

IDENTIFICACIÓN DE UN GEN QUE CODIFICA PARA UN ANTIOXIDANTE EN *Brassica oleracea* var. Itálica

Figuroa Hurtado Juan Miguel (1), Loera Mendoza Iván (2), León Galván Ma. Fabiola (2, 3)

1 [Departamento de alimentos, División de Ciencias de la Vida, Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [jm.figuroahurtado@ugto.mx]

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

3 [Posgrado en Biociencias, Departamento de alimentos, División de Ciencias de la Vida, Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [fabiola@ugto.mx]

Resumen

Los antioxidantes previenen la formación de especies reactivas de oxígeno en el organismo humano y estimula los mecanismos de reparación endógenos al daño causado por el ataque de ERO. La ingesta de frutas y vegetales en la dieta diaria es una forma de prevenir la generación excesiva de ERO dado su gran contenido antioxidante reportado que actúan como un mecanismo de defensa intrínseco formado principalmente por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasa entre otras. En este trabajo se planteó como objetivo identificar un gen antioxidante a partir de *Brassica oleracea* var. Itálica realizando una extracción de DNA por el método de L. Dellaporta, posteriormente se extrajo un RNAm siguiendo el método de Trizol^{MR}, la síntesis de cDNA se obtuvo de acuerdo con lo descrito en el protocolo SMART de invitrogen. A partir de DNA se logró la identificación del gen que codifica para superóxido dismutasa (SOD) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniendo un amplicón alrededor de los 550 pb que corresponde con el tamaño esperado.

Abstract

Antioxidants prevent the formation of reactive oxygen species in the human organism and stimulate endogenous repair mechanisms to damage caused by the ERO attack. The intake of fruits and vegetables in the daily diet is a way to prevent the excessive generation of ERO given its high antioxidant content reported that act as an intrinsic defense mechanism consisting mainly of enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase, ascorbate peroxidase among other. In this work, the objective was to identify an antioxidant gene from *Brassica oleracea* var. Itálica performing a DNA extraction by the method of L. Dellaporta, then extracted an mRNA following the Trizol^{MR} method, cDNA synthesis was obtained according to what was described in the SMART protocol of invitrogen. DNA was used to identify the gene that codes for superoxide dismutase (SOD) by means of the polymerase chain reaction (PCR), obtaining an amplicon around 550 bp that corresponds to the expected size.

Palabras Clave

Especies reactivas de oxígeno; antioxidantes; superóxido dismutasa; reacción en cadena de la polimerasa

INTRODUCCIÓN

La utilización del oxígeno en la respiración celular permite obtener una cantidad de energía mucho mayor que la que proporciona la vía anaeróbica. Sin embargo, la utilización del oxígeno por las células genera metabolitos tóxicos, denominados Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), lo cual requiere el desarrollo de mecanismos antioxidantes. Cuando la generación de ERO supera la capacidad de estos mecanismos de defensa, se desarrolla el estrés oxidativo (EO), caracterizado por el incremento de estas especies potencialmente dañinas para las biomoléculas, lo que lo involucra en diversas enfermedades [1].

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular [2].

El exceso de ERO promueve el ataque de estas sobre compuestos químicos que se hallan en las células (lípidos, proteínas y ADN), dando lugar al inicio de una serie de reacciones químicas que pueden conducir a la aparición de graves desórdenes fisiológicos y la agudización de las enfermedades [3]. Las especies reactivas del oxígeno son metabolitos parcialmente reducidos derivados del oxígeno. Son moléculas muy inestables, lo que les da una vida media extremadamente corta y la capacidad de reaccionar con todas las moléculas de importancia biológica. Dentro de las más importantes ERO se encuentran el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el radical peroxinitrito [4]. Sin embargo, los antioxidantes previenen la formación de ERO en el organismo humano, así como estimula los mecanismos de reparación endógenos al daño causado por el ataque de ERO o suministra entidades químicas que aumentan la capacidad endógena de secuestro de radicales libres formados en exceso en el organismo. La ingesta de frutas y vegetales en la dieta diaria es una forma de prevenir la generación excesiva de ERO dado su gran contenido antioxidante [5].

