

# AISLAMIENTOS DE GENES ANTIOXIDANTES DE LA SEMILLA DE CHICAYOTA

Triana Acevedo Lupita Herminia (1), León Galván Ma. Fabiola (2)

1 [Ing. en Agronomía, Instituto Tecnológico de la Zona Olmeca] | [VAMPIRE-LOVERS@outlook.com]

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

## Resumen

El estrés oxidativo contribuye en gran medida al desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (ECNT), las cuales se presentan cuando el equilibrio se rompe a favor de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO'S). Las ERO'S son radicales libres (electrones desapareados). El radical peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es transformado en agua y oxígeno por efecto de la enzima antioxidante catalasa. Las enzimas antioxidantes actúan en los procesos de óxido-reducción, previniendo la oxidación ya que suprimen o se oponen a la acción de agentes pro-oxidantes, contrarrestando los efectos nocivos de los radicales libres, que son altamente reactivos e inestables y contribuyen a desencadenar enfermedades coronarias, cáncer, dermatitis, entre otras. En este trabajo se pretende aislar el gen Cat de la semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia*. La extracción de RNAm de la semilla se realizó siguiendo el método de Trizol®, la síntesis de cDNA se obtuvo de acuerdo a lo descrito en el protocolo de síntesis de DNA complementarios, y finalmente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizaron pruebas de estandarización de las condiciones de PCR para identificar la presencia de gen antioxidante.

## Abstract

Oxidative stress contributes greatly to the development of chronic degenerative diseases (NCDs), which occur when the balance is broken in favor of the generation of reactive oxygen species (ERO'S). Son of free radical (ERO'S) (unpaired electrons). The radical hydrogen hydroxide ( $H_2O_2$ ) is transformed into water and oxygen by the effect of the enzyme catalase antioxidant. Antioxidant enzymes act in the oxidation-reduction processes, preventing oxidation and suppressing oppose the action of pro-oxidants, counteracting the harmful effects of free radicals, which are highly reactive and unstable and contribute to triggering coronary diseases, Cancer, dermatitis, among others. In this work refers to isolate the Cat gene from the seed of *Cucurbita argyrosperma sororia*. The extraction of mRNA from the seed was performed following the Trizol® method, the cDNA synthesis was obtained according to the described in the DNA synthesis protocol complementary, and finally by the medium of the reaction in the chain of the Polymerase chain reaction (PCR). PCR standardization tests were performed to identify the presence of the antioxidant gene.

### Palabras Clave

*Cucurbita argyrosperma sororia*; enzimas antioxidantes; especies reactivas de oxígeno; Catalasa.

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es una causa significativa de daño al ADN que provoca mutaciones e inestabilidad genética, ambos implicados en la carcinogénesis. Las especies reactivas son moléculas muy inestables y el daño al ADN se considera el suceso crucial en la carcinogénesis. Si las mutaciones ocurren en genes críticos en el desarrollo del cáncer en células germinales, pueden dar lugar a un incremento del riesgo de cáncer en la descendencia. Por otra parte, si las mutaciones afectan estos genes críticos en células somáticas pueden originar el cáncer. [1]

Entre las moléculas que se consideran ERO se encuentran los radicales libres, los cuales pueden ser definidos como átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados. [2]

El término “radical libre” enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia (enlace por compartición de electrones). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos. Como producto de nuestro metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como: Especies Reactivas de Oxígeno (ERO: el anión superóxido, el anión peróxido, el radical perhidroxilo, el radical hidroxilo). [3]

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 [4]

Los sistemas de regulación enzimática de los niveles de EROs son unos de los mecanismos más importantes de controlar los efectos de estos. 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. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas -lípidos, proteínas, ADN, etc.- funcionalmente vitales o más importantes. Características de las enzimas antioxidante: Catalasa (CAT). Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno [5]

Por lo cual puntualizado previamente, los mecanismos de defensa antioxidantes presentes en el humano, no siempre son suficientes para neutralizar el daño por estrés oxidativo, contribuyendo al desarrollo de enfermedades crónicas principalmente como el cáncer, dermatitis, envejecimiento, enfermedades coronarias 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 se *Cucurbita argyrosperma sororia* (Chicayota) y que en estudios proteómicos se ha encontrado que a nivel de péptidos un alto potencial bioactivo como antioxidante estable, en este trabajo se planteó como objetivo el aislamiento de al menos un gen antioxidante de la semilla de chicayota.[4].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se utilizó semilla de Chicayota (*Cucurbita argyrosperma* sororia), proporcionadas por un agricultor local de Ometepec, Azoyú y Marquelia Gro.

### Identificación del gen Catalasa

Extracción de RNA de Chicayota por el Método de Trizol

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 1% utilizando el bromuro de etidio, para teñir los geles, el resultado se visualizó en el fotodocumentador BioRad.

De TRIZOLExtracción de RNA de Chicayota por el Método Cloruro de Litio

Para la extracción de RNA, todo el material se trató previamente con etanol-DEPC por un mínimo de 3 horas y posteriormente se esterilizó a 121 °C 15 min a 15 lb, una vez esterilizados se mantuvieron a -20°C hasta su uso. La extracción de RNA se realizó empleando el método de Cloruro de Litio reportado por Manny, 1995; modificado por Barrera y León 2008. El RNA obtenido se analizó en gel de agarosa desnaturante al 1% teñido con bromuro de etidio y se visualizó por luz UV en el fotodocumentador Gel Logic 100 Imaging System de Bio-Rad.

### Síntesis de la Doble Cadena de DNA

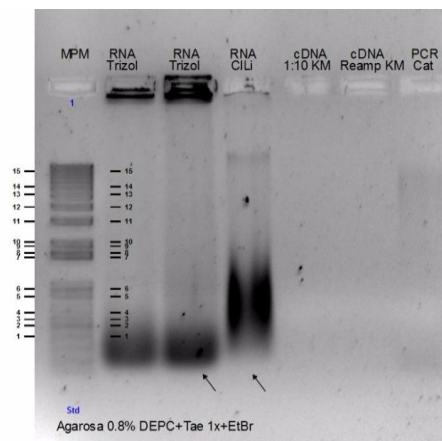
La síntesis de cDNA se realizó de acuerdo a lo descrito en el protocolo SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit User Manual de Clontech. Para la amplificación se utilizó el termociclador DUAL de BioRad con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo con una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 34 ciclos con una temperatura

de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento de 65°C por 45 segundos y una de polimerización de 72°C por 6 minutos, finalmente se dio un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

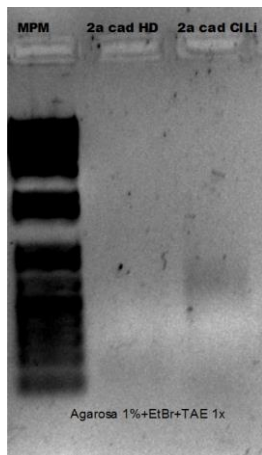
### Obtención de RNA y síntesis de cDNA de semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia*

La calidad del RNA obtenido de la semilla de *Cucurbita argyrosperma sororia* como se observa en la imagen 1, carril 2, 3 y 4 fueron de buena calidad, ya que se encuentran transcritos de alto y bajo tamaño molecular, el cual se monstro un mejor resultado en el método de cloruro de litio, se observan bandas bien definidas, adicionalmente el barrido que se observa representa los transcritos de alto y bajo tamaño molecular. Del RNA enriquecido en mensajeros se obtuvo el cDNA, como puede observarse en la imagen 1, carril 4 y 5, se muestran 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 Trizol. Carril 3. RNA Trizol. Carril 4. RNA Cloruro de litio. Carril 5. cDNA 1:10 KM. Carril 6. cDNA reamplificación KM. Carril 7. PCR catalasa.**

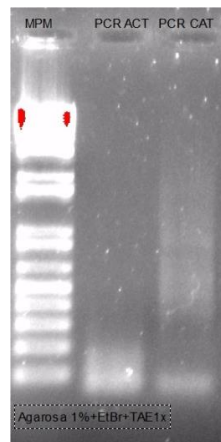
Del RNA enriquecido en mensajeros se obtuvo el cDNA, como puede observarse en la imagen 2, carril 2 y 3, se muestran es un barrido intenso en todo el carril, esto indica que todos los transcritos (dado que viene de RNAm) de alto y bajo tamaño molecular están igualmente representados en la síntesis por retrotranscripción, lo anterior garantiza que independientemente del tamaño del gen antioxidante, es posible aislarlo.



