

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

TESIS

Análisis *in silico* de la expresión de genes involucrados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno generadas por el estrés causado por el Cromo hexavalente en el modelo de *Arabidopsis thaliana*

Que para obtener título de:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. Diego Morales Soriano

DIRECTOR DE TESIS

D. C. Verónica Liliana Ramírez Falcon

ASESORA

D. C. Laura Morales Lara

Puebla, Pue. Octubre 2021



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Índice

1	ANTECEDENTES	5
2	INTRODUCCIÓN.....	6
2.1	Respuesta vegetal a metales pesados	7
2.2	Respuesta vegetal de <i>Arabidopsis thaliana</i> al cromo	11
2.3	Análisis e importancia de glutatión S transferasa en <i>Arabidopsis thaliana</i> para el metabolismo de xenobióticos.....	15
2.4	Análisis e importancia de UMP/CMP cinasa en <i>Arabidopsis thaliana</i> para el metabolismo de xenobióticos.....	17
2.5	Importancia del análisis de expresión genética en <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.6	Plataformas bioinformáticas en el análisis de proteomas	18
3	JUSTIFICACIÓN	21
4	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo general.....	22
4.2	Objetivos específicos	22
5	DIAGRAMA DE TRABAJO	24
6	MATERIAL Y METODOS	25
6.1	Material	25
6.2	Equipos	25
6.3	Métodos	26
7	METODOLOGÍA.....	27
7.1	Escarificación y germinación de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en agar.	27
7.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la germinación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
7.3	Ensayos y extracción de RNA de alta pureza de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
7.4	Determinación de la calidad de RNA mediante electroforesis	28

7.5	Obtención y análisis de secuencias de Bio-Microarreglos	29
7.6	Análisis en la plataforma bioinformática KEGG-BLASTKOALA.....	29
7.7	Análisis de los diagramas de las secuencias Up y Down.....	29
7.8	Análisis <i>in silico</i> de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma KEGG/BLAST-KOALA	29
7.9	Análisis <i>in silico</i> de las secuencias aminoacídicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma UNIPROT	30
7.10	Análisis predictivo <i>in silico</i> de las estructuras proteicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma SWISS MODEL.....	30
7.11	Análisis filogenético de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma NCBI.....	30
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
8.1	Análisis <i>in silico</i> de la enzima glutatión S transferasa expresada en <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente.....	35
8.1.1	Función e importancia de la enzima glutatión S transferasa en el metabolismo de xenobióticos.....	35
8.1.2	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de las enzimas glutatión S transferasa en la plataforma UNIPROT	37
8.1.3	Análisis <i>in silico</i> de la estructura proteica terciaria de la enzima glutatión S transferasa en la plataforma Swiss Model.....	39
8.1.4	Análisis filogenético de la enzima glutatión S transferasa en la plataforma NCBI.....	42
8.2	Análisis <i>in silico</i> de la enzima UMP/CMP cinasa expresada en <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente.....	45
8.2.1	Función e importancia de la enzima UMP/CMP cinasa en el metabolismo de xenobióticos	45
8.2.2	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma UNIPROT.....	46
8.2.3	Análisis <i>in silico</i> de la estructura proteica terciaria de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma Swiss Model.....	47
8.2.4	Análisis del árbol filogenético de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma NCBI.....	50

9	CONCLUSIÓN	53
10	REFERENCIAS	54
11	ANEXOS.....	61

1 ANTECEDENTES

El grupo de investigación de Ramírez et al., 2019, se interesó en el estudio de la interacción microorganismo-planta y su respuesta al estrés causado por metales pesados usando el modelo *Prosopis laevigata*- *Bacillus cereus* MH778713. En este modelo se observaron cambios significativos en la producción de la biomasa cuando la planta es expuesta al estrés por metales pesados (Hierro y Cromo). En el trabajo de Ramírez et al., 2020 se demostró la estrecha relación entre los modelos *Prosopis laevigata*- *Bacillus* sp. MH778713 para sobrevivir la exposición a cromo mediante la expresión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). En este trabajo se determina cuál es la respuesta metabólica que induce en la planta ante exposición a altas concentraciones de un metal tóxico como el cromo hexavalente (VI) mediante el uso de la herramienta molecular como microarreglos que permitirá determinar la expresión de genes relacionados con la respuesta de la planta a estos estímulos, para ellos usaremos a *Arabidopsis thaliana*, la cual es el modelo de estudio más empleado para análisis en plantas, una de las áreas en las que es utilizado es en los análisis genéticos debido a que se conoce el genoma completo de todos los ecotipos, incluido el Columbia 0, el cual será utilizado en este trabajo.

2 INTRODUCCIÓN

La industrialización y actividades como la minera y peletera han contribuido al incremento de la concentración de metales pesados en el suelo y han provocado cambios que afectan a los organismos que se encuentran en la biosfera, en los cuales se modifica la respuesta adaptativa para su supervivencia. Los metales pesados constituyen un importante contaminante ambiental debido a que poseen una gran estabilidad química ante procesos de degradación en las plantas, contaminando por medio de bioacumulación (Chaney et al., 1997). La complejidad en el grado de tolerancia y comportamiento de las plantas ante los efectos nocivos de los metales pesados indican la existencia de diversas estrategias de protección, los métodos para la respuesta de diversas plantas a metales pesados son la exclusión de membrana, la formación de quelantes y el uso de chaperonas moleculares.

Se debe señalar que los metales pesados provocarán respuestas particulares en las plantas, algunos causan alteraciones en el sistema redox como es el caso de cobre, hierro y cromo, los cuales aceleran la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS); por otra parte, el plomo, cadmio, aluminio, mercurio, arsénico y níquel provocan estrés oxidativo debido al desgaste de reservas de antioxidantes, afectando a los transportadores de electrones, y por último otros metales como el cadmio, aluminio y arsénico inducen peroxidación lipídica (Ercal et al., 2001).

La causa principal del aumento en la concentración de metales pesados en el suelo se debe a la industrialización de áreas y disposición inadecuada de sus residuos, estos factores favorecen la contaminación ambiental, la disposición de metales pesados en el suelo está en función del pH, contenido de arcillas, materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico (Aldrich et al., 2003). Los metales pesados se definen como elementos con propiedades como ductilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando, algunos ejemplos son el plomo, cromo, arsénico, zinc, cadmio, cobre, mercurio y níquel, la concentración de estos depende de la actividad industrial en el área y el tratamiento de sus residuos (Wuana., 2011).

En la investigación de Aldrich., 2003 se demuestra la absorción y reducción de Cr (VI) a Cr (III) en *Prosopis* spp., en el estudio se realizó el análisis del metabolismo de Cr (VI), donde

se usó una alícuota de 80 ml con $K_2Cr_2O_7$ a 1000 ppm, posteriormente, se añadió a 1 L de solución. Los resultados concluyen que el 50% de Cr (VI) es reducido a Cr (III), aunque el mecanismo para su reducción se desconoce, la distribución de Cr (III) ocurre en diversas estructuras de la planta, donde se encuentra unido a azúcares y ácidos carboxílicos (Aldrich et al., 2003).

El cromo es un metal que se encuentra en zonas contaminadas, se localiza en el suelo y forma compuestos en dos estados principalmente, Cr (VI) y Cr (III), ambos son oxidantes, su presencia en la célula provoca estrés oxidativo; El estado más fitotóxico es cromo hexavalente (Cr (VI)), es una amenaza medioambiental, debido a que esta forma es más soluble en comparación a Cr (III), su unión a compuestos de azufre y hierro facilita su entrada a la célula por medio de transporte activo, además puede ingresar por medio de transporte pasivo. La solubilidad de Cr (III) y Cr (VI) es relevante, ya que Cr (VI) forma compuestos que son altamente solubles en agua, mientras que Cr (III) forma hidróxidos que precipitan (Kimbrough et al., 1999). La exposición a metales pesados produce alteraciones en el metabolismo de las plantas, en este trabajo se analizarán los cambios producidos en el modelo de *Arabidopsis thaliana* en la expresión de genes en exposición a cromo (VI).

2.1 Respuesta vegetal a metales pesados

Las plantas interactúan con su entorno, lo que causa el desarrollo de respuestas adaptativas; las cuales se encuentran relacionadas con diversos factores como; el medio ambiente, otras plantas presentes en el ecosistema, microorganismos, insectos, y diversos contaminantes como plaguicidas, productos derivados de petróleo, aguas negras, acumulación de metales pesados y desechos radioactivos.