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 oxidoreductasas donde se encuentran la catalasa, superóxido dismutasa, entre otras, las cuales son desactivadores de radicales libres [6]. Por su parte la enzima superóxido dismutasa está altamente distribuida en todas las células aerobias la actividad catalítica neutraliza la capacidad reactiva del radical superóxido, al reducirlo a peróxido, la cadena antioxidante debe continuar con la reducción definitiva a agua, por parte de peroxidases o catalasa, del peróxido aquí producido [7]. Los mecanismos de defensa antioxidantes presentes en el humano no son suficientes para contrarrestar el daño por el estrés oxidativo, es por esto, que la ingesta de suplementos con actividad antioxidante debe ser incrementada. Dado que *Brassica oleracea var. Itálica* (brócoli) tiene un contenido de 2.8% de proteína [8]. y que en estudios se ha encontrado alta actividad de compuestos bioactivos antioxidantes en la familia de las crucíferas [9]. Se planteó como objetivo el aislamiento de un gen antioxidantes a partir del brócoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra de *Brassica oleracea var. Itálica* fue proporcionada por la Dra. Ma. Fabiola León Galván de la Universidad de Guanajuato. Para la detección de genes antioxidantes se realizó una extracción de DNA total por el método de L. Dellaporta [10]. posterior a la extracción se analizó su correcta extracción en un gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis a 75V por 35min utilizando como marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder No. 26616, y se observó en el fotodocumentador BioRad. Posteriormente se realizó una extracción de RNAm por el método de Trizol, se analizó de igual manera la calidad de la muestra por medio de electroforesis, a continuación, se procedió con la síntesis de cDNA de

acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el kit SMART PCR cDNA Synthesis, de Clontech. Posteriormente se establecieron condiciones iniciales en el termociclador DUAL BioRad para amplificar Superóxido Dismutasa a partir de un juego de oligonucleótidos codificantes para SOD (tabla 1), estos fueron diseñados previamente tomando como referencia secuencias reportadas en la base de datos del NCBI, por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). En la estandarización de las condiciones de amplificación se utilizó como control el gen constitutivo de actina, se preparó la siguiente reacción para todos los PCR realizados variando solo los oligonucleótidos a amplificar; 5 µL de polimerasa JumpStart®, 1.5 µL de oligonucleótido Fw, 1.5 µL de oligonucleótido Rv, 1.0 µL de MgCl₂ (25mM) y 1.0 µL de DNA, teniendo un volumen final de reacción de 10 µL. La amplificación se realizó con un ciclo de temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5:00 min seguido de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1:00 min, temperatura de alineamiento de 58°C por 45 segundos, temperatura de polimerización de 72°C por 1:00 min y un ciclo de polimerización final de 72°C por 7:00 min. Una vez identificado el gen se procedió a realizar una segunda reacción de PCR empleando como molde cDNA, utilizando las concentraciones y condiciones anteriormente mencionadas.

Tabla 1: oligonucleótidos para detección del gen antioxidante SOD

| Oligonucleótido | Secuencia | Ampliación |
|-----------------|----------------------------------|------------|
| SOD Fw | 5' CCTGGNCTYCA YGGVTTYCAYGT 3' | 459 pb |
| SOD Rv | 5' CCWAGRTCATCRGGATCAGCRTGVAC 3' | |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con las actividades realizadas se obtuvo una extracción de DNA total a partir de *Brassica oleracea var.* Itálica donde se observa en la imagen 1 en el segundo carril un bandeo en la parte superior del gel de agarosa, según [11] el DNA total sobrepasa los 10000 pares de bases, concordando con los resultados obtenidos.

