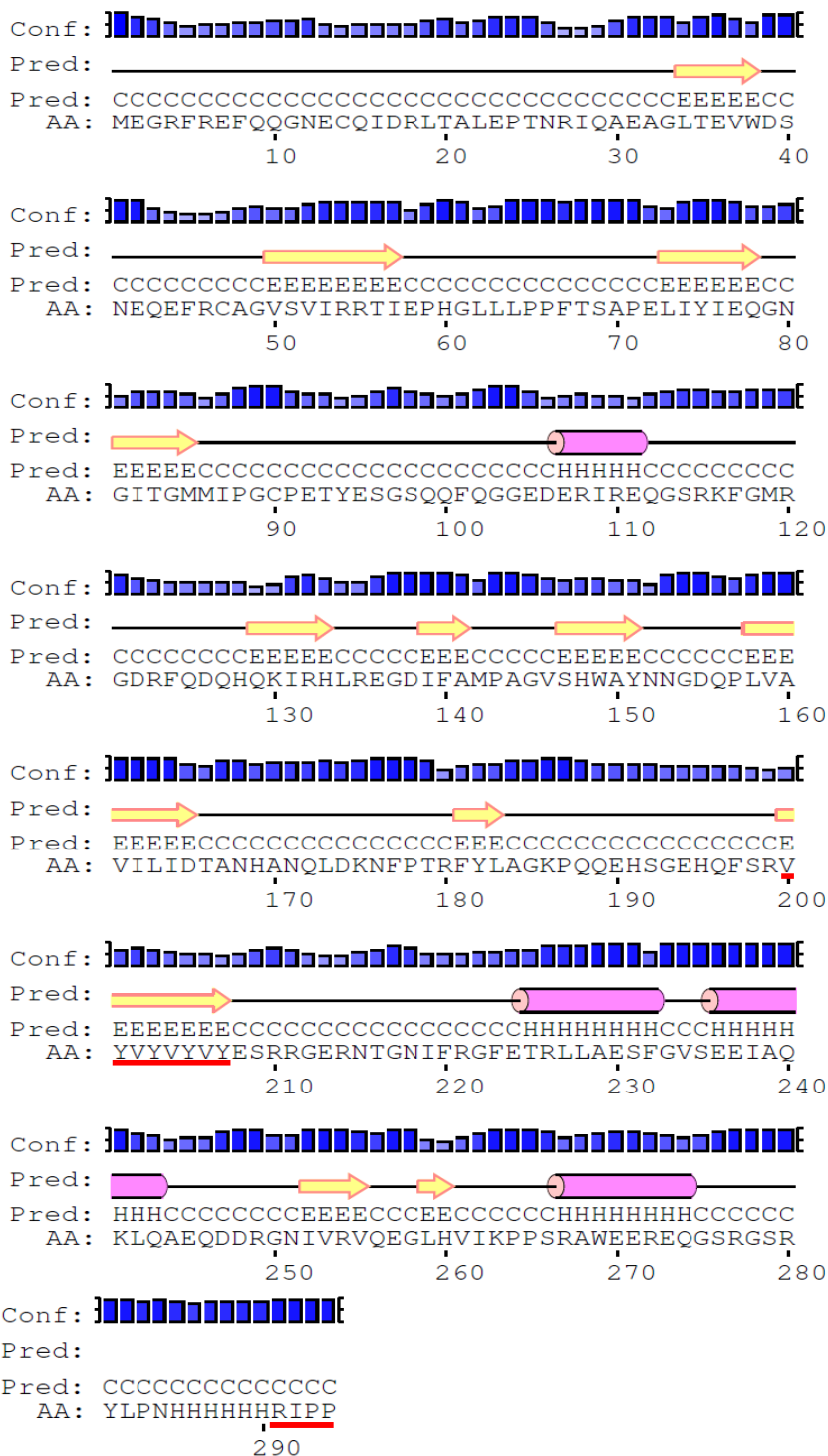
AACM.3



AACM.4



AACM3.4



Apéndice B

En la siguiente figura se muestran cuatro geles SDS-PAGE para el análisis densitométrico mediante paquetería Image Lab (Bio-Rad). También se muestra el resultado de la detección inmunológica por análisis tipo Western blot. En cada carril se cargaron aproximadamente 5 µg de proteína.