La gravedad del daño está en función al tiempo de exposición, es importante evaluar los efectos a corto, o largo plazo y la concentración del metal. Las plantas pueden clasificarse en tres tipos: excluyentes, indicadoras y acumuladoras de metales pesados (Baker., 1981). En las plantas excluyentes la concentración del metal en la planta es menor que la concentración en el suelo, a diferencia de las acumuladoras, en donde la planta retiene metales en su estructura, y por último, están las plantas indicadoras en las cuales la concentración de

metales en la planta y el sustrato se encuentra en equilibrio. La sinergia de plantas y microorganismos asociados a la rizosfera es un mecanismo para el aumento de la remoción de contaminantes tóxicos del suelo, los microorganismos son benéficos en la fitorremediación, ya que pueden absorber metales pesados, regulan el paso de los metales pesados a la planta a través de la secreción de polisacáridos y produciendo ácidos orgánicos, los cuales evitan la entrada de cromo a la célula, debido a que dificultan el paso por transporte pasivo y algunos como el 2,4- diterbutilfenol tienen actividad antioxidante (Channey et al., 1997), además de formar ligandos con metales, causando la formación de compuestos insolubles en presencia de ácido cítrico y ácido málico; los cuales se localizan en las raíces (Panda., 2005). La reducción del Cr (VI) a Cr (III) se lleva a cabo por bacterias, en donde el Cr (III) forma compuestos con ácidos orgánicos o azúcares de la planta (Tchounwou et al., 2014). La resistencia de las plantas contra metales pesados se atribuye a diversos mecanismos, uno de ellos es el almacenamiento constante de glutatión, por su actividad multifuncional en la síntesis de fitoquelantes, desintoxicación por metilglioxal, degradación de ROS a través del ciclo ascorbato – glutatión, descomposición de compuestos tóxicos mediante glutatión S transferasas, así como señalización de estrés (Hossain et al., 2013).

Otra estrategia de protección a la célula de intoxicación por metales pesados es la síntesis de transportadores de membrana, compuestos quelantes con tioles, aumento de proteínas para evitar la formación de ROS y transportadores moleculares para reestablecer la estructura de proteínas (Barber., 1978). Los fitoquelantes son péptidos ricos en cisteína y glutamato como glutatión (GSH), fitoquelatinas (PCs) o metaloproteínas (MTs), los cuales disminuyen la unión de los iones a las proteínas (Grill et al., 1989), las fitoquelatinas y metaloproteínas se unen a los metales los cuales son expulsados o almacenados en vacuolas, este proceso es realizado por proteínas de transporte como la proteína transportadora de cromatos (chrA) y peroxiredoxina (Prx), la peroxiredoxina es una enzima de la familia de peroxidases cuya función es catalizar un amplio rango de peróxidos, la sobreexpresión de Prx es fundamental, ya que su mecanismo es independiente de cofactores, su inactivación ocurre en condiciones extremas, a diferencia de las enzimas, y es activado por una amplia gama de peróxidos (Dietz., 2003).

Otro mecanismo usado para evitar los daños causados por el estrés oxidativo es la producción de enzimas como superóxido dismutasa (SOD), su función es modular la cantidad de O_2 y H_2O_2 , ya que el exceso de O_2 es metabolizado a H_2O_2 , en exceso; este compuesto dañará a la célula, para evitar los daños por ROS existe una variedad de enzimas como ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) las cuales protegen a la membrana celular de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres (Barber., 1978).

Unas de las enzimas importantes debido a que posee diversas funciones, es la glutatión S transferasa (GSTs), estas son una familia de enzimas con una gran cantidad de isoenzimas, las cuales se expresan en varios organismos, existen tres grupos de familias de estas enzimas, los cuales están organizados por su localización en la célula, estos son citosólicos, mitocondriales y microsomales (Hayes et al., 2005). La función principal de estas es la detoxificación de xenobióticos, también tienen otras funciones como la biosíntesis y el metabolismo de prostaglandinas, esteroides y leucotrienos, así como el manejo de productos causantes de peroxidación lipídica y estrés oxidativo (Listowsky., 2008). Otra función de GST es la modulación de señales que controlan la proliferación y muerte celular (Laborde., 2010).

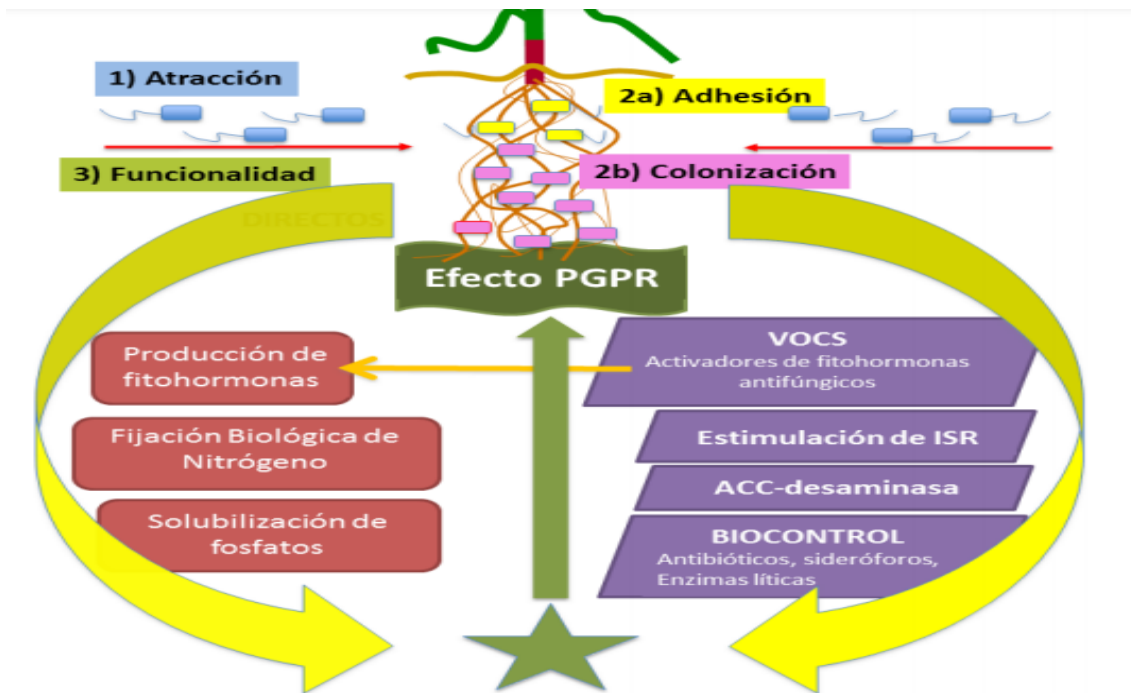


Figura 1. Efectos y propiedades funcionales de las rizobacterias en organismos vegetales. Fases de crecimiento y efectos de las rizobacterias en la planta, se muestran tres fases indispensables de las rizobacterias, 1) la atracción es dada por quimiotaxis específica a exudados vegetales, 2) la adhesión ocurre en las semillas o raíces, la colonización se da por patrones específicos y 3) la funcionalidad de las rizobacterias. Tomado de Molina et al., 2015.

Los VOCs son compuestos los cuales son exclusivos de cada especie de rizobacteria y son capaces de intervenir en el proceso de estrés oxidativo y desencadenar la respuesta sistémica inducida de las plantas (**Figura 1**) (Molina et al., 2015). En la investigación de Ramirez., 2020 se evaluó el papel de los VOCs producidos por la bacteria *Bacillus* sp. MH778713, esta bacteria fue aislada de nódulos de *Prosopis laevigata* y es capaz de producir compuestos como: tetracosano (C24), heneicosano (C21), untriacontano (C31) y 2,4- diterbutilfenol, (C21) otro efecto es favorecer la germinación de semillas de *P. laevigata* y *A. thaliana*, ambas fueron expuestas a concentraciones de Cr de 2500 y 100 mg/L respectivamente, debido a que *Bacillus* sp. MH778713 es hipertolerante (hasta 15000 mg/L de Cr (VI)). Seguido por la exposición individual de los VOCs para confirmar su efecto de promoción de la germinación en semillas expuestas a cromo (Ramirez et al., 2020). Se concluyó que la presencia de los

VOCs emitidos por *Bacillus* spp. MH778713 ayudan a la germinación aún en presencia de cromo.

