

AISLAMIENTO DE GENES ANTIOXIDANTES A PARTIR DE PLANTAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

González Negrete Joseline (1), León Galván Ma. Fabiola (2)

¹ [Licenciatura en Nutrición, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [josy_gonneg@hotmail.com]

² [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [fabiola@ugto.mx]

Resumen

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran presentes en los organismos vivos y que tienen la capacidad de retardar o prevenir la oxidación en presencia de oxígeno, se encargan de contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres que se caracterizan por tener uno o más de sus electrones desapareados, por lo que son altamente reactivos e inestables y contribuyen a desencadenar enfermedades como el cáncer. En los alimentos, principalmente en semillas que han reportado la presencia de complejos antioxidantes que actúan como un mecanismo de defensa intrínseco formado principalmente por enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y s-adenosilmetoninsintetasa. En este trabajo se planteó como objetivo el aislamiento de al menos un gen antioxidante a partir de semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia*. La extracción de RNA de la semilla se realizó siguiendo el método de Trizol^{MR}, la síntesis de cDNA se obtuvo de acuerdo a lo descrito en el protocolo SMART de invitrogene, y finalmente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo un amplicón de 430 pb que corresponde a lo esperado para el gen que codifica para la superóxido dismutasa (SOD), el cual coincide con otras SOD reportadas en Amarantho, Chia, Chan.

Abstract

Antioxidants are substances that are present in living organisms and that they have the ability to delay or prevent oxidation in the presence of oxygen, are responsible for counteract the harmful effects of free radicals that are characterized by one or more of their electrons unpaired, which are highly reactive and unstable and contribute to trigger diseases such as cancer. In food, mainly in seeds that have reported the presence of antioxidants complexes that act as a defense mechanism intrinsic formed mainly by enzymes such as superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and s-adenosylmetoninsintetase. This paper aimed pose isolating at least one antioxidant gene from seed *Cucurbita argyrosperma sororia*. The mRNA of the seed was performed following the method Trizol^{MR}, cDNA synthesis was obtained according to what described SMART protocol Invitrogene, and finally through the polymerase chain reaction (PCR), was obtained an amplicon of 430 bp, it is corresponding to that expected for the gene encoding superoxide dismutase (SOD), which coincides with other SOD reported in Amaranth, Chia, Chan.

Palabras Clave

Cucurbita argyrosperma sororia; especies reactivas de oxígeno; enzimas antioxidantes; Superóxido dismutasa.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, muchos de los problemas de salud son causados por estrés oxidativo que se produce cuando la exposición a los radicales libres es mayor a lo que los antioxidantes son capaces de neutralizar. Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de retardar o prevenir la oxidación contrarrestando los efectos nocivos de los radicales libres. Este proceso se presenta de forma natural, ya que la utilización del oxígeno por las células genera metabolitos tóxicos, denominados especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS, por sus siglas en inglés) [1]. Las ERO incluyen moléculas con un electrón impar, llamadas radicales libres, como el anión superóxido y también agentes oxidados como el peróxido de hidrógeno. Las ERO pueden reaccionar con muchas moléculas y pueden producir un daño no controlado [2]. Los compuestos químicos y las reacciones capaces de generar especies reactivas del oxígeno con potencial tóxico pueden reconocerse como pro-oxidantes. Por otra parte, a los compuestos y reacciones que eliminan estas especies, disponen de ellas, suprimen su formación o se oponen a sus acciones se les conoce como antioxidantes. En una célula normal existe un equilibrio apropiado entre pro-oxidantes y antioxidantes. No obstante, este balance puede desplazarse hacia los pro-oxidantes cuando la producción de estas especies aumenta de modo considerable. Tal circunstancia se presenta después de la introducción en el organismo de ciertos fármacos o venenos insecticidas y/o pesticidas. El desbalance puede presentarse, además, cuando la concentración de antioxidantes disminuye, ya sea debido a una mala nutrición como la hipovitaminosis E, o a un fallo funcional de alguna de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante del organismo [3]. El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este [3]. El complejo antioxidante del organismo humano tiene también miembros exógenos y endógenos. Entre los primeros están las vitaminas antioxidantes esenciales (A, C, E) y microelementos, entre los que figuran metales como el hierro (Fe) y el selenio (Se); endógenamente tienen un papel protagónico las

