

# AISLAMIENTO DE GENES ANTIOXIDANTES A PARTIR DE PLANTAS ENDÉMICAS DE MÉXICO

Cendejas Gutiérrez Luisa Fernanda (1), Loera Mendoza Ivan (2), León Galván Ma. Fabiola (3)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [lf.cendejasgutierrez@ugto.mx]

2 [Posgrado en Bio ciencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato- Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [l.loeramendoza.ugto.mx]

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

## Resumen

Actualmente la población enfrenta cada vez con mayor medida problemas de salud originados por el tipo de vida, mala alimentación y falta de nutrientes en sus comidas, siendo las más comunes el cáncer, diabetes e hipertensión, dichas enfermedades están íntimamente relacionadas con el estrés oxidativo producido por el desequilibrio entre radicales libres y antioxidantes. Se ha reportado que existen en las plantas va variedades de complejos antioxidantes capaces de contrarrestar los efectos producidos por la oxidación, por lo que el objetivo de este trabajo consistió en aislar por lo menos un gen antioxidante de la planta *Hyptis suaveolens*. La extracción de RNAm de la semilla se realizó bajo el método de TRIZOL MR, la síntesis de cDNA se obtuvo de acuerdo a lo establecido en el protocolo SMARTer de Clontech, y finalmente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtuvo un amplicón de aproximadamente 300 pb perteneciente a Superóxido Dismutasa 3 (Cu/Zn) siendo este resultado de gran similitud a lo reportado en Amarantho.

## Abstract

Currently the population is facing more and more health problems derived from poor diet, lifestyle and lack of nutrients in their meals, the most common being cancer, diabetes and hypertension, these diseases are closely related to the oxidative stress produced by the imbalance between free radicals and antioxidants. It has been reported that there are varieties of antioxidant complexes in plants capable of counteracting the effects produced by oxidation, so the objective of this work was to isolate an antioxidant gene from the plant *Hyptis suaveolens*. The extraction of mRNA from the seed was carried out under the TRIZOL MR method, the cDNA synthesis was obtained according to the provisions of the SMARTer protocol of Clontech, and finally by means of the polymerase chain reaction (PCR), an amplicon of approximately 300 bp belonging to Superoxide Dismutase 3 (Cu / Zn) was obtained, this result being very similar to that reported in Amarantho.

### Palabras Clave

Superóxido Dismutasa; *Hyptis suaveolens*; estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucariotas necesitan el oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir. Sin embargo, el oxígeno es potencialmente peligroso, principalmente debido a la formación de especies reactivas intermedias durante su utilización, las cuales actúan como elementos pro-oxidantes de la célula provocando daños y por consecuencia enfermedades. Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Cabe señalar que la producción de estas sustancias también se ve favorecida por diversos factores externos como lo son la exposición a concentraciones muy altas de oxígeno o radiaciones, humo de cigarro y a la contaminación ambiental, etc., [1]. Debido a esto, los seres vivos han desarrollado de forma natural mecanismos de defensa capaces de contrarrestar las ERO's llamados antioxidantes. En las plantas existen dos tipos de antioxidantes según su clasificación: los exógenos que corresponden principalmente a metabolitos secundarios y los endógenos o enzimáticos en donde se ubican la Superóxido Dismutasa (SOD), Ascorbato Peroxidasa (APX), Catalasa (CAT) y S-Adenosil Metionil Sintetasa (SAMS) las cuales cumplen con una función catalizadora de las reacciones de desintoxicación, es por ello su importancia [2]. En México existe una gran variedad de plantas con propiedades benéficas para la salud, sin embargo son pocos los estudios que se tienen al respecto, *Hyptis suaveolens* mejor conocida como Chan es una planta que se encuentra en abundancia en diferentes estados de la república siendo identificada principalmente por su gran capacidad antioxidante [3]. Las Superóxido Dismutasa son la primera línea de defensa contra el daño oxidativo y han sido aisladas de organismos de todos los reinos, esta enzima origina la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno y, se clasifican en base al cofactor que utiliza Manganeseo-SOD, Hierro-SOD y Cobre-Zinc SOD, mientras que CAT, APX Y SAMS convierten el peróxido de hidrógeno en oxígeno [4]. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de un gen antioxidante presente en la semilla de *Hyptis suaveolens*.