La detección de genes antioxidantes se realizó a partir de DNA y cDNA, usando como control positivo el gen constitutivo de actina, para esto se estandarizaron las condiciones de amplificación obtenido para actina un amplicón de 140 pares de bases (imagen 2, carril 2), Las actinas son proteínas altamente conservadas que se encuentran entre las proteínas más abundantes en células eucariotas y están involucradas en la motilidad, la estructura y la integridad de la célula [12].

Se realizó un PCR con los oligonucleótidos de Superóxido dismutasa en DNA lo cual amplifico un gen alrededor de las 550 pb observándose un bandeo bien definido en el carril 3 (Imagen 3), realizando gradientes de temperatura de alineamiento de 51° a 58°C estandarizando que a esta última temperatura es adecuada para los oligonucleótidos.

De acuerdo con los oligonucleótidos que fueron diseñados a partir de amaranto el amplicón debería ser de 459 pares de bases sin embargo dado las diferencias entre especies el amplicón fue mayor a este, pero de acuerdo con [13] reporto que superoxido dismutasa tiene 600 pares de

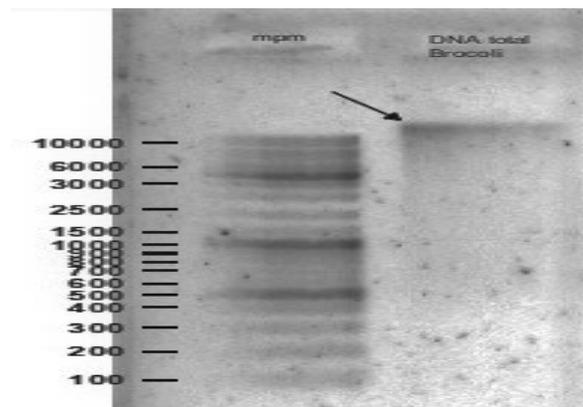
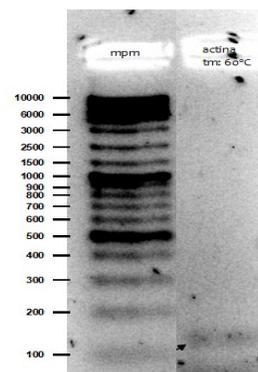


IMAGEN 1: gel de agarosa 1%, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracción de DNA de brócoli

IMAGEN 2: gel de agarosa 2%, carril 1: marcador de peso molecular carril 2: gen constitutivo de actina



bases, lo que nos indica que estamos en un buen rango y en efecto estamos hablando de SOD.

Se hizo una extracción de RNA a partir de florete de *Brassica oleracea var. Itálica* por el método de Trizol, como se muestra en la imagen 4 carril se puede ver que se degradó un poco ya que no se pudo contar con la centrifuga refrigerada, El RNA es una molécula que se degrada muy fácil [11] sin embargo se puede ver que aun así el RNA se pudo extraer, por su parte en el carril 2 se puede ver una correcta síntesis de cDNA a partir del RNA extraído con anterioridad, se procedió a realizar un PCR con las condiciones antes mencionadas para DNA sin embargo los resultados fueron desfavorables ya que no se logró ver un bandeo aproximado a las 550 pb esto es argumentado que aunque se realizó las extracciones de la misma muestra el DNA es estructuralmente diferente a una síntesis cDNA, ya que este último es en su totalidad codificante para proteínas, mientras que el DNA aún no ha pasado por el splicing alternativo teniendo intrones en su estructura.