2.2 Respuesta vegetal de *Arabidopsis thaliana* al cromo

El cromo (Cr) es un elemento traza y tóxico para animales, sin embargo, no tiene función en biológica en las plantas, en la actualidad no existe evidencia de la función de Cr (VI) en el metabolismo (Dixit et al., 2002), la investigación de McGrath., 1995 indicó que la bioacumulación de cromo afecta el desarrollo de la planta, daña a las raíces, causa caída de hojas y clorosis.

El cromo está presente en la superficie de la tierra, posee diversos estados de oxidación y forma compuestos, las dos especies químicas de Cr pueden ser adsorbidas en el suelo, pasando por reacciones redox dependientes de la composición del suelo (McGrath., 1995). El Cr (VI) es transportado por materia orgánica, Fe (II) y sulfitos, mientras que el Cr (III) es transportado por óxidos de manganeso (Becquer et al., 2003), las especies de Cr (VI) encontradas incluyen cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), estos son adsorbidos por óxidos de aluminio y hierro (Wuana., 2011).

El cromo (VI) entra en las células por la interacción con transportadores de hierro y sulfatos de las plantas, unión con compuestos con enlaces tiol y transporte pasivo a través de la membrana y bajo ciertas condiciones fisiológicas puede ser reducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), glutatión reductasa (GSH) y ácido ascórbico, esto produce reactivos intermediarios del cromo (Cr(V) y Cr (IV)), tioradicales, radicales hidroxilos y por último Cr (III) (Singh et al., 2013). El cromo es uno de los metales más fitotóxicos debido a que inhibe diferentes rutas metabólicas, cualquiera de estas especies del cromo tiene efectos dañinos hacia el ADN, las proteínas, mitocondrias y lípidos de membrana (**Figura 2**).

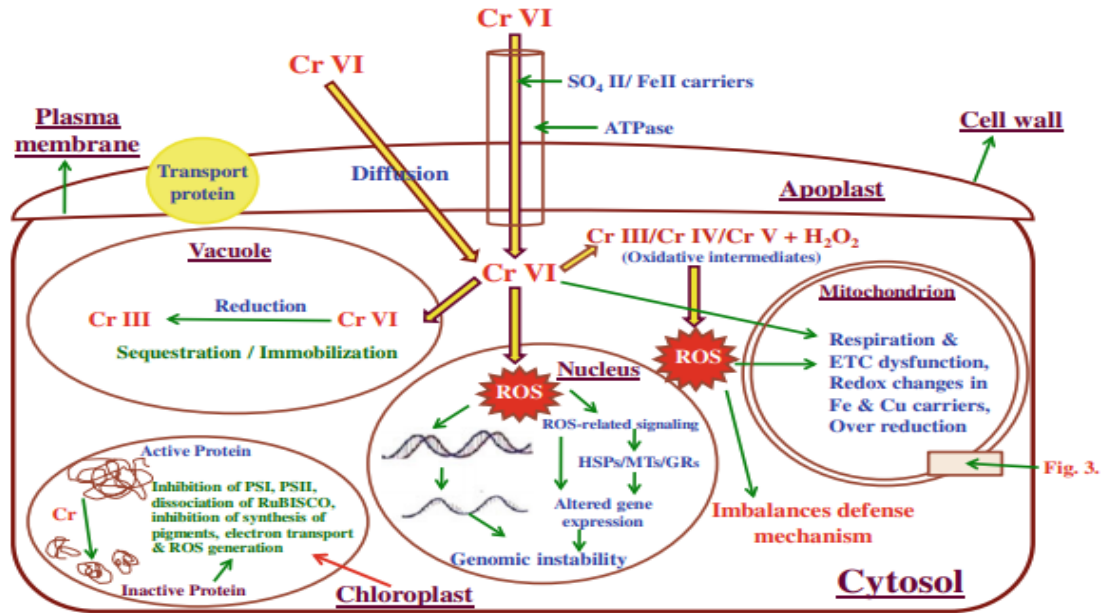


Figura 2. Mecanismo de daño del cromo hexavalente en la célula vegetal. El diagrama muestra los mecanismos de daño de Cr (VI) a la célula vegetal, entrada a la célula vegetal, los diversos organelos afectados y rutas metabólicas afectadas, así como su reducción por parte de la célula para disminuir los efectos. Tomado de Singh et al., 2013.

La presencia del Cr (VI) en el ADN afecta los microtúbulos (MTs), existen estudios para evaluar este efecto, el cual fue estudiado en *Lens culinaris* donde estabiliza a los microtúbulos, este efecto también es causado por las ROS, en consecuencia, evita la división celular (Eleftheriou et al., 2011), también se han observado efectos miogénicos/ citostáticos y alteraciones en el ciclo celular de niveles ploidales en las raíces de *P. sativum* (Rodríguez et al., 2011). La glutatión reductasa (GR) y proteínas de choque térmico (HSP), las cuales son hsp90-1, hsp20 y hsp 17.6. Las proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares que ayudan en el plegamiento de proteínas y tienen la función de proteger y reparar a las proteínas bajo condiciones de estrés (del Razo et al., 2001). Aparte de los mecanismos mencionados anteriormente, el Cr (VI) es altamente mutágeno, por lo que reacciona directamente con el ADN formando enlaces cruzados, estos son enlaces covalentes entre las bases nitrogenadas, los cuales interfieren con la replicación y transcripción (**Figura 2**) (Salnikow., 2008).

En las proteínas afecta a fotosistema 2 (PSII) disminuyendo el número de sitios activos, (Appenroth et al., 2001) este efecto se demuestra a través de la cuantificación en la producción de oxígeno en *Spirodela polyrhiza* con un electrodo de Clark, en donde comprobó que la presencia de cromo en la planta afectará diferentes sitios de PS II modificando e inhibiendo los sitios activos. También disocia a ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBISCO) la cual se encarga de la fijación de CO₂ y O₂, enzima está involucrada en la fotorrespiración y ciclo de Calvin, dos rutas metabólicas importantes en los organismos autótrofos (Andersson, 2008). Por ende, afecta a los pigmentos, debido a las ROS generadas por Cr (VI), las cuales causan la feofitización de la clorofila, donde se reemplaza el Mg²⁺ por iones H⁺ y como resultado este compuesto pierde su actividad biológica (Juarez et al., 2008).

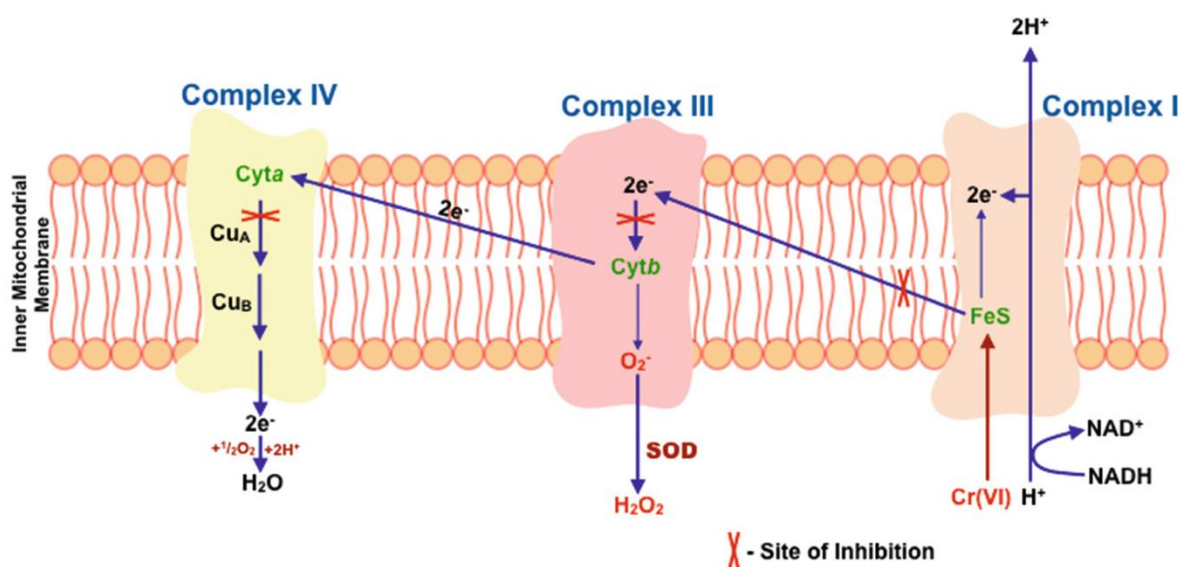


Figura 3. Efecto del cromo hexavalente en la cadena de transporte de electrones. El cromo hexavalente inhibe a los transportadores de electrones y a los citocromos. Inhibición de la cadena de transporte de electrones por Cr (VI). Tomado de Singh et al., 2013.