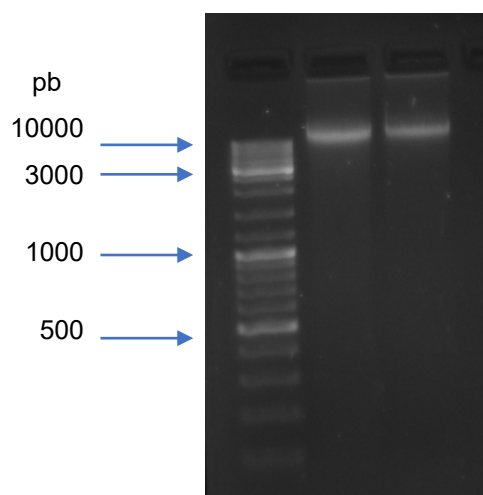
## MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción del gen antioxidante se realizó a partir de la semilla *Hyptis suaveolens* la cual fue proporcionada por la Dra. Fabiola León Galván. El trabajo experimental inició con la extracción de DNA genómico empleando el método Dellaporta, posterior a esto se hizo un análisis electroforético utilizando como cromóforo bromuro de etidio y agarosa al 2% con un buffer de carga Dye Purple (6X) y, se visualizó en un fotodocumentador BioRad. Una vez que se confirmó la extracción de DNA genómico se prosiguió con la detección molecular del gen constitutivo *Actina* empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para evaluar la integridad del DNA extraído. En seguida se realizaron las detecciones moleculares para *SOD*, *CAT*, *APX* y *SAMS* a partir de sus respectivos oligonucleótidos forward y reverse previamente diseñados de acuerdo a la base de datos de la NCBI; a cada tubo se le agregó 5 uL de Taq polimerasa JumpStar, 1 uL de  $MgCl_2$ , 1 uL de la dilución 1:30 de DNA y 1.5 uL del correspondiente juego de oligonucleótidos (Cuadro 1). Cada tubo se introdujo a un termociclador dual BioRad bajo condiciones de amplificación distintas. Las condiciones de amplificación para *SOD* fueron un ciclo con temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, temperatura de alineamiento con gradientes de temperatura de 52.5, 55.2, 57.1, 58.7 y 60°C por 45 segundos y, polimerización de 72°C por 1 minuto, concluidos los 30 ciclos se dio una extensión final a 72°C por 7 minutos. Las condiciones de *CAT* fueron una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento con gradientes de 52.5, 57, 58, 59, 60 y 62°C por 1 minuto y, polimerización de 72°C por 1:50 minutos con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para *APX* se usó una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 1 minuto, temperatura de alineamiento con gradientes de 53, 55, 58 y 60°C por 1 minuto y, polimerización de

72°C por 1:15 minutos con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para SAMS, las condiciones que se establecieron fueron una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos seguido de 30 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C por 45 segundos, un alineamiento a 57°C por 1 minuto, una polimerización de 72°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 5 minutos y concluidos los ciclos una extensión final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente se hizo una extracción de RNAm empleando el método de TRIzol<sup>MR</sup>, el cual fue visualizado en el fotodocumentador y a partir de este se realizó la síntesis de primera y segunda cadena de cDNA haciendo uso del Kit SMARTer PCR cDNA Synthesis de Clontech. Finalmente se realizó nuevamente la identificación de genes antioxidantes por medio de PCR, cambiando las condiciones para SOD siendo estas nuevas una temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos a una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, un gradiente de temperatura de 42, 58 y 60.8 °C con una extensión de 72°Cpor 2 minutos y una extensión final de 2 minutos a 72°C.

**Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección de los genes SOD, CAT, APX Y SAMS**

Oligonucleótido	Secuencia
SOD 3 Fw SOD 3 Rv	5' CCTGGNCTYCAYGGVTTYCAYGT 3' 5' CCWAGRTCATCRGGATCAGCRTGVAC 3'
CAT Fw CAT Rv	5' ATGGATCCYTACARGYAYCGSCC 3' 5' GAGWCCRTAHGARATCCATATG 3'
APX Fw APX Rv	5' GSSNTGGCAYKMNGCDGGDAC 3' 5' CHGGDGSYACACNHTDGG 3'
SAMS Fw SAMS Rv	5' CNGTNTAAYARGGNCAAYCCHG 3' 5' GCDGHTAYGGNCAAYTTYGG 3'



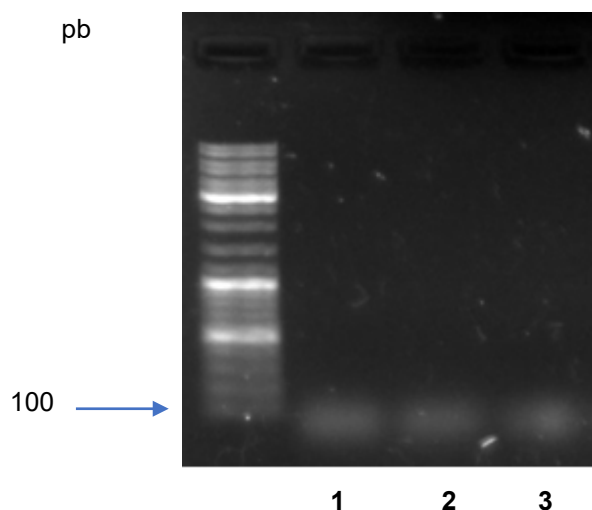
**IMAGEN 1: Extracción de DNA genómico de *Hyptis suaveolens* usando el método Dellaporta**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