enzimas oxidorreductasas donde se encuentran la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, ascórbato peróxidasa, guaiacol peroxidasa, entre otras, las cuales son moléculas scavengers o desactivadores de radicales libres [4][5]. Los sistemas de regulación enzimática de los niveles de EROs son unos de los mecanismos más importantes de controlar los efectos de estos, la primera enzima en interactuar con los EROs es la superóxido dismutasa (SOD), estas catalizan la reacción del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno; existen 3 diferentes superóxido dismutasa, se han descrito tres isoformas de ella, la dependiente de manganeso Mn-SOD, la dependiente de hierro Fe-SOD y la dependiente de cobre y zinc Cu-Zn-SOD. En general, las CuZnSOD se encuentran en cloroplastos, peroxisomas y citosol, las MnSODs en mitocondrias y peroxisomas y las FeSODs en cloroplastos. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua. La glutatión peroxidasa reduce los lípidos en alcohol y reduce el peróxido de hidrógeno en agua; la glutatión sintetasa es la responsable mayoritaria de la actividad antioxidante celular y por lo tanto es una de las enzimas más importantes en la desintoxicación de las EROs [6]. Por lo descrito anteriormente, los mecanismos de defensa antioxidantes presentes en el humano, no siempre son suficientes para contrarrestar el daño por estrés oxidativo, contribuyendo al desarrollo de enfermedades crónicas principalmente como el cáncer, en ese sentido, se ha propuesto que la dieta ingerida puede suplementarse con ingredientes ricos en antioxidantes, por lo tanto tomando como referencia el alto contenido proteico de alrededor del 30% de la semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* (Chicayota) y que en estudios proteómicos se ha encontrado que a nivel de péptidos un alto potencial bioactivo como antioxidante estable [9], en este trabajo se plantea como objetivo el aislamiento de al menos un gen antioxidante de la semilla de chicayota.

MATERIALES Y MÉTODOS

La semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia*, fue proporcionada por la Dra. Mayela Bautista Justo, de la Universidad de Guanajuato. Para la detección de genes antioxidantes fue necesario

realizar extracción de RNAm de la semilla, se realizó de acuerdo a las indicaciones del kit trizol (invitrogen). Para analizar la calidad del RNAm obtenido se realizó una electroforesis de agarosa al 0.8% utilizando como cromóforo gelred, el resultado visualizó en el fotodocumentador BioRad. Posteriormente a partir de 100ng de RNA de buena calidad se realizó la síntesis de cDNA siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante del kit SMART PCR cDNA Synthesis, de Clontech. Para la detección de genes antioxidantes se utilizaron 2 oligonucleotidos para detectar la presencia de SOD y 1 juego de oligonucleotidos para detectar la presencia de SAMS, oligonucleotidos empleados fueron diseñados previamente tomando como referencia secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, las secuencias diseñadas se presentan en la tabla 1. La detección molecular se realizó con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), en la estandarización de las condiciones de amplificación se utilizó como control el gen constitutivo de actina [7], y se prepararon las siguientes mezclas de reacción en cuatro tubos por separado, para cada reacción lo único que varió fue el par de oligonucleotidos empleados de acuerdo al gen a detectar: 1.7 μL de MgCl_2 (50 mM), 2.5 μL de amortiguador (10X), 1 μL de oligonucleótido Fw (10 μM), 1.4 μL de oligonucleótido Rv (10 μM), 0.7 μL de dNTPs (10mM), 0.5 μL de cDNA (100ng), 0.3 μL de *Taq* polimerasa (invitrogen). finalmente el volumen de reacción se ajustó a 25 μL con agua desionizada estéril. La amplificación se realizó en el termociclador DUAL de BioRad con las siguientes condiciones: Un ciclo con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos minutos, temperatura de alineamiento de 57, 57, 55.2°C por 1 minuto (SOD, SAMS, actina respectivamente), y polimerización de 72°C por 1.15 minutos; concluidos los 35 ciclos se dio una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para el aislamiento del gen antioxidante se realizó una ligación del producto del gen amplificado en el plasmido PCR-TOPO 4, manteniendo una relación 3:1 (inserto:vector), la ligación se realizó con 1 μL del vector, 3 μL de DNA (inserto), 1 μL de solución salina y 1 μL de agua milliQ a un volumen final de 6 μL , se incubó a 23°C durante 2 h. El producto de

la ligación fue transformado por choque térmico (42°C por 45 segundos) en la cepa de *E. coli* DH5 α . Para validar la clonación del gen, la clonas transformantes se crecieron en medio LB con kanamicina (50mg/mL) y se obtuvo DNA plasmido siguiendo el método de miniprep CTAB. Finalmente el DNA plasmido fue digerido con la enzima *Eco* RI la reacción se realizó con 5 μg de ADN plasmídico, buffer de reacción 1X, ajustado con agua un volumen final de 20 μL , se incubó a 37°C por 1 hora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de RNA y síntesis de cDNA de semilla de Cucurbita argyrosperma sororia