Sumado al daño, también afecta a las enzimas involucradas en metabolismos energéticos, como se observa en la cadena transportadora de electrones (**Figura 3**), donde afecta la formación de transportadores de electrones, otra ruta afectada es la fotosíntesis, donde interfiere con la fijación del carbono, (Shanker et al., 2005) ya que altera la actividad de las enzimas de fijación de carbono y la cadena de transporte de electrones causando una

disminución de ATP y NADPH (Larcher.,1995), también daña organelos como la mitocondria, donde disminuye la función de los transportadores de hierro y cobre (Singh et al., 2013). Por último, las ROS causan peroxidación lipídica, como resultado, comprometen la estructura celular y sus funciones. Aunado a los daños que puede causar el cromo, también genera ROS, la producción de ROS aumenta en presencia de metales pesados, debido a la reacción de Fenton, esta reacción ocurre en presencia de peróxido de hidrógeno y un metal de transición (**Figura 4**) (Pignatello et al., 1999), como producto se obtiene la oxidación de compuestos, esta reacción causa un aumento de ROS a nivel intracelular, como resultado, afecta estructuras como aminoácidos y proteínas (Graeber et al., 2012).

Fenton Reaction

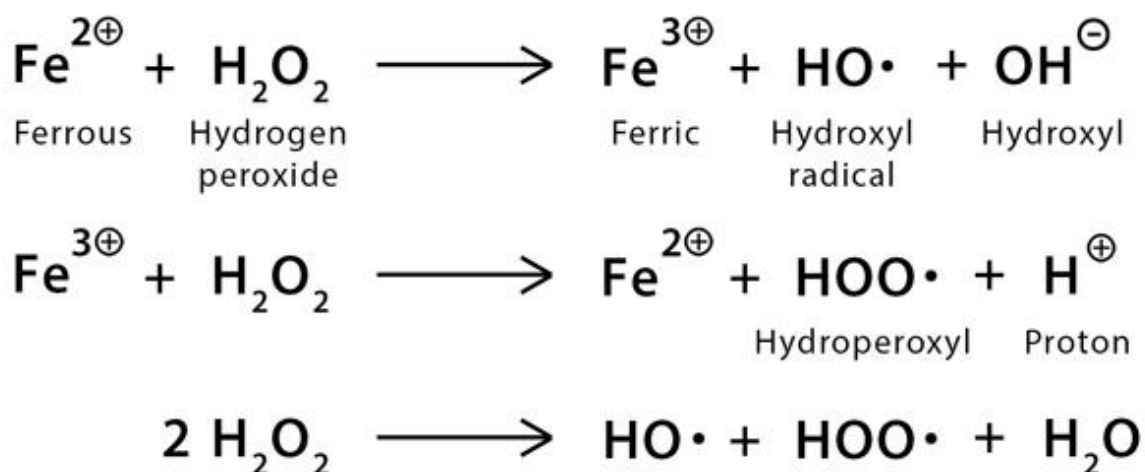


Figura 4. Síntesis de las ROS en la célula. La reacción de Fenton necesita ciertas condiciones para que ocurra como es la presencia de peróxido de hidrógeno y un metal de transición, esta reacción es ocurre en la célula y se debe a los cambios en los estados de oxidación en el metal de transición. Tomada de Pignatello., 1999.

El aumento de las ROS va a causar la sobreexpresión de enzimas como respuesta al estrés oxidativo, la tolerancia contra metales pesados se debe al ciclo ascorbato-glutatión, donde glutatión reductasa (GR) es limitada por deshidroascorbato reductasa (DHAR) para la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). En la continuación del ciclo tenemos a monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) esta enzima conecta el ciclo y

metaboliza a monodeshidroascorbato (MDHA) a ascorbato, por lo que ascorbato peroxidasa (APX) depende de la disponibilidad de ascorbato y de glutatión reducido, como producto de APX se obtiene MDHA el cual será metabolizado a ascorbato. Estas enzimas mantienen el equilibrio redox para metabolizar radicales superóxidos (H_2O_2) (Figura 5) (Hernández et al., 2017). En presencia de ROS este metabolismo mantiene el equilibrio redox, por lo que ante estrés oxidativo aumenta la síntesis de las enzimas presentes en el ciclo.

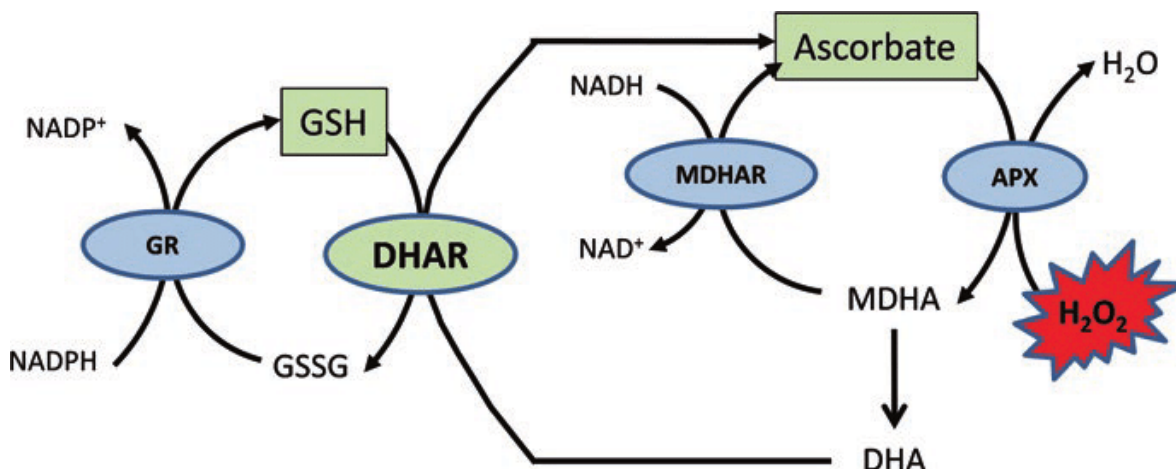


Figura 5. Importancia del ciclo ascorbato – glutatión en el metabolismo de ROS. El ciclo ascorbato glutatión, tiene como función principal mantener el equilibrio redox, el cual depende de los transportadores de electrones, si este es sobrepasado las ROS afectarán diversas funciones de la célula. Tomado de Hernández et al., 2017.

2.3 Análisis e importancia de glutatión S transferasa en *Arabidopsis thaliana* para el metabolismo de xenobióticos

Una de las enzimas encargadas de metabolizar a los xenobióticos es la glutatión S transferasa (GST), esta familia de enzimas son multifuncionales, su función principal es la detoxificación de compuestos electrofílicos (Nutricati et al., 2006). Estas enzimas se encuentran divididas en grupos pi, tau teta, zeta y lambda, los grupos pi y tau se encuentran presentes solo en plantas.

Los compuestos que metabolizan estas enzimas tienen una gran variedad, desde metabolitos secundarios, toxinas endógenas, herbicidas y productos derivados del estrés oxidativo (Neuefeind et al., 1997), la degradación de compuestos es llevada a cabo por citocromo P450, esta enzima tiene reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis del xenobiótico con el propósito de exponer o adicionar un grupo funcional, el cual es reconocido por GST. El

metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 consiste en tres fases, primero citocromo P450 reaccionará con el xenobiótico para exponer el grupo funcional, después GST reaccionará con el grupo funcional expuesto del xenobiótico para inhibirlo; por último, la conjugación de GST con el xenobiótico será reconocida y transportada a vacuolas o apoplastos por medio de transportadores de ATP dependientes (Rea., 1999).

La familia de enzimas GST son un grupo heterogéneo de proteínas multifuncionales, en las plantas se agrupan en dos clases, donde tau (GSTU) y phi (GSTF), son las más representadas y específicas a plantas, estas enzimas tienen una gran variedad de funciones catalíticas y enzimáticas en el desarrollo de la planta y como respuesta a estresores (Moons., 2005). Las enzimas glutatión S transferasa (GST) están relacionadas a la detoxificación, y confieren resistencia a los estresores, otra variación de las GST se presenta en *Oryza sativa*, la cual ayuda en la detoxificación de cobre (Cu), este metal tiene importancia biológica en la planta, pero, su exceso va a afectar el desarrollo y crecimiento de la planta (Luna et al., 2011). Existen investigaciones donde se analiza la modulación de cobre en *Oryza sativa*, en las cuales se identificaron dos genes codificantes para GST B1139 y B1195 los cuales presentaban tolerancia (B1139) y sensibilidad (B1195) a cobre (Li et al., 2018). En este trabajo se analiza el mecanismo para la tolerancia a cobre donde los genes tienen variaciones en la actividad de GST dependiendo de la concentración de cobre de 20 μM , donde la expresión de B1139 permite la reparación de daños causados a proteínas y DNA a diferencia de B1195 (Li et al., 2018).