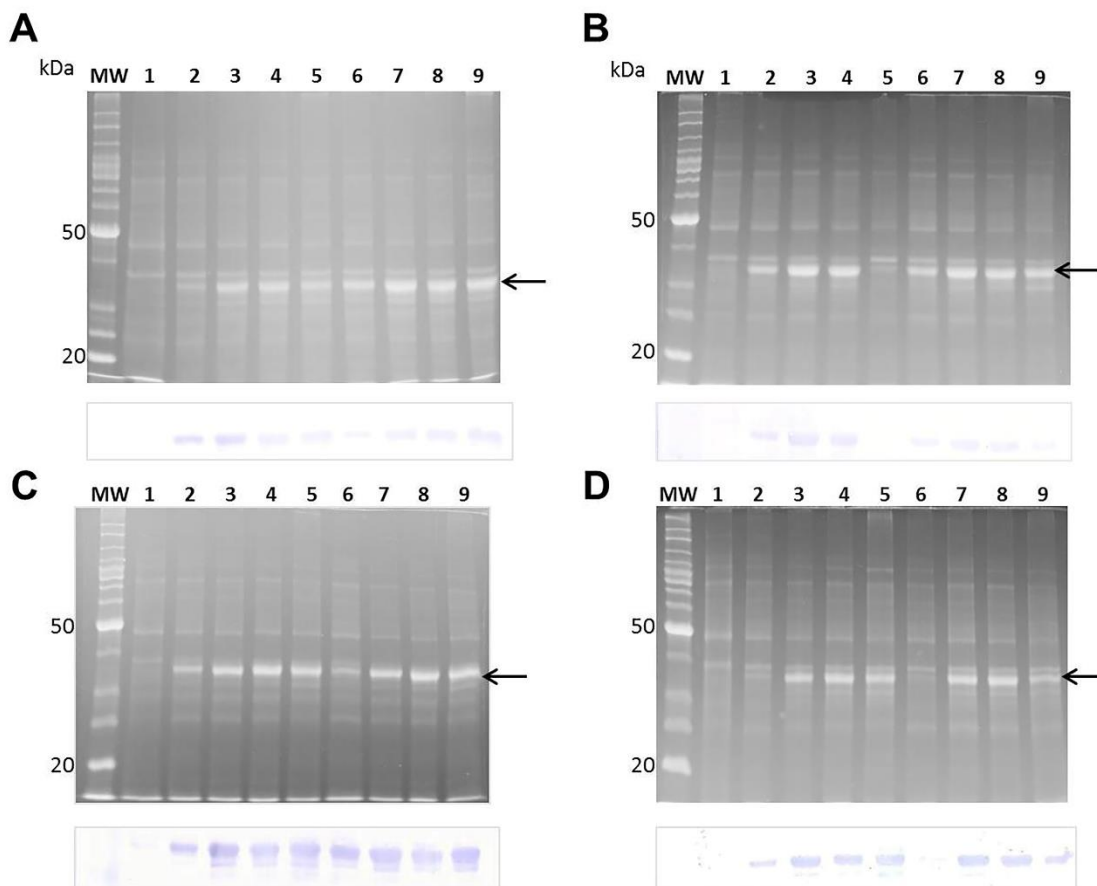


Figura 1. SDS-PAGE y Western blot de las proteínas recombinantes. **A.** AAC; **B.** AACM.3; **C.** AACM.4; **D.** AACM.3.4. Carriles: **MW**, marcador de peso molecular; **1**, 0 h de expresión; **2**, 1.5 h de expresión; **3**, 3 h de expresión; **4**, 6 h de expresión; **5**, 24 h de expresión en *E. coli* Rosetta 2; **6**, 1.5 h de expresión; **7**, 3 h de expresión; **8**, 6 h de expresión; **9**, 24 h de expresión en *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

