

IDENTIFICACIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES A PARTIR DE SEMILLA DE MORINGA (*Moringa oleífera*)

Valladares Morales Aura Noelia (1), Loera Mendoza Iván (2), León Galván Ma. Fabiola (2,3)

1 [Licenciatura en Ingeniería Química, Universidad de San Carlos de Guatemala] | [valladaresnoelia@gmail.com]

2 [Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato - Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [i.loeramendoza@ugto.mx]

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

Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas muy reactivas debido a un electrón no apareado en su último orbital. Los organismos poseen un mecanismo de defensa antioxidante, el cual es el encargado de mantener un equilibrio adecuado, sin embargo, cuando las ROS sobrepasan los mecanismos de defensa, se presenta un desequilibrio que es asociado a enfermedades crónico-degenerativa. El sistema de defensa antioxidante está compuesto tanto por agentes exógenos como endógenos. Entre los antioxidantes endógenos, existen enzimas cuya función es catalizar reacciones químicas que retardan y/o previenen la oxidación. En muchas semillas se ha reportado la presencia de algunas de estas enzimas, que contribuyen al sistema de defensa antioxidante, como: superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, entre otros. Es por esta razón que en este trabajo se planteó identificar al menos un gen antioxidante en la semilla de *Moringa oleífera*. Para lo cual se realizó una extracción de DNA por medio del método Dellaporta, y por medio de la técnica PCR se logró identificar el gen que codifica para superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APx). Así mismo, se realizó la extracción de RNA por medio del método de TRIzol® y la síntesis de cDNA de doble cadena.

Abstract

Reactive Oxygen Species (ROS) are very reactive molecules due to an unpaired electron in their last orbital. The organisms have an antioxidant defense mechanism, which is responsible for maintaining an adequate balance, however, when ROS exceeds the defense mechanisms, an imbalance that is associated with chronic degenerative diseases occurs. The antioxidant defense system is composed of exogenous and endogenous agents. In this classification of endogenous antioxidants, there are enzymes whose function is to catalyze chemical reactions that retard and prevent oxidation. In many seeds has been reported the presence of some of these enzymes, which contributes to the antioxidant defense system, such as superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, and others. It is for this reason that we seek to identify at least one antioxidant gene in the *Moringa oleífera* seed. For which DNA extraction was carried out by Dellaporta's method, and by PCR's technique it was possible to identify the gene that codes for superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APx). In addition, RNA extraction was performed using the TRIzol® method and finally, the synthesis of double-stranded cDNA.

Palabras Clave

Moringa oleífera; gen; antioxidantes; Especies Reactivas de Oxígeno; Superóxido dismutasa.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos poseen un mecanismo de defensa antioxidante propio, estos actúan ante la presencia de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las especies reactivas de oxígeno son moléculas muy reactivas debido a un electrón no apareado en el último orbital (radical libre) [1]. Cuando se produce un desequilibrio entre las ROS y los sistemas de defensa antioxidante, se produce un estrés oxidativo a nivel celular. Esto conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos); y dicho desbalance se asocia con el desarrollo de distintas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades del sistema nervioso central, entre otras [2].

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos en donde la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libre. Estos mecanismos están conformados por pequeñas moléculas, tanto endógenas como exógenas con capacidad antioxidante [3]. Los antioxidantes evitan que otras moléculas se unan al oxígeno, por lo que buscan reaccionar más rápido con los radicales libres del oxígeno [4]. Esos son los antioxidantes endógenos, como la vitamina E; mientras que existen otros, que su función es catalizar reacciones químicas que utilizan sustratos para reaccionar con los radicales libres y así retardar o prevenir la oxidación; estos son llamados enzimáticos [5]. El mecanismo de defensa antioxidante está constituido en primer lugar por enzimas, como el superóxido dismutasa, SOD, el cual su función es captar el radical superóxido por medio de una dismutación, y convertirlo en peróxido de hidrógeno, H_2O_2 . De esta manera las enzimas catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APx) glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) logran neutralizar el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua, la cual ya no representa un peligro para el organismo [6]. El superóxido dismutasa se encuentra formado por un grupo de enzimas metaboloides, estas pueden ser Cu-SOD, Zn-SOD, las cuales se encuentran en el citosol y espacio mitocondrial y Mn-SOD que se encuentra en la matriz mitocondrial [7].