La calidad del RNA obtenido de la semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* como se observa en la imagen 1, carril 2, fue de buena calidad, se observan bandas bien definidas que corresponden a los ribosomales, lo que indica que el RNA se encuentra integro y sin evidencia de que se este degradando, adicionalmente el barrido que se observa representa los transcritos de alto y bajo tamaño molecular, esto es altamente recomendable sobre todo cuando lo que se pretende es aislar genes que no han sido reportados previamente en ese organismo. Del RNA enriquecido en mensajeros se obtuvo el cDNA, como puede observarse en la imagen 1, carril 3, es un barrido intenso en todo el carril, esto indica que todos los transcritos (dado que viene de RNAm) de alto y bajo tamaño molecular están

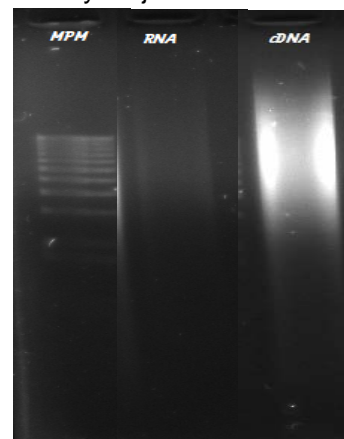


IMAGEN 1: Análisis de calidad de RNA y obtención de cDNA. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. RNA. Carril 3. cDNA.

igualmente representados en la síntesis por retrotranscripción, lo anterior garantiza que independientemente del tamaño del gen antioxidante, es posible aislarlo.

Detección de genes antioxidantes

La detección de genes antioxidantes se realizó a partir de cDNA, usando como control positivo el gen constitutivo actina. Respecto a los genes de interés, se estandarizaron las condiciones de amplificación obteniendo para actina un amplicon de 350 pb (imagen 2, carril 2), mismo que corresponde a lo reportado por Navarro, 2012 [7], con este resultado se comprobó que el cDNA era de buena calidad y estaba integro. Con relación a los genes antioxidantes, para SAMS, aunque se modificaron las condiciones no fue posible obtener amplificación (imagen 2, carril 3), para el caso de SOD, con las condiciones descritas, con el juego de oligonucleotidos 2 se obtuvo un amplicon de 470 pb (imagen 2, carril 4), por el tamaño del amplicon y de acuerdo a los oligos utilizados corresponde al esperado, es importante resaltar que los oligonucleotidos (SOD2 Fw y SOD2 Rv) fueron diseñados para obtener el ORF o marco de lectura abierto completo del gen; de acuerdo al resultado obtenido y con base a la literatura citada se encontró que es similar al reportado en amaranto, nuez, y chia [7][8]. Adicionalmente se ha reportado que este tipo de enzimas son altamente conservadas en la escala filogenética, y este nivel de conservación a nivel de ácidos nucleicos es aún más fuerte en plantas [8]. La conservación genética, puede deberse a la importante función que juega la SOD al ser el primer mecanismo de defensa contra los radicales libres.

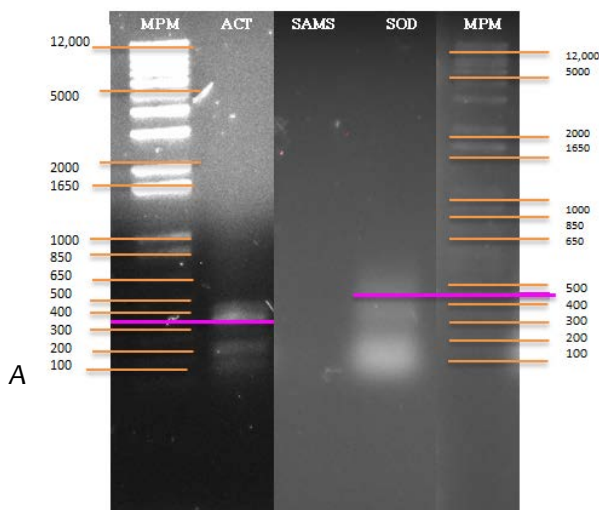


IMAGEN 2: Detección de antioxidantes. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. Actina. Carril 3. SAMS. Carril 4. SOD. Carril 5. MPM

El amplicon de 470 pb amplificado por PCR para el gen SOD, fue exitosamente ligado en el plasmido PCR TOPO 4, y clonado la cepa bacteriana de *E.coli* DH5 α . En la transformación genética se tuvo una baja eficiencia, tan solo se obtuvieron 4 clonas, aunque las cuatro clonas crecieron correctamente en medio LB más antibiotico (ampicilina/kanamicina 50mg/mL), este resultado indicó de manera preliminar que las clonas eran positivas, dado que la resistencia al antibiotico en la bacteria se logra cuando el inserto (gen de interés) esta correctamente ligado en el plasmido. Para comprobar que efectivamente se tenia el gen SOD aislado y clonado, se realizó el análisis de restricción de DNA plasmidico, la cual indicó que las clonas eran positivas, como puede observarse en la imagen 3, en los carriles del 2 al 6 la banda de mayor tamaño molecular corresponde a DNA genómico de la bacteria, las bandas entre aproximadamente 4500-5000 pb corresponde a DNA plasmidico y el fragmento liberado en la restricción enzimática de aproximadamente 470 pb, corresponde al amplificado por PCR para el gen que codifica para la superóxido dismutasa. Las clonas con el gen SOD aislado de semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* se almacenaron en criopreservación y a partir del DNA plasmidico se está secuenciando.

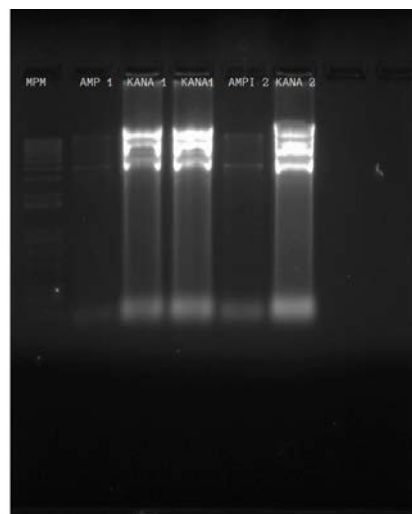


IMAGEN 3: Análisis de restricción de DNA plasmidico de clonas positivas para el gen SOD. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2 y 5. Restricción de DNA plasmidico de clonas con resistencia a ampicilina. Carril 3,4 y 6. Restricción de DNA plasmidico de clonas con resistencia a ampicilina.

CONCLUSIONES

La semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* es una fuente natural de antioxidantes endógenos, y fue posible la detección molecular y el aislamiento del gen que codifica para enzima superóxido dismutasa.

AGRADECIMIENTOS

Los co-autores agradecen a Ciencia Básica SEP-CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto 182549. Agradecen también a la M. C. Fatima Monserrat Mejía Salazar por el apoyo técnico brindado.

REFERENCIAS

- [1] García, B., Saldaña, A.B., Saldaña, L.G. (2012). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 12(2), pp. 187-196
- [2] Carrillo, E.R., Ponce, M.J.A., Peña, P.C.A., Flores, R.O.I., Neri, M.R., Zepeda, M. A.D., Pérez, C.A.A, Ortiz, T. A. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de Facultad de Medicina, UNAM*. 59 (1), 026-1742
- [3] Venereo, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), pp.126-33.
- [4] Benítez, D.E. (2006). Vitaminas y oxirreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25 (2), pp. 13-26.
- [5] Hung, S., Yu, C., Lin, C. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, pp. 1-10.

- [6] Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 142, pp.136-159.
- [7] Navarro-León, M.J. (2013). Caracterización molecular y funcional de genes del complejo antioxidante de nuez (*Carya illinoensis*). Irapuato, Gto., Tesis de Maestría en Biociencias-DICIVA-UG.
- [8] Montero-Morán G.M., Sampedro, J.G., Saab-Rincón, G., Cervantes-González, M.A., Huerta-Ocampo, J.A., De León-Rodríguez, A., Barba de la Rosa, A.P. (2015). Biochemical and Molecular Characterization of a novel Cu/Zn Superoxide Dismutase from *Amaranthus hypochondriacus* L.: an Intrinsically Disordered Protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176, pp. 2328-2345.

Tabla 1: Oligonucleótidos para detección de los genes antioxidantes SOD y SAMS.

Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón	Fuente
SOD1 Fw SOD1 Rv	5' TGGCCATGGGCAAGGGCGTGACTG 3' 5' CATAATAACCAGAAGTTCCAGAGCTC 3'	470 pb	[7].
SOD2 Fw SOD2 Rv	5' GGDGAYACHACMAAYGGNTG 3' 5' CHGGNAAYGCWGGHGS MAG 3'	280 pb	[7].
SAMS Fw SAMS Rv	5' CNGTNAAYGARGGNCAAYCCHG 3' 5' GCDGCHTAYGGNCAYYTYGG 3'	1086 pb	[7].