La enzima expresada en *Oryza sativa* para glutatión S transferasa tiene una longitud de 278 aminoácidos, es un homodímero, conformado por cuatro betas plegadas en las posiciones VAL5 – GLY9, GLN31 – ARG 34, THR58 – ASP61, VAL64 – VAL67, y seis alfa hélices en las posiciones ALA14 – GLU25, GLN46 – LEU48, SER69 – LYS79, VAL183 – GLU 210, LEU221 – ALA 235 y ARG247 – SER257. El gen relacionado a la expresión de GST en *Oryza sativa* es OsGSTU30.

La enzima expresada en *Zea mays* para glutatión S transferasa tiene una longitud de 214 aminoácidos, es un homodímero conformado por seis betas plegadas en las posiciones MET 4 – TYR 8, VAL 10 – ASN 14, TYR 29 – VAL 32, ALA 57 – ASP 60, LEU 63 – GLU 67,

LYS 154 – PHE 160, y catorce alfa hélices en las posiciones LEU 15 – ALA 25, GLU 40 – LYS 42, PRO 44 – LEU 47, SER 68 – ASN 79, PRO 81 – LEU 84, LEU 89 – ASN 104, TYR 106 – VAL 117, ILE 119 – MET 122, GLN 129 – LYS 152, LEU 163 – LEU 166, VAL 169 – LEU 175, PRO 179 – ALA 186, PRO 188 – GLU 199, PRO 201 – LEU 209, posee tres regiones con sitios de interacción para glutatión en las posiciones HIS 41 – LYS 42, GLN 54 – VAL 55, GLU 67 – SER 68. El gen relacionado a la expresión de glutatión S transferasa en *Zea mays* es GST 1 el cual, se expresa en raíces y plantas de maíz (UniProt Consortium., 2021).

2.4 Análisis e importancia de UMP/CMP cinasa en *Arabidopsis thaliana* para el metabolismo de xenobióticos

Los nucleótidos son clasificados en purinas y pirimidinas, cada clase tiene rutas de metabolización independientes, dentro del metabolismo de las pirimidinas existen rutas como la síntesis *de novo* y recolección de pirimidinas (Kafer et al., 2004).

La enzima UMP/CMP cinasa expresada en *Oryza sativa* tiene una longitud de 210 aminoácidos, es un monómero, requiere de Mg^{2+} como cofactor, está conformada por cinco betas plegadas en las posiciones THR25 – GLY31, THR51 – SER54, PHE104 – ASP107, SER126 – ASP134, VAL183 – ASP187, y ocho alfa hélices en las posiciones LYS37 – PHE48, ALA55 – LYS64, GLY70, GLU79, SER85 – LYS98, GLU113 – VAL122, GLU 137 – ARG147, ILE156 – ASN 178, ILE192 – PHE203, tiene seis sitios de unión en las posiciones 60 con NMP, 115 con CMP, 147 con ATP, 151 con NMP, 162 con NMP y 190 con ATP. El gen codificante para UMP/CMP cinasa en *Oryza sativa* es URA6 (UniProt Consortium., 2021).

La enzima UMP/CMP cinasa expresada en *Zea mays* tiene una longitud de 194 aminoácidos, es un monómero, requiere de Mg^{2+} como cofactor, está conformada por cinco betas plegadas en las posiciones THR 8 – GLY 14, THR 34 – SER 37, PHE 87 – ASP 90, SER 109 – ASP 117 y VAL 166 – ASP 170. Además de estar conformada por ocho alfa hélices en las posiciones LYS 20 – PHE 31, ALA 38 – LYS 47, GLY 53 – LYS 61, SER 68 – LYS 81, GLU 96 – VAL 105, GLU 120 – ARG 130, ILE 139 – ASN 161 y ILE 175 – PHE 186, tiene seis sitios de unión en las posiciones 43 con NMP, 98 con CMP, 130 con ATP, 134 con NMP

y 145 con NMP, 173 con ATP. El gen codificante para UMP/CMP cinasa en *Zea mays* es 100193828 (UniProt Consortium., 2021).

2.5 Importancia del análisis de expresión génica en *Arabidopsis thaliana*

Los análisis de expresión génica ayudan a develar las estrategias de adaptación de las plantas y su evolución, a través de su desarrollo en el medio ambiente generan estrategias para sobrevivir en hábitats afectadas por polución (Schmid., 2005). *A. thaliana* se propone como un modelo de estudio en plantas, debido a sus características, que son: ciclo de vida corto, desarrollo en espacios pequeños, alta producción de semillas y un genoma pequeño en comparación con otras plantas, además de contar con bibliografía donde se conocen los genomas de todos los ecotipos, incluidos el ecotipo columbia 0 usado en este trabajo. Estas características convierten a *Arabidopsis thaliana* en un modelo favorable para el desarrollo de técnicas moleculares e investigación en áreas de la biología molecular (Candela., 2012). Diferentes investigaciones han demostrado la expresión génica en *A. thaliana*, con diversos enfoques, ya sea el conocer los genes expresados para la muerte celular programada (Swidiski., 2002), análisis de microRNA regulado por estrés en *A. thaliana*, en donde demuestran cambios existentes en los microRNA causados por estresores como son sequía, baja temperatura y una alta concentración de sales (Liu et al., 2008). Además, existen investigaciones hechas al género, como *A. halleri* la cual expresa genes cuya expresión favorece la síntesis de quelantes y transportadores, la síntesis de estos compuestos es regulada por la entrada de iones a la célula, en particular, la síntesis de nicotinamina es un factor clave para la hiperacumulación, esta investigación demuestra una relación entre nicotinamina y zinc en la tolerancia e hiperacumulación de metales (Weber., 2003).

2.6 Plataformas bioinformáticas en el análisis de proteomas

En la era moderna, los recursos informáticos y computacionales son una herramienta básica para procesar y analizar información. La bioinformática es un área en donde se recopila bibliografía, comúnmente de áreas biológicas, esto permite obtener una amplia cantidad de información acerca de artículos y experimentos publicados en plataformas especializadas

(Kanehisa et al., 2013). Los estudios de genomas son realizados con mayor frecuencia en las ciencias biológicas, con el objetivo de aportar información relevante para la investigación y mejora de servicios de atención médica (Kanehisa et al., 2016). Un aspecto único de KEGG es la información proporcionada, la cual está almacenada en bases de datos compartidas a otras plataformas bio-informáticas con herramientas especializadas en otras áreas como la filogenética, modelado de estructuras proteicas, información metabólica y enzimática.

La enciclopedia de genes y genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) es una base de datos que integra de forma sistemática información genómica y química, la cual es generada por diversas fuentes como son los ensayos experimentales, y tiene una amplia biblioteca de secuencias que recibe información de manera constante, por lo que es un referente para la obtención de secuencias de ADN (Kanehisa., 2000). Para entender la estructura de la plataforma, se debe conocer las tres áreas principales para la representación y manipulación de información genómica, química y bibliografía. La plataforma bio informática KEGG tiene diversas referencias a otras bases de datos, por lo que es un sistema auto suficiente para la búsqueda y análisis de genomas, moléculas y funciones celulares representadas a través de diagramas. La base de datos de proteomas es un dato único de KEGG, ya que proporciona mapas de las vías de señalización de diversos metabolismos en la base de datos PATHWAY, donde se representan y organizan por vías metabólicas y funciones, además de proporcionar acceso a las enzimas relacionadas a cada uno de ellos (Kanehisa et al., 2004).

Las plataformas KEGG y BLASTKOALA son servidores que integran datos de secuencias de genomas y metagenomas, esto permite obtener información de genomas de diversos organismos, dicha información es ordenada de acuerdo con el grupo taxonómico al que pertenece y tipo de célula, a su vez, esta plataforma bioinformática asigna un número K con la función de servir de identificador a los genes, con el propósito de evitar información redundante. BLASTKOALA es una plataforma empleada para el análisis y desarrollo de información genética, una vez hechos los análisis de la información deseada, este servidor brinda información de los resultados a través de otras herramientas de KEGG donde podemos reconstruir vías metabólicas, obtener información de diversas enzimas relacionadas al metabolismo, obtener mapas genéticos y conocer el genoma del organismo (Kanehisa.,

2017). La información puede ser descargada y manipulada para comparar o realizar mapas metabólicos usando otras plataformas bioinformáticas.