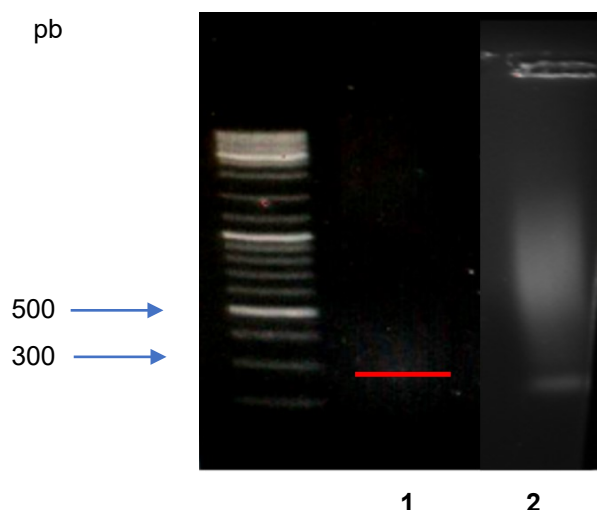
En la extracción de DNA genómico por medio del método Dellaporta [5] se observó una banda nítida y comparándola con el marcador de peso molecular GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix se pudo apreciar que el tamaño molecular aproximado fue superior a las 10000 pb tal como se muestra en la imagen 1, lo cual es correcto ya que el tamaño del DNA total es mayor en comparación con el RNAm debido a que cuenta con mayor número de proteínas como las histonas e incluye a los intrones.

Para la identificación de *Actina* se emplearon diferentes temperaturas de alineamiento sin embargo, en las que mejor se expresó fueron a 55 y 60 °C ubicándose aproximadamente a las 150 pb siendo muy similar a lo expresado en el manual de ACTB (beta actin) de ThermoFisher SCIENTIFIC [6]. Para los genes de

*CAT*, *APX* y *SAMS* no se obtuvieron resultados positivos como se observa en la imagen 2, dado que en todos los casos las bandas que se observaron fueron de peso molecular bajo correspondientes a los oligonucleótidos usados, los cuales son pequeños fragmentos de DNA de aproximadamente 25 pb. Cabe señalar que se realizaron modificaciones en las condiciones de PCR, gradientes de temperatura, diluciones e incluso nuevas extracciones para intentar su aislamiento sin embargo los resultados fueron negativos. Para el caso de *SOD* su identificación en DNA genómico tampoco fue posible sin embargo se realizó la extracción de RNAm y posterior esto una síntesis de cDNA de segunda cadena y de esta forma se logró identificar a través de la electroforesis, ubicándose este último aproximadamente a las 300 pb tal como se muestra en la imagen 3, siendo muy similar a las 273 pb de *SOD3* reportadas en *Amaranthus hypochondriacus* L.



**IMAGEN 2.** Identificación de genes mediante PCR usando los oligonucleótidos para 1:*CAT*; 2:*APX*, 3:*SAMS*.



**IMAGEN 3.** Identificación de *SOD* por PCR (1) y RNAm usando el método de TRIzol (2)

## CONCLUSIONES

La semilla de *Hyptis suaveolens* es una fuente natural de antioxidantes endógenos puesto que fue posible la detección molecular y el aislamiento del gen que codifica para la enzima Superóxido dismutasa 3 y aunque no se encontraron las condiciones adecuadas para identificar la presencia de *CAT*, *APX* y *SAMS* es importante seguir trabajando en esta área.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al DAIP por la beca otorgada para que se llevará a cabo este proyecto, a mi familia por el apoyo brindado y Iván Loera Mendoza por todo su tiempo y dedicación.

## REFERENCIAS

- [1] Abilés, A. S. (2007). Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Universidad de Granada, 7-13. Recuperado de <https://hera.ugr.es/tesisugr/16710794.pdf>
- [2] Ortega Cruz, L. B. (2009). Clonación y caracterización de la Superóxido Dismutasa de Amarantho expresada en respuesta estrés abiótico. Tesis de Maestría en Biología Molecular. IPICYT
- [3] Vergara Santana, M. I., Lemus Juárez S., Bayardo Parra, R. (2005). Efecto de la selección artificial en el “Chan” (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Labiatae) sobre su morfología floral y la floración. Centro Universitario de Investigación y Desarrollo Agropecuario, Universidad de Colima
- [4] Gómez Quiroz, L. E., Cuevas Bahena, D. B. (2015). Superóxido dismutasas
- [5] Dellaporta, Stephen L., Wood J., Hicks J. B. (1983). *Plant Mol Biol Rep* 1:19. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/BF0212670>
- [6] The Applied Biosystems Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control. ThermoFisher SCIENTIFIC