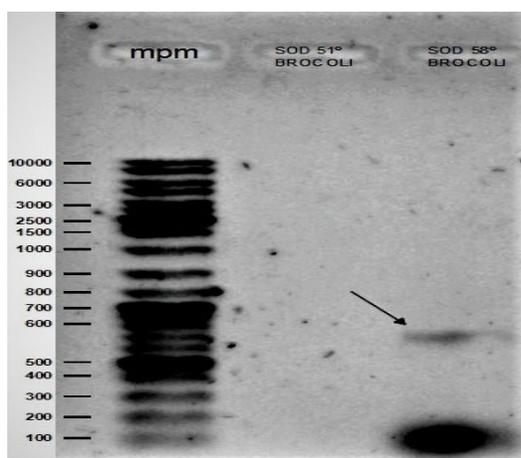


IMAGEN 3: gel de agarosa 1%, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: pcr con oligos de Sod y tm de 51° Carril 3: pcr con oligos de Sod y tm de 58°, observado un bandeo definido alrededor de

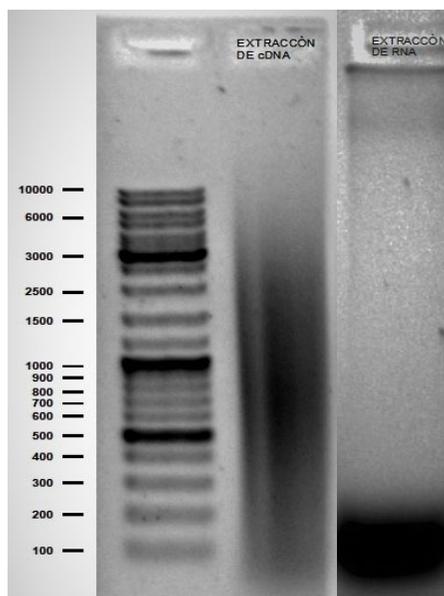


IMAGEN 4: gel de agarosa al 1%, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: extracción de cdna a partir de brócoli carril 3: extracción de RNA a partir de brócoli.

CONCLUSIONES

Se logró identificar el gen de superóxido dismutasa alrededor de los 550 pares de bases a partir de DNA de *Brassica oleracea var. Itálica*, sin embargo, por el tiempo limitado queda a perspectiva aislar el transcrito a partir de cDNA que codifica para el gen SOD.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Ma. Fabiola León Galván por aceptarme en primera estancia en esta maravillosa y gratificante experiencia, así como al M.C. Iván Loera Mendoza por haberme brindado su apoyo y estar pendiente de mí en cada día del verano, agradezco a DAIP por la beca otorgada para realizar la estancia de verano, también quiero hacer mención de mis padres que sin ellos y su apoyo yo no podría estar donde ahora estoy.

REFERENCIAS

- [1] Benítez, D. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Cubana Med Milit.*, 31(2) pp. 126-33.
- [2] Fridowich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201:875-88.
- [3] H. takahashi, Y. H. (2000). zinc super oxide dismutase protects from ultraviolet B -Induced apoptosis. *Sci* , 23(1):12-21.
- [4] Juranek I, B. S. (2005). Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-causeor consequence of tissue injury? *Gen Physio Biophys*, 24:263-78.
- [5] Gey, K. (1994). Free radicals in the enviroment. En M. E. Cody B, *Medicine and toxicology* (págs. 15-24). New York: A. R. liss .
- [6] Miwa S. Muller FL, B. K. (2008). Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases. En B. K. Miwa S. Muller FL, *The basics of oxidative biochemistry* (págs. 11-37). USA : Humana prosess .
- [7] Nestle, M. (1998). Brocoli sprout in cancer prevention. *Nutrition*, 56: 127-30.
- [8] Barbara, E. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *scielo*, vol. 12 no. 2.
- [9] USDA. (abril de 2018). informe completo: 11090, brócoli crudo . Beltsville , Maryland , Estados Unidos de America .
- [10] L. Dellaporta, J. W. (1983). A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant molecular biology reporter*, 19-21.
- [11] Klug, W. S. (2013). *Conceptos de Genetica*. Madrid: Pearson .
- [12] SH, Lee. (2018). La actina es crucial para todas las formas cinéticamente diferenciables de endocitosis en las sinapsis. *Centro Nacional de Informacion Biotecnologica* , 1-10.
- [13] Rong, X. (2016). Efectos de la acetilacion de histonas sobre la expresi3n del gen de la super3xido dismutasa. *NCBI*, 1-10.