3 JUSTIFICACIÓN

La contaminación con metales pesados es un problema a nivel mundial causado por las actividades antropogénicas. El estudio de los mecanismos de adaptación de las especies vegetales al cromo hexavalente aportará un mayor entendimiento de las estrategias por las cuales los organismos vegetales generan una respuesta adaptativa en ambientes contaminados con este metal, con lo cual, se pretende establecer nuevos modelos y estrategias útiles en la fitorremediación de áreas contaminadas con metales tóxicos. Con el propósito de dilucidar estos mecanismos se usará como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*, debido a su versatilidad. Como resultado de este trabajo se espera identificar las estrategias de detoxificación de xenobióticos en presencia de cromo hexavalente.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

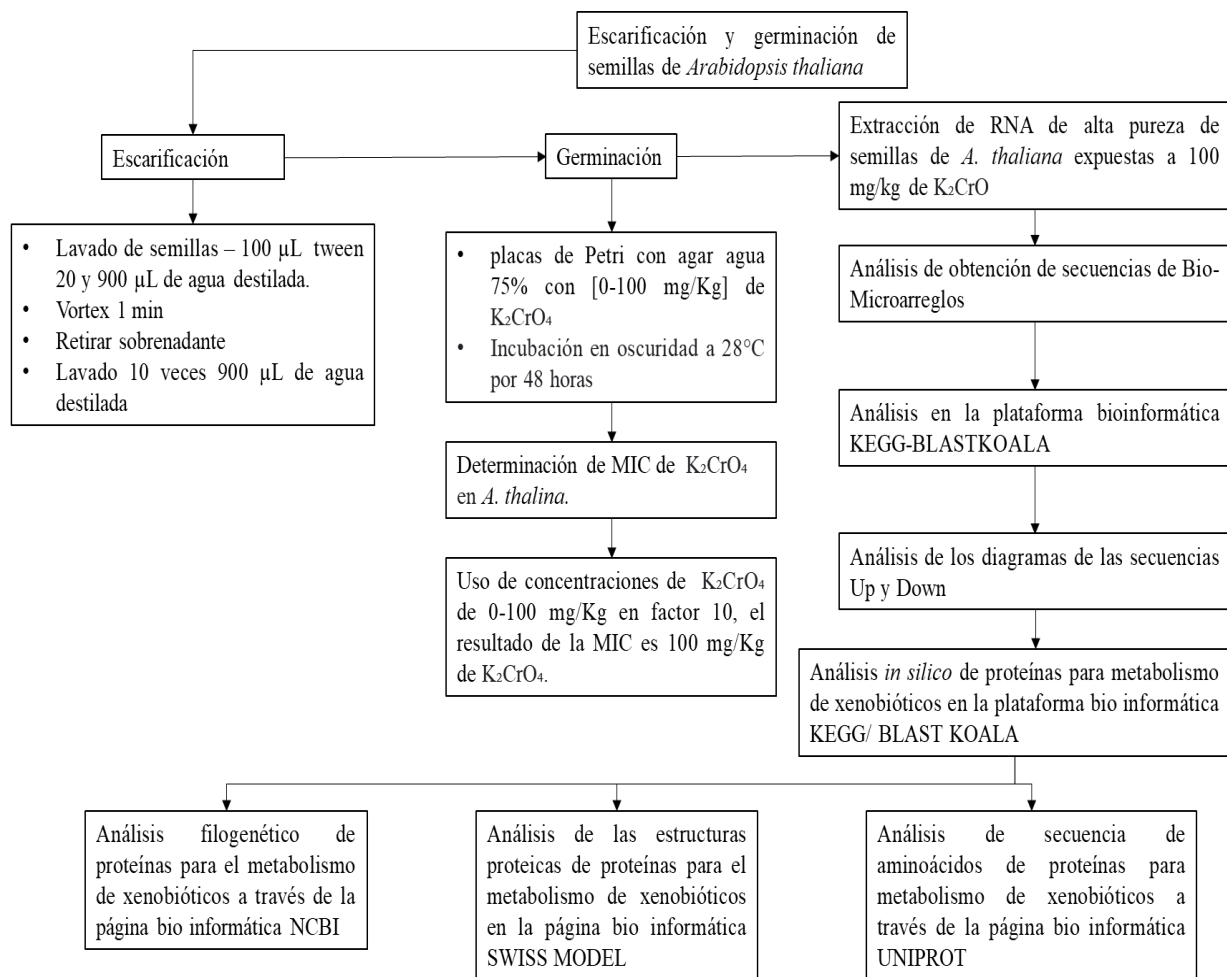
- Identificar la expresión de genes en respuesta al estrés por cromo en el modelo *Arabidopsis thaliana* mediante microarreglos y análisis bioinformático.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la expresión genética en semillas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a cromo, mediante microarreglos, como control negativo se usarán semillas de *Arabidopsis thaliana* no expuestas a cromo.
- Obtener las secuencias genéticas pertenecientes al metabolismo de xenobióticos que sufren alteraciones en la expresión ante el estrés por cromo en el modelo de *Arabidopsis thaliana* mediante el análisis *in silico* en la plataforma bioinformática KEEG/BLAST-KOALA
- Identificar las secuencias de aminoácidos de las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos que se sobre expresan ante el estrés por cromo hexavalente en el modelo de *Arabidopsis thaliana* mediante análisis *in silico* en la plataforma bioinformática KEEG/BLAST-KOALA.
- Analizar las secuencias aminoacídicas de glutatión-S-transferasa y UMP cinasa del modelo *Arabidopsis thaliana* expuesto a cromo hexavalente mediante el análisis *in silico* en la plataforma bioinformática UNIPROT.

- Analizar la estructura proteica terciaria de glutatión-S-transferasa y UMP cinasa del modelo *Arabidopsis thaliana* mediante el análisis predictivo *in silico* en la plataforma bioinformática SWISS MODEL.
- Realizar un análisis filogenético de glutatión-S-transferasa y UMP cinasa del modelo *Arabidopsis thaliana* expuesto a cromo hexavalente mediante el análisis *in silico* en /la plataforma bioinformática NCBI.

5 DIAGRAMA DE TRABAJO



6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico o grado biología molecular según sea el caso para cada ensayo experimental.

Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 donadas por parte del departamento de biología vegetal de CIBA.

6.2 Equipos

Tabla 1. Características de los equipos.

Equipo	Marca	Modelo
Centrífuga	Eppendorf	5424r
Cubeta electroforesis	Bio-Rad	Mini-Sub
Estufa de incubación de calor de convección	VELP	
Micropipetas	Labnet	Bio Pette
Mortero con pistilo		
Transiluminador UV		
Vortex	Scientific Industries	Vortex -T. Genie 2

6.3 Métodos

Tabla 2. Referencia de los métodos.

Determinación	Método	Referencia
Desarrollo de semillas de <i>A. thaliana</i>	Escarificación y germinación	Ramirez., 2020
Determinación de la MIC	Método de dilución	Ramirez., 2020
Obtención de RNA total	Trizol sigma	Kim et al., 2013
Determinación de calidad de RNA	Método BRET	Walls F., Gambhir S., 2008.
Obtención de DNAc	Retrotranscripción	Im Prom II Reverse Transcription System PROMEGA
Análisis de expresión de genes	Microarreglo	Swidinsky et al., 2002
Análisis <i>in silico</i> de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos	Plataforma bio informática KEGG/BLASTKOALA	Kanehisa., 2000
Análisis <i>in silico</i> de las secuencias aminoacídicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos	Plataforma bio informática UNIPROT	UniProt Consortium., 2021
Análisis filogenético de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos	Plataforma bio informática NCBI	Madden., 2002
Análisis <i>in silico</i> de las estructuras proteicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos	Plataforma bio informática SWISS MODEL	Waterhouse et al., 2018

7 METODOLOGÍA

7.1 Escarificación y germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en agar

La escarificación de las semillas se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo, en el cual se colocaron 150 semillas las cuales se lavaron con 100 μL de tween 20 y 900 μL de agua destilada estéril, se agitaron en el vortex durante 1 min y se retiró el sobrenadante con una micropipeta de 1000 μL suavemente, después se lavó 10 veces con 900 μL de agua destilada estéril hasta que ya no existiera ningún rastro de espuma dentro del tubo. Las semillas se colocaron en placas de Petri con agar agua 75% (v/v) a las cuales se les adicionaron diferentes concentraciones de (Cromo de potasio) de 0-100 mgKg^{-1} , usando en cada ensayo como control positivo placas sin cromo. Las placas se colocaron en una estufa de incubación de calor de convección de la Marca VELP en oscuridad para favorecer la germinación de las semillas durante 48 horas a 28°C (Ramírez et al., 2020).

7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la germinación de *Arabidopsis thaliana*

La determinación de la MIC se realizó exponiendo a las semillas escarificadas de *A. thaliana* a diferentes concentraciones de Cromo hexavalente (Cromo de potasio) de 0-100 mg/Kg (de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/Kg), hasta identificar la concentración de inhibición de la germinación de las semillas. Cada uno de estos ensayos se realizó por triplicado (3 placas con 5 semillas cada una). La germinación de las semillas de *A. thaliana* se inhibió a la concentración de 100 mg/Kg (Ramírez et al., 2020).

7.3 Ensayos y extracción de RNA de alta pureza de semillas de *Arabidopsis thaliana*

En el ensayo se colocaron las semillas escarificadas en placas de Petri con agar agua adicionado con 100 mgKg^{-1} , se incubaron en oscuridad durante 12 horas a 28°C, estas se cosecharon con una espátula de kimura y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles y nuevos, se colocaron en reposo a 4°C y posteriormente se realizó la extracción de RNA.

En un mortero con pistilo se molieron las semillas de *A. thaliana*, a estas semillas se les añadió 0.4 mL de buffer de extracción (100 mM tris-HCl pH6), se llevó a cabo la molienda y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL, la solución se agito vigorosamente en un vortex durante 15 segundos y se incubo 15 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 20 µL de SDS al 20% y se mezcló por inversión, las muestras se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 12000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y estéril de 1.5 mL. Se adicionaron 2 volúmenes de TRI REAGENTE® de la marca Sigma Aldrich, la solución se mezcló en el vortex durante 15 segundos y se incubo a temperatura ambiente durante 10 min. Se adicionaron al tubo 1/5 volúmenes de Chl:Iaa, se mezcló en el vortex 10 segundos y se centrifugo a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se recobro el sobrenadante con la micropipeta de 1000 µL y se adiciono 1 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión durante 30 s y se incubó durante 20 min a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugo a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se desecho el sobrenadante y se secaron los tubos. El pellet se lavó con 70% de etanol dos veces y se dejó secar por 10 min, y posteriormente se disolvió el RNA en 40 µL de agua DEPC (Kim et al., 2013).

7.4 Determinación de la calidad de RNA mediante electroforesis

El gel de electroforesis se realizó disolviendo 0.3 gramos de agarosa grado molecular de la marca Thermo Scientific C.a.s. 9012-36-6 en 25 ml de TAE 1X, para preparar una solución de agarosa a 1.2%. Esta solución fue vertida en una cubeta electroforesis con capacidad para 150 mL. de la marca Bio-Rad modelo Mini-Sub ® Cell GT, se colocó un peine para 8 muestras, se esperó a que se llevara a cabo la gelificación y la cubeta se colocó dentro de la cámara de electroforesis. La cámara se aforó con TAE 1X estéril para evitar la degradación del RNA. La electroforesis se llevó a cabo a 57 volts por 20 minutos. Al terminar el proceso se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (5 mg/ml). El gel se visualizó en el transiluminador UV (Walls., 2008).

7.5 Obtención y análisis de secuencias de Bio-Microarreglos

Se demostró la calidad del RNA extraído de semillas de *A. thaliana* mediante un gel de electroforesis, el análisis se llevó a cabo mediante un servicio pagado al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias de Bio-Microarreglos con genes sobre expresados y con una baja expresión que fueron obtenidas, teniendo 810 Up y 423 Down con un total de 1233 secuencias a analizar, cada una de estas secuencias se buscó en la base de datos de NCBI, obteniendo la secuencia se secuencia en formato FASTA.

7.6 Análisis en la plataforma bioinformática KEGG-BLASTKOALA

Las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas del análisis de Bio-Microarreglos 810 Up y 423 Down se transcribieron, obteniendo un diagrama de funciones predichas para cada una de las condiciones.

7.7 Análisis de los diagramas de las secuencias Up y Down

La comparación de los diagramas Up y Down fue realizada para determinar a qué vías metabólicas pertenecen los genes sobre expresados por la exposición a Cromo VI. En este momento se identificaron enzimas importantes en el metabolismo de xenobióticos que se sobre expresarán en presencia de cromo (VI).

7.8 Análisis *in silico* de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma KEGG/BLAST-KOALA

Las secuencias completas fueron introducidas en la base de datos de la plataforma Bioinformática KEEG/BLAST-KOALA, el análisis de las secuencias indicó las enzimas que se sobreexpresan en presencia de Cromo VI. Dentro de las cuales se encuentran aquellas que participan en el metabolismo de xenobióticos, estas fueron la glutatión-S-transferasa y UMP cinasa.

7.9 Análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma UNIPROT

Las enzimas obtenidas en la plataforma KEGG/BLAST KOALA fueron buscadas en la plataforma UNIPROT, las cuales fueron, glutatión-S-transferasa de 221 aminoácidos y UMP/CMP cinasa de 202 aminoácidos.

7.10 Análisis predictivo *in silico* de las estructuras proteicas de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma SWISS MODEL

Las enzimas glutatión-S-transferasa y UMP cinasa fueron analizadas y comparadas con las que se encuentran en la base de datos de la plataforma SWISS MODEL, de la cual se obtuvieron las estructuras terciarias, sitios activos y cofactores necesarios para la función de las enzimas.

7.11 Análisis filogenético de las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos en la plataforma NCBI

Las enzimas glutatión-S-transferasa y UMP/CMP cinasa se analizaron en la plataforma NCBI, a través de esta página se realizó un análisis de alineamiento múltiple en el cual se obtuvieron 33 secuencias para la comparación con glutatión-S-transferasa y 40 secuencias para la comparación con UMP/CMP cinasa, posteriormente se realizaron los árboles filogenéticos a través de la plataforma bio informática NCBI usando las secuencias antes mencionadas.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo se enfocó en las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos debido a su función de evitar y contrarrestar los efectos dañinos causados a la célula por la presencia de cromo (VI). Uno de los aspectos importantes en el análisis de expresión es definir las condiciones del estudio, en este trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cromo (VI) en *Arabidopsis thaliana* (**Tabla 3**), posteriormente se realizó la extracción de RNA total, utilizado para la evaluación de expresión genética (**Figura 6**).

Tabla 3. La germinación de semillas en *A. thaliana* fue inhibida a la concentración de 100 mg/Kg de cromo (VI).

Semillas germinadas			
Concentración	grupo 1	grupo 2	grupo 3
Cromo (VI)			
0 mgKg ⁻¹	5	5	5
10 mgKg ⁻¹	5	5	5
20 mgKg ⁻¹	5	5	5
30 mgKg ⁻¹	5	5	5
40 mgKg ⁻¹	5	5	5
50 mgKg ⁻¹	5	5	5
60 mgKg ⁻¹	5	5	5
70 mgKg ⁻¹	4	4	3
80 mgKg ⁻¹	3	3	3
90 mgKg ⁻¹	1	1	1
100 mgKg ⁻¹	0	0	0

La **Tabla 3**, muestra el proceso de germinación de semillas, esta fue realizada en 10 placas Petri con agar agua al 75%, las cuales contenían concentraciones de cromo (VI) de 0 a 100 mg/kg en factor 10, en cada placa se colocaron 5 semillas. La determinación de la MIC fue realizada por triplicado.

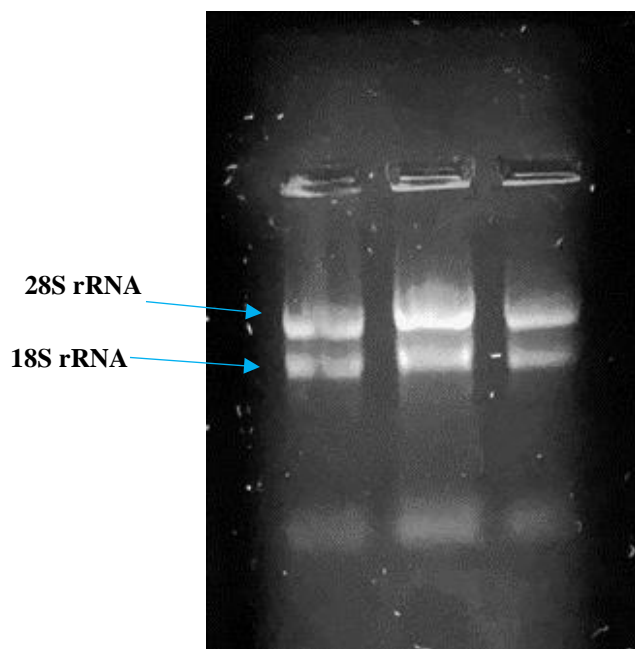


Figura 6. Extracción de RNA total en *A. thaliana*. Se realizó la electroforesis desnaturizante de RNA total a partir de 100 mg/kg de semillas de *A. thaliana*, la extracción de RNA se realizó con el protocolo Trizol sigma, fue realizado por triplicado donde se identifican las unidades 28S rRNA, 18S rRNA.

En la **Figura 6** se muestra los resultados de la extracción del RNA y la corroboración de la pureza mediante la realización de un gel de agarosa, se observan las subunidades 28S rRNA y 18S rRNA, a partir del aislamiento de RNA total se realizó el análisis de expresión genética, como resultado se identificaron las alteraciones en la expresión de las enzimas; se identificaron a aquellas relacionadas al metabolismo de xenobióticos en *Arabidopsis thaliana*, estas fueron analizadas en la plataforma KEGG/BLASTKOALA, como resultado se observó que las alteraciones se encuentran en la secuencia de genes Up, en las enzimas relacionadas al metabolismo de xenobióticos, glutatión S transferasa y UMP/CMP cinasa. Los resultados de los análisis de secuencias aportan información sobre el metabolismo de *Arabidopsis thaliana* cuando se encuentra expuesta a la concentración de 100 mg/Kg de cromo (VI). En la **Figura 7 A y 7 B** se muestran las secuencias genéticas que son expresadas y la distribución de los genes para la expresión de enzimas, en la **Figura 7 A** se analizaron 52 secuencias sobre expresadas y la **Figura 7 B** 57 secuencias, con estas secuencias se determinó la función de las enzimas en el metabolismo de *Arabidopsis thaliana*, entre las enzimas alteradas se encontraron las enzimas con función en la detoxificación celular

evitando el daño causado por cromo (VI) y estrés oxidativo. Después de obtener los resultados de la expresión genética mediante el análisis de los microarreglos, fueron analizados a través de la plataforma bio informática NCBI, donde se obtuvieron las secuencias FASTA, las cuales se analizaron en la plataforma KEGG/BLASTKOALA, el resultado del análisis se representa gráficamente, donde observamos la proporción de enzimas expresadas como se muestra en la **Figura 7 A y 7 B**.

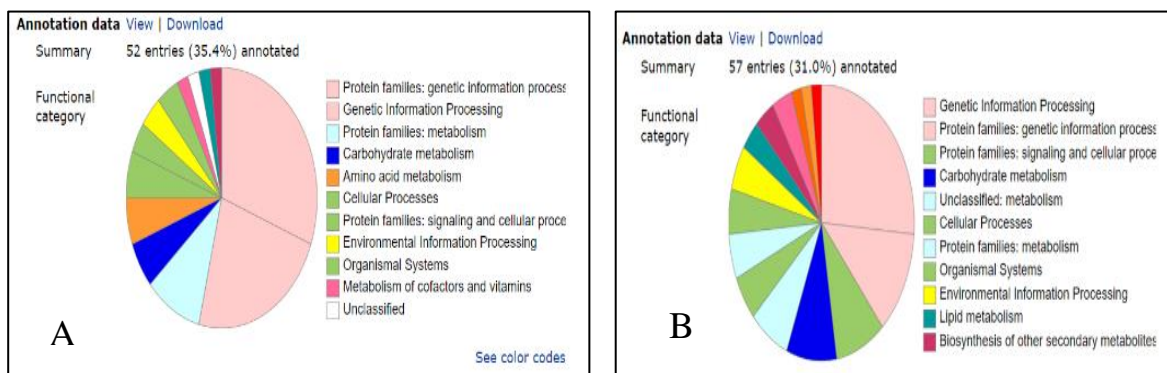


Figura 7. Alteraciones en la expresión de genes codificantes a proteínas de *A. thaliana*. Los resultados del análisis de expresión de las secuencias obtenidas de los microarreglos permiten identificar las alteraciones en la expresión de genes donde se analizó la respuesta de *A. thaliana* a cromo (VI) a una concentración de 100 mg/Kg, donde la gráfica (A) tenemos la secuencia up y en la gráfica (B) la secuencia down en la plataforma KEGG/BLAST KOALA. Tomada de Kanehisa., 2019.

En ambas figuras se muestra la presencia de las diferentes secuencias Up (**7 A**) y Down (**7 B**) en la imagen se muestra un aumento de la expresión de 52 secuencias Up (**7 A**), mientras que para las secuencias Down un número de 57 secuencias (**7 B**), en estas secuencias se observa la sección de color rosa que en el caso de la **Figura 7 A** dos tercios de las secuencias pertenecen a familias de proteínas las cuales no se tiene bien dilucidada su función, mientras que en la **Figura 7 B** muestra que más de un tercio de las secuencias pertenecen a familias de proteínas, las cuales todavía no se tiene bien dilucidada su función, algunas de las secuencias de las que sí se conoce su función pertenecen al metabolismo de carbohidratos, lípidos y xenobióticos como se muestra en la **Figura 7**.

Una vez obtenidas las gráficas de la plataforma bio informática KEGG/BLAST KOALA se realizaron tablas para la comparación de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos

obteniendo la sobre expresión (Up) de 8 secuencias relacionadas con este metabolismo y 4 secuencias con disminución de la expresión (Down), para el caso de los lípidos encontramos 3 secuencias con sobreexpresión (Up) y 1 secuencia con disminución de la expresión (Down) y para el metabolismo de agentes xenobióticos se encontraron cuatro secuencias sobre expresadas (Up) dentro de las cuales encontramos las pertenecientes a las enzimas como glutatión-S-transferasa y UMP cinasa **Tabla 4.**

Tabla 4. Resumen de las alteraciones de los metabolismos energéticos de *Arabidopsis thaliana*.

UP		DOWN	
Nombre	Número de alteraciones	Nombre	Número de alteraciones
Metabolismo carbohidratos	8	Metabolismo carbohidratos	4
Metabolismo lípidos	3	Metabolismo lípidos	1
Metabolismo xenobióticos	4		

En la **Tabla 4** se observan las alteraciones de diversos metabolismos causadas por cromo (VI) en la célula. En el metabolismo de carbohidratos presenta un aumento en la sobre expresión de 6 enzimas relacionadas con este metabolismo las cuales son fosfatidil fosfolipasa C (3.1.4.11), trialosa fosfatasa (3.1.3.12), glucorocinasa (2.7.1.43), glucogeno fosforilasa (2.4.1.1), 4-alfa-glucanotransferasa (2.4.1.25), L-gulonolactona oxidasa (1.1.3.8), el aumento de la expresión de estas enzimas favorece la obtención de energía para la síntesis de quelantes y metaloproteínas para generar una respuesta a cromo, además se presentaron alteraciones en estas rutas con una baja expresión en las enzimas UDP glucosa 4 epimerasa (5.1.3.2), L-gulonolactona oxidasa (1.1.3.8) e inositol-pentaquinofosfato 2-cinasa (2.7.1.158) debido a los efectos negativos del cromo (VI) en rutas energéticas (Singh et al., 2013). En el metabolismo de lípidos tenemos una sobre expresión de dos enzimas: ceramidasa (3.5.1.23), enzima encargada de la síntesis de esfingosina 1 fosfato, compuesto precursor para la síntesis de esfingolípidos, los cuales se encuentran en las membranas celulares y diacilglicerol cinasa, (2.7.1.107) la cual está involucrada en la síntesis de fosfolípidos y triacilglicerol. El aumento

de expresión de dichas enzimas compensa los daños causados por peroxidación lipídica inducida por las ROS a la membrana celular sintetizando nuevos lípidos de membrana (Singh et al., 2013), a pesar de esto, el cromo (VI) disminuye la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de lípidos como, CDP-diacilglicerol sintasa (2.7.7.41), cuyo compuesto es usado en la síntesis de glicerofosfolípidