



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA ESTRICTOSIDINA BETA-GLUCOSIDASA A PARTIR DE CULTIVOS DE CÉLULAS DE *Uncaria tomentosa*.

Ileana Vera-Reyes²; Ariana A. Huerta-Heredia.³, Sánchez-Flores J.I.¹, Ponce-Noyola T.¹; Ramos-Valdivia A.C.¹
¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, D.F., México, CP 07360. ²Depto. de plásticos en la agricultura, Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coah., CP 25294. ³Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oax., CP 68301;
E-mail: aramos@cinvestav.mx

Palabras clave: *Estrictosidina beta-glucosidasa, alcaloides oxindólicos, Uncaria tomentosa*

Introducción. *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae); comúnmente llamada uña de gato produce alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) tal como la pteropodina, mitrafilina y sus isómeros. Estos AOM tienen actividad farmacológica inmunoestimulante, antitumoral, antileucémica y anti-inflamatoria (1). Estudios previos han demostrado que los AOM son biosintetizados en los cultivos de *U. tomentosa* por oxidación de los alcaloides indolterpénicos (AIT) y estimulados bajo condiciones de estrés oxidativo (2). La estrictosidina es el intermediario central en la biosíntesis de los alcaloides indólicos, al formarse este primer alcaloide glucoindólico es bioconvertido por la estrictosidina β -glucosidasa (SGD, E.C. 3.2.1.105) para la formación de los diferentes AIT (3). Cabe destacar que los estudios de las enzimas que regulan la formación de AOM son escasos, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar a la SGD de *Uncaria tomentosa* a nivel bioquímico y molecular.

Metodología. Se utilizó la línea celular de *Uncaria tomentosa* (green Uth-3), las condiciones de los cultivos celulares fueron de acuerdo a Huerta-Heredia *et al.* (2). Se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado de 3 L y uno de 7 L (Applikon, Schiedam, Holanda). La agitación de los cultivos fue realizado con una turbina de cuatro paletas a 90°, a una velocidad de 400 rpm; el flujo de aire de operación fue de 0.1 vvm y 1 vvm respectivamente. La adición de H₂O₂ se realizó al sexto día, la biomasa fue cosechada después de 24 h de la adición. El extracto proteico se obtuvo rompiendo las células en presencia de una solución amortiguadora de fosfatos 100mM pH 6.3, 3mM EDTA y 6 mM DTT. Se realizó una precipitación con sulfato de amonio 15-45 %, la muestra se desalo y purificó en una columna HiTrap Q FF 1 ml utilizando un ÄKTA FPLC (GE, Healthcare). La cuantificación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a Vera-Reyes *et al.* (3). El cDNA se obtuvo utilizando SMART RACE cDNA, (Clontech). Se utilizaron los cebadores específicos GSP1, 5'-GGGCTGAACCGCACAAATGATACAACAGAGG-3' y el cebador GSP2, 5'-CCTCTGTTGTATCATTGTGC GGTTTCAGCCC-3' en combinación con cebadores universales para generar los extremos 5'-cDNA y 3'-cDNA terminales respectivos.

Resultados. En la tabla 1 se encuentran los pasos del proceso de purificación de la SGD, las fracciones fueron analizadas en un gel de electroforesis (SDS-PAGE), una banda específica de aproximadamente 60 kDa se intensificó con los pasos de purificación. Esta banda fue

cortada y enviada al servicio de secuenciación de proteínas (Arizona proteomics). Se encontró que la secuencia KIGLDAYRFSISWSR, tuvo homología con regiones conservadas de β -glucosidasa involucradas en la biosíntesis de alcaloides. Los parámetros bioquímicos encontrados para esta enzima fueron pH óptimo de 6.3, k_m 1.096 mM, V_{max} de 43.58 nmol.s⁻¹mg⁻¹ y el producto de formación identificado fue catenamina.

Tabla 1. Purificación de la estrictosidina β -glucosidasa de células elicidadas de *U. tomentosa* y cultivadas en biorreactor.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (nmol.s ⁻¹)	Actividad específica (nmol.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	Factor purificación	Rendimiento
Extracto crudo	850	790.5	164.85	0.208	1	100
Precipitación ^a (45%)	50	76	49.78	0.655	3.2	30.2
Ultrafiltración	10	96	105.34	1.09	5.3	63.9
Mono Q FF ^b	2	1.14	12.89	11.31	54.4	7.8
Mono Q FF ^c	0.5	0.175	5.77	32.96	158.5	3.5

^a La cuantificación de la actividad se realizó luego de desalar la muestra (columna PD-10). ^{b,c} La cuantificación de la actividad se realizó luego de desalar la muestra y concentrarla utilizando columnas con una membrana 30 kDa CENTRICON YM-30 (Millipore).

El cDNA completo clonado obtenido de la *Ut_PSGD* se analizó mediante el programa ORF Finder (NCBI). La secuencia contiene un marco abierto de lectura de 1662 pb, codifica para 533 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de 63.32 kDa y un pI de 5.76. La secuencia de aminoácidos de la supuesta estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa* (*Ut_PSGD*) mostró una alta homología con glucosidasas de otras plantas. **Conclusiones.** Las características de la SGD de *U. tomentosa* tienen similitud con la enzima reportada de otras especies productoras de alcaloides indolterpénicos. **Agradecimiento.** CONACyT por la beca 173034 y Proyecto CB 105019 y 222097.

Bibliografía.

- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochem*, 66:5-29.
- Huerta-Heredia A.A., Marín-López R., Ponce-Noyola T., Cerda-García-Rojas C.M., Trejo-Tapia G. y Ramos-Valdivia A. C. 2009. Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Eng. Life Sci.* 3: 211-218.
- Vera-Reyes I, Huerta-Heredia AA, Ponce-Noyola T, Flores-Sanchez IJ, Esparza-García F, Cerda-García-Rojas CM, Trejo-Tapia G, Ramos-Valdivia AC. (2013). Strictosidine-related enzymes involved in the alkaloid biosynthesis of *Uncaria tomentosa* root cultures grown under oxidative stress. *Biotechnol Prog*. DOI: 10.1021/btpr.1723.