Sin embargo, como se puede observar, los mecanismos de defensa antioxidante muchas veces no son suficientes para prevenir el estrés oxidativo y prevenir y/o retardar el envejecimiento celular, lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Por tal razón, se propone alimentos funcionales que puedan favorecer la dieta diaria con un contenido rico en antioxidantes. Tomando como referencia las propiedades nutricionales y antioxidantes identificadas en la semilla de *Moringa oleífera* [8], se propone en el presente trabajo el aislamiento de al menos un gen antioxidante, para que en un futuro pueda ser incorporado en alimentos funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Moringa oleífera* utilizadas para la fase experimental fueron proporcionadas por la Dr. Ma. Fabiola León Galván del laboratorio de Proteogenómica Funcional de la División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato.

Se realizó la extracción de DNA de la semilla de *Moringa oleífera* utilizando el método Dellaporta [9] con ligeras modificaciones. Para evaluar la calidad del DNA extraído, se realizó un análisis electroforético con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. El cual, se pudo visualizar mediante el fotodocumentador BioRAD. Posteriormente, para corroborar la integridad del DNA, se realizó la identificación del gen constitutivo de actina por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Posteriormente, se realizó la extracción del RNA de la semilla de *Moringa Oleífera* utilizando el método de TRIzol, previamente se trató todo el material a utilizar con etanol-DEPC al 70%. Se analizó la calidad del RNA extraído por medio de una electroforesis con un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y se visualizó por medio de luz UV en el fotodocumentador BioRad.

Para la síntesis de Primera Cadena de cDNA, se realizó la reacción utilizando 3 μ L del RNA extraído, 1 μ L de 3' Oligonucleótido SMART CDS Primer IIA (10 μ M), 1 μ L de 5' Oligonucleótido SMART IIA (10 μ M), para un

volumen total de 5 μL . La mezcla de la reacción se dejó incubar a 72°C por 2 minutos en el Termociclador BioRad. Posteriormente se realizó una segunda reacción con los 5 μL de la reacción anterior y 2.5 μL de regulador de primera cadena 5X, 1 μL de DTT (20mM), 1 μL dNTP's 50x (10mM) y 0.05 μL de transcriptasa reversa Super Scrip II, dando un volumen resultante de 10 μL . Dicha reacción se incubó a 42°C durante una hora en el termociclador, y se añadió 40 μL de agua Milli Q. Finalmente, el producto de la primera cadena se incubó a 72°C por 10 minutos.

Se preparó la reacción para la síntesis de la segunda cadena: 1.75 μL MgCl_2 (25mM), 35.7 μL de agua desionizada, 5 μL Buffer Taq Pol, 1 μL dNTP's (10nM), 1 μL oligonucleótidos Primer PCR IIA, 0.5 μL Taq Pol y 5 μL cDNA de primera cadena. Las condiciones para el termociclador BioRAD fueron de una temperatura de desnaturalización de 94°C, 3 minutos; 34 ciclos con 30 segundos; temperatura de alineamiento de 65°C por 45 segundos, temperatura de polimerización de 72°C por 6 minutos, y finalizados los ciclos, un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C. Se verificó la calidad del cDNA de segunda cadena por medio de electroforesis con gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se visualizó en por luz UV en fotodocumentador BioRad.

Una vez identificado el gen de actina, se procedió a identificar el gen Superóxido dismutasa. Se realizó de igual manera con la técnica de PCR, y las condiciones de amplificación de 5 μL de JumpStart Taq DNA Polymerase, 1.5 μL de oligonucleótido Fw, 1.5 μL Rv, 1.0 μL MgCl_2 (25mM) y 1.0 μL de DNA de *Moringa Oleífera*. Con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, una temperatura de alineamiento de 58°C durante 45 segundos y temperatura de polimerización de 72°C por 1 minuto. Al concluir los 30 ciclos, un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos, esto en el termociclador BioRAD.