Apéndice C

En las siguientes imágenes se presentan los cromatogramas y el gel SDS-PAGE de la purificación de cada una de las proteínas mutantes de AAC que contienen el inserto VYVYVYVY. La flecha roja en el cromatograma indica el pico que corresponde con la elución de la proteína modificada y en el gel se observa el perfil electroforético de las muestras colectadas que conforman el pico señalado. AACM.3 eluyó a 50 mM de imidazol, en cambio, AACM.1, AACM.2 y AACM.4 eluyeron a 125 mM de imidazol.

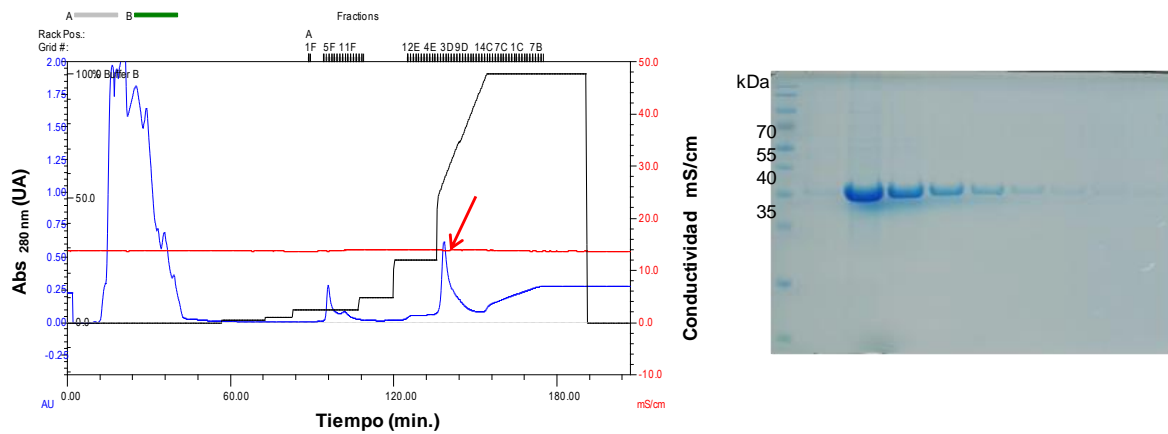


Figura 1. Proceso de purificación de AACM.1.

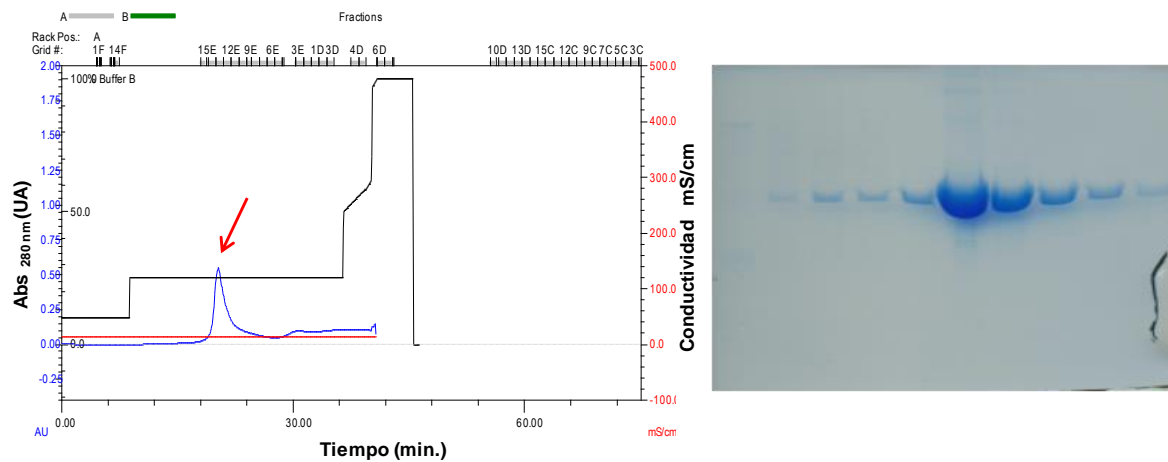


Figura 2. Proceso de purificación de AACM.2.

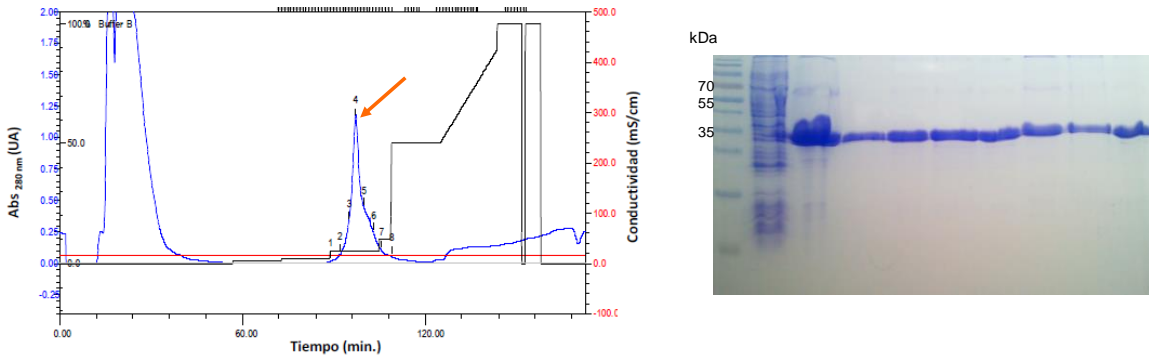


Figura 3. Proceso de purificación de AACM.3.

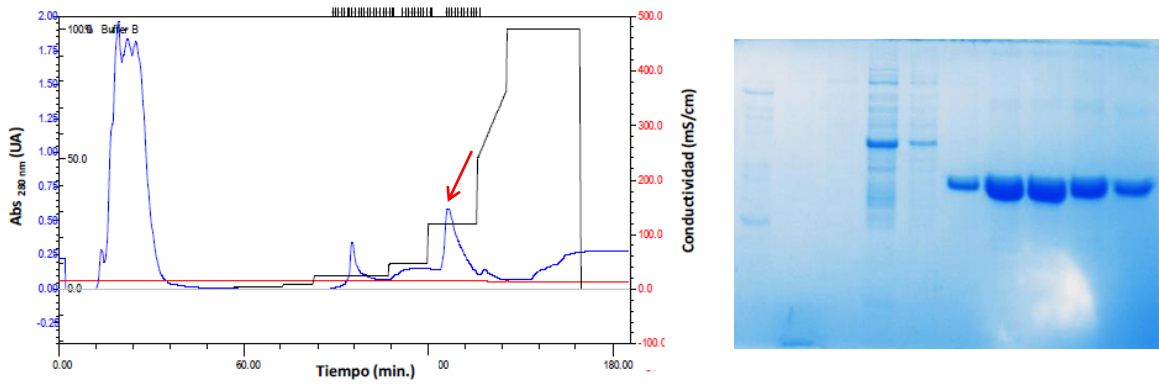


Figura 4. Proceso de purificación de AACM.4.

Apéndice D

A continuación, se presentan los gráficos que arrojó el servidor DICHROWEB de la predicción con el programa CDSSTR. En todos los casos, los datos experimentales se ajustan a los datos reconstruidos para la predicción del contenido de estructura secundaria.

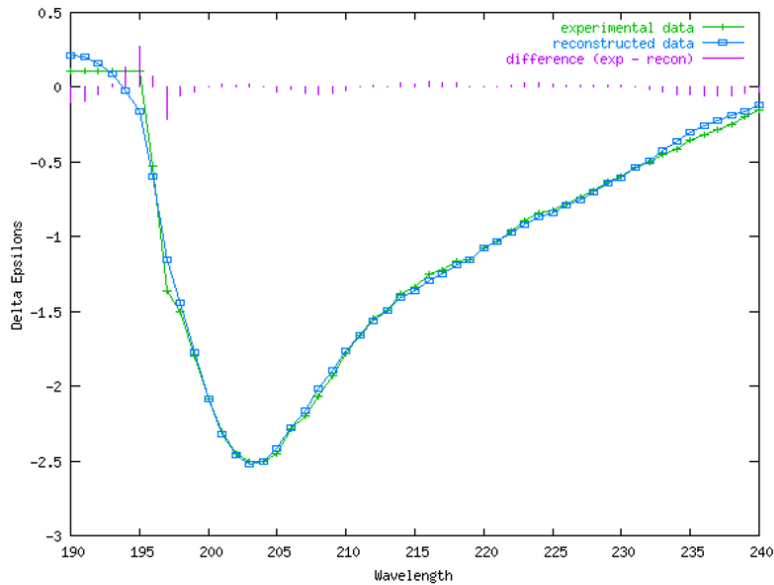


Figura 1. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AAC.

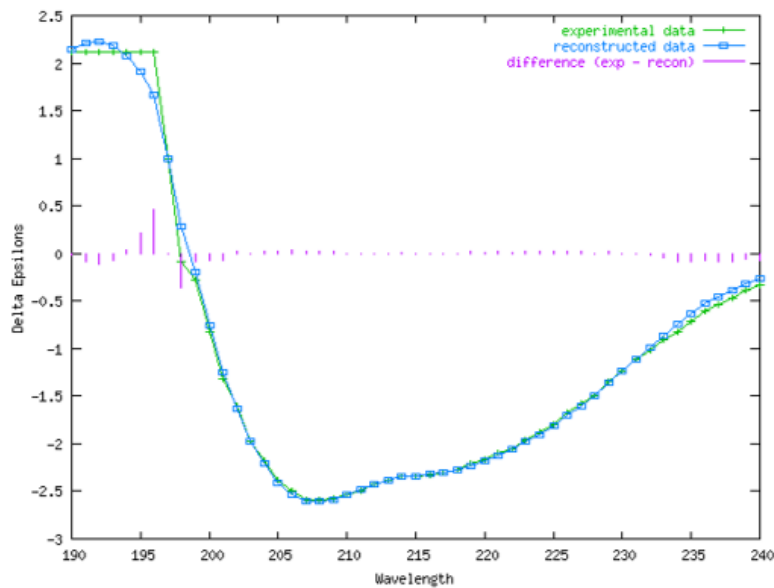


Figura 2. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AACM.1.

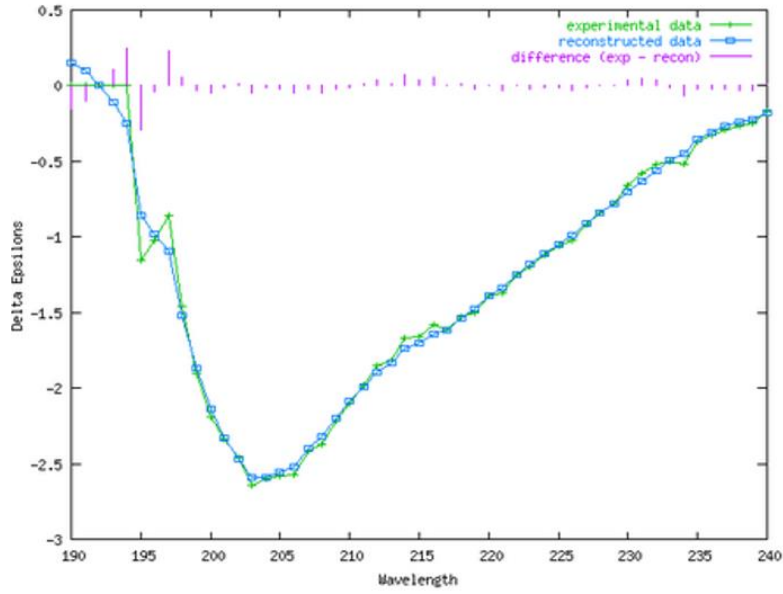


Figura 3. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AACM.2.

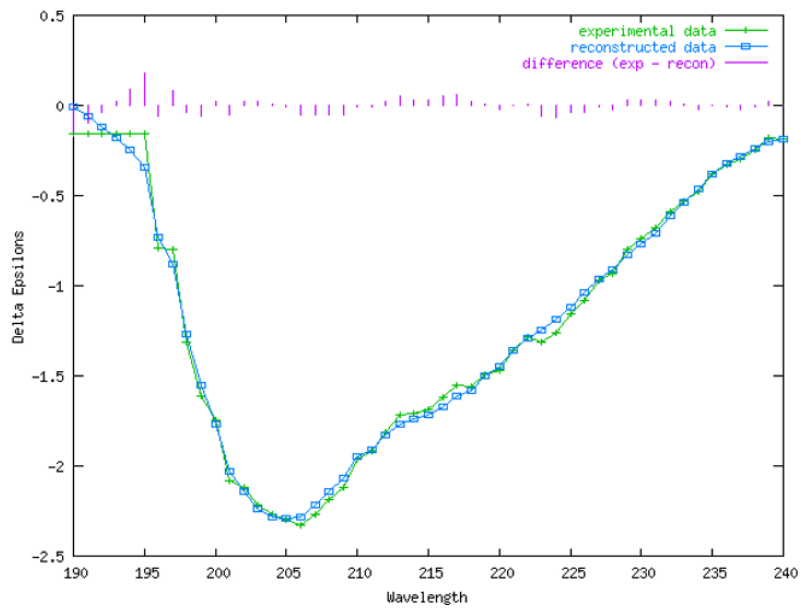


Figura 4. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AACM.3.

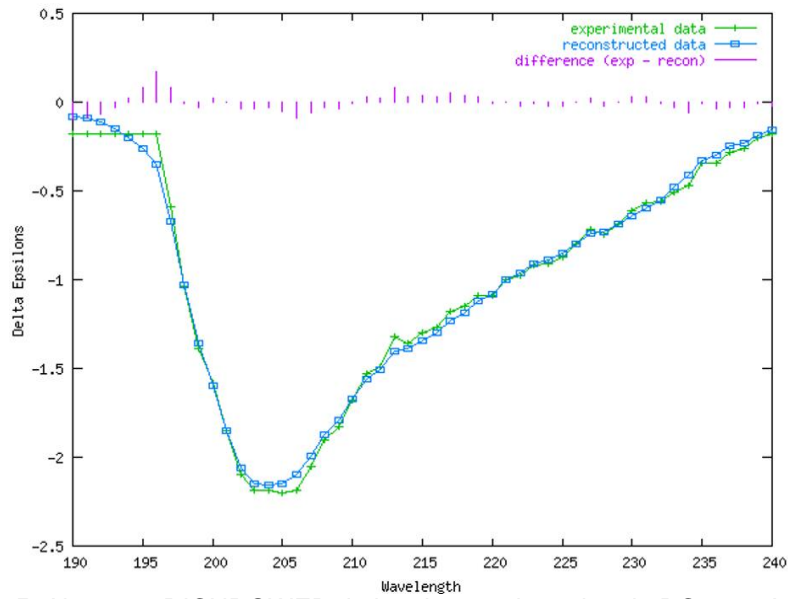


Figura 5. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AACM.4.

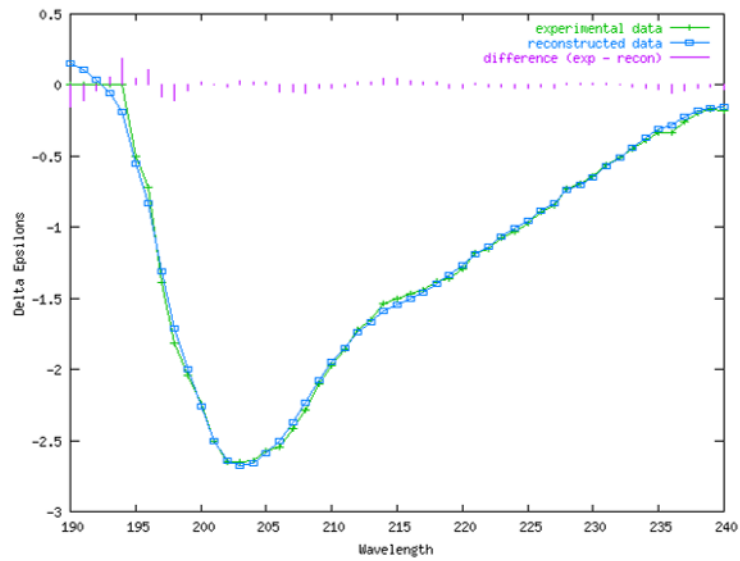


Figura 6. Ajuste en DICHROWEB de los datos colectados de DC para AACM.3.4.

Apéndice E

Las siguientes Figuras corresponden a las curvas de van't Hoff ($\ln K_{eq}$ vs $1/T$) de las transiciones de AAC, AACM,1 y AACM.4 obtenidas mediante DC.

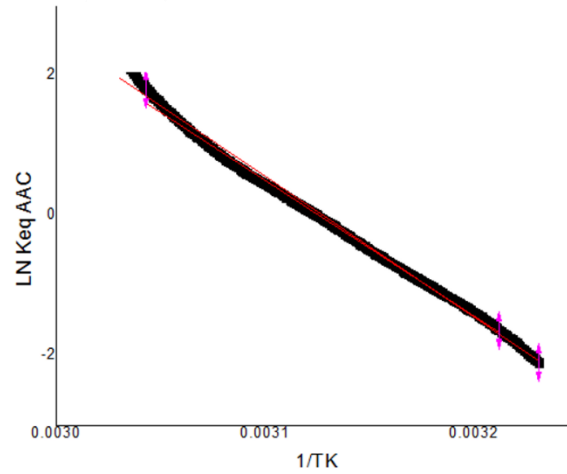


Figura 1. Curva de van't Hoff de AAC.

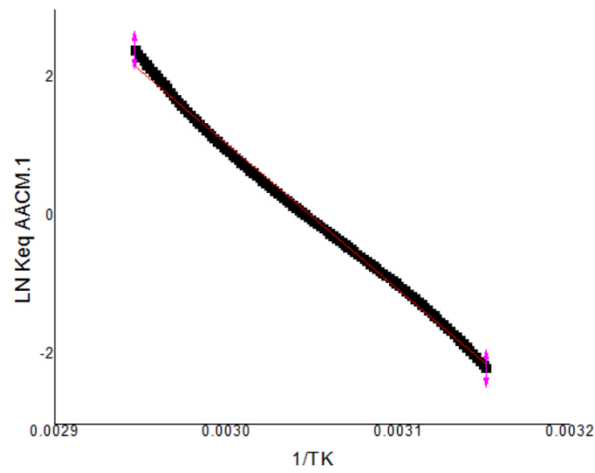


Figura 2. Curva de van't Hoff de AACM.1.

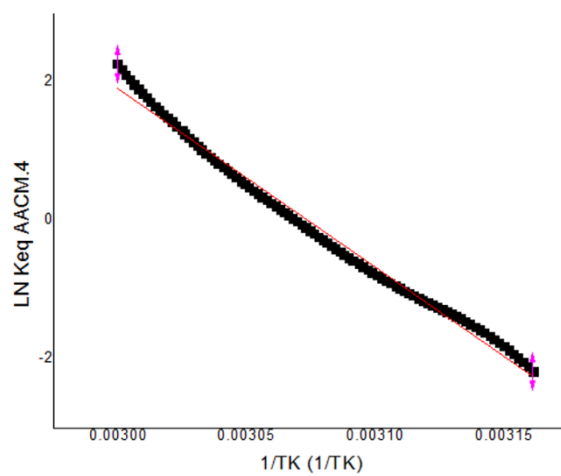


Figura 3. Curva de van't Hoff de AACM.4.