**IMAGEN 2: Obtención de cDNA. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. cDNA Harina desgrasada Trizol. Carril 3. cDNA cloruro de litio.**

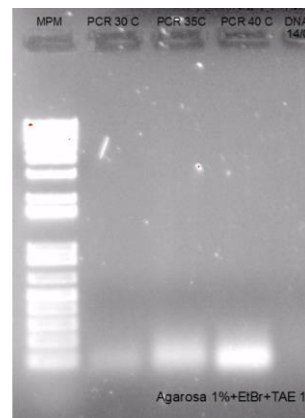
### Detección de genes antioxidantes

La detección de genes antioxidantes se realizó a partir de cDNA, usando como control positivo el gen constitutivo actina el cual demostró un resultado positivo (imagen 3). Respecto a los genes de interés, se estandarizaron las condiciones de amplificación.



**IMAGEN 3: Detección de antioxidantes. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. PCR Actina. Carril 3. PCR Catalasa.**

De esta manera la mejor opción de condiciones en la estandarización (cambios en el cloruro de magnesio, gradiente de temperatura y ciclos) el que dio mejores resultados fue el incremento en ciclos.



**IMAGEN 4: Detección de antioxidantes. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. 30 ciclos Catalasa. Carril 3. 35 ciclos catalasa. Carril 4. 40 ciclos catalasa.**

En los ciclos se muestran presencia del gen de catalasa, mismo que demuestra que el mejor resultado es el ciclo 40. Los resultados encontrados son parecidos a los reportados anteriormente en el gen constitutivo actina .[4]

## CONCLUSIONES

Se demostró mayor eficiencia en la extracción de RNA por método de cloruro de litio comparado con el método de TRIZOL.

El control de actina permitió comprobar que la síntesis de cDNA fue de buena calidad.

Se realizó la amplificación del gen endógeno catalasa con actividad antioxidante en la semilla de chicayota y se puede inferir que esta semilla tiene gran potencial para seguir estudiando sus enzimas y/o metabolitos secundarios con dicha función.

## AGRADECIMIENTOS

Los co-autores agradecen a Ciencia Básica SEP-CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto.

Dra. Ma. Fabiola León Galván. Responsable del laboratorio de proteogenómica funcional, DICIVA, Campus Irapuato-Salamanca Universidad de Guanajuato.

M. de C. Fátima Monserrat Mejía Salazar.

## 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] Maldonado, O., Jiménez E.N., Guapillo, M.R.B., Ceballos, G.M., Méndez, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Centro de Investigaciones Biomédicas-Doctorado en Ciencias Biomédicas-UV, 2 Departamento de Farmacobiología (Maestría en Neurofarmacobiología y Terapéutica Experimental)-CINVESTAV, Sede Sur. 3 Sección de Estudios de Posgrado e Investigación-Escuela Superior de Medicina-Instituto Politécnico Nacional. 4 Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Veracruzana.

[4] Gonzáles,J.& Galban, Ma. (2016). Aislamiento de genes antioxidantes a partir de plantas endémicas de México. *Jóvenes en la ciencia revista de divulgación científica*, Volumen 2, p. 2.

[5] Venereo, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidants. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2), pp.126-33.

[6] Manning K. 1991. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal Biochem. England*. 195(1):45-50.

[7] Espitia, F.J., Bautista, P.I., Gutiérrez, S., León, M.F., (2017). Identificación del gen superóxido dismutasa aislado de "CHAN" *Hypis suaveolens.*, IV Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en el Procesamiento de Alimentos y XIX Congreso Nacional de Ciencias y Tecnología de alimentos. Zacatecas, Zacatecas, México. 17-19 de Mayo de 2017.

Para la amplificación del gen CAT se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Espitia-Orozco en 20017.