Por último, se realizó un PCR para la identificación del gen Ascorbato peroxidasa, con las mismas condiciones para la reacción, utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 1 y condiciones para el termociclador BioRAD de: temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, una temperatura de alineamiento de 58°C durante 1 minuto y temperatura de polimerización de 72°C por 1 minuto y 15 segundos. Al concluir los 35 ciclos, un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos.

Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia
SOD Fw	CCTGGNCTYCAYGGVTTYCAYGT
SOD Rv	CCWAGRTCATCRGGATCAGCRTGVAC
APX Fw	GSNTGGCAYKMNGCDGGDAC
APX Rv	CHGGDGSYACACNHTDGG

Para cada uno de los genes a identificar, se realizó el análisis por medio de una electroforesis con gel de agarosa al 2% y bromuro de etidio, visualizando el resultado en el fotodocumentador BioRad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

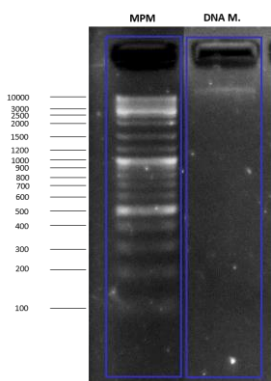


Imagen 1. Obtención de DNA. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: DNA *Moringa Oleífera*

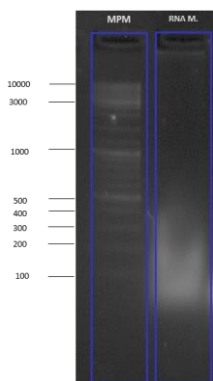


Imagen 2. Obtención de RNA. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: RNA *Moringa Oleífera*

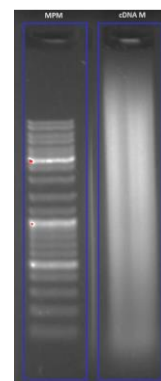


Imagen 3. Síntesis cDNA. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: cDNA de segunda cadena *Moringa oleífera*

Como se puede observar en la Imagen 1., por medio de un análisis electroforético se pudo verificar la calidad del DNA extraído de la semilla de *Moringa oleífera*, la banda que puede visualizarse es estrecha y definida, lo que indica una buena calidad de DNA [10]. La banda se encuentra muy cercana al pozo, por arriba de los 10,000pb, debido a que es la extracción del DNA total y su peso molecular sobrepasa los 10,000 pb.

En el carril 2, Imagen 2, se puede observar un barrido correspondiente a la extracción del RNA de la semilla de *Moringa oleífera*, el tipo de barrido indica un RNA de calidad baja debido a la degradación del mismo. Se debe tomar en cuenta que el RNA sufrió una posible degradación ya que fue expuesto a temperatura ambiente al momento de realizar las distintas centrifugaciones que forman parte del método de TRizol®, y éste debe ser manejado en temperaturas por debajo de los 4°C para asegurar su calidad. Sin embargo, la síntesis de cDNA de segunda cadena realizado a partir de la técnica de PCR, con el RNA mensajero, se puede apreciar en la Imagen 3, donde se observa un barrido uniforme, que es indicador de buena calidad, lo cual favorece el aislamiento del gen.

A partir del DNA obtenido, se realizó la identificación de los genes antioxidantes. En la Imagen 4., se puede observar la identificación del gen constitutivo de actina (carril 2), esto es un indicador de la integridad del DNA obtenido de la semilla.

Se identificó el gen que codifica para superóxido dismutasa (SOD), Imagen 5. En el carril 2, se puede observar la banda que indica la presencia del gen, y ésta se encuentra entre los 600 y 700 pares de bases. Esto varía con el tamaño de molécula esperado que estaba reportado para Amaranto de 459 pb, para dicho juego de oligonucleótidos, debido a que son semillas de diferente familia, según su taxonomía.

En la Imagen 6, se puede observar en el carril 2 varios bandeos pertenecientes al gen ascorbato peroxidasa, sin embargo, la amplificación de acuerdo con el juego de oligonucleótidos utilizados corresponde a la que se encuentra en 150pb, por lo que las demás bandas se deben a posibles inespecificidades en la amplificación del gen, y la posible presencia de intrones.

Imagen 4. Gen constitutivo de actina. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: Actina.

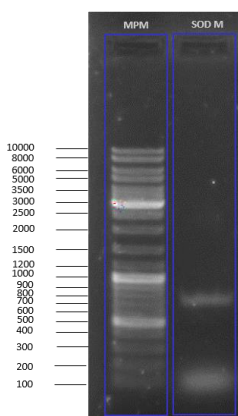
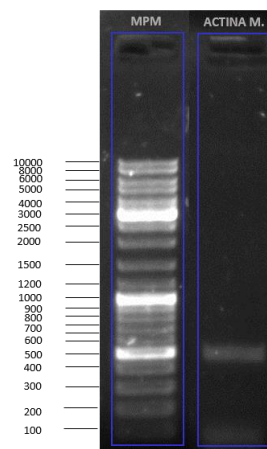


Imagen 5. Identificación de SOD. Carril 1: Marcador de Peso Molecular; Carril 2: SOD *Moringa oleífera*.

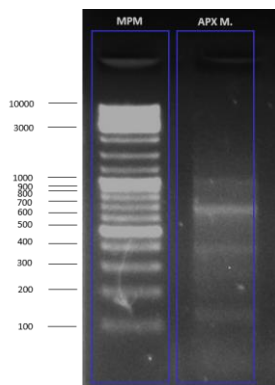


Imagen 6. Identificación de APx. Carril1: Marcador de peso molecular; Carril 2: APx *Moringa oleífera*

CONCLUSIONES

Se logró identificar el gen que codifica para superóxido dismutasa, a partir del DNA total extraído, con una temperatura de alineamiento de 58°C por medio de la técnica de PCR.

Así mismo, se identificó el gen que codifica el ascorbato peroxidasa, APx, con una temperatura de alineamiento de 58°C por medio de la técnica de PCR.

Por la limitante del tiempo, no se logró aislar dichos genes a partir del cDNA, por lo que queda como una perspectiva para futuras investigaciones para la semilla de *Moringa oleífera*.

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Ma. Fabiola León-Galván, del laboratorio de Proteogenómica Funcional de la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, por el acompañamiento y asesoramiento durante la estancia; así como la confianza depositada en los estudiantes de verano y brindar la oportunidad de aprendizaje.

M.C. Iván Loera, por su paciencia, asesoramiento y apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto de investigación; así como a todos los que forman parte del laboratorio de Proteogenómica por su apoyo brindado en distintos momentos.

A mis compañeros del Verano de Investigación por su acompañamiento.

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado por la beca otorgada para la realización de la estancia de Verano de Investigación.

REFERENCIAS

- [1] Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vásquez, M. & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206-212. Recuperado en 22 de julio de 2018 de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
- [2] Martínez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(3). Recuperado en 22 de julio de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&tlng=es
- [3] Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494(2), 161-172. Recuperado en 22 de julio de 2018, en <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- [4] Venereo, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133. Recuperado en 22 de julio de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=pt.
- [5] Mecanismos de defensa antioxidante endógena - Eduvirama. Recuperado el 22 de julio de 2018, de <http://news.eduvirama.com/mecanismos-de-defensa-antioxidante-endogena/>
- [6] Pérez, P. L., & Pérez, J. L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3), 192-198. Recuperado en 22 de julio de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572000000300007&lng=es&tlng=es.
- [7] Venereo, J. R.. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133. Recuperado en 22 de julio de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=pt.
- [8] Olson, M.E. & Fahey, J.W. (2011). *Moringa oleífera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1071-1082. Recuperado el 22 de julio de 2018, de <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.678>
- [9] Dellaporta, S. L., Wood J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21. Recuperado el 22 de julio de 2018 de <https://page-one.live.cf.public.springer.com/pdf/preview/10.1007/BF02712670>
- [10] Alejos, L.P.; Aragón, M. & Comejo, A. Extracción y Purificación de ADN. Recuperado el 24 de julio de 2018 de <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/710/extraccion.pdf>.
- [11] *Amaranthus hypochondriacus* cytosolic copper/zinc superoxide dismutase - Nucleotide - NCBI. (2011). Recuperado el 24 de julio de 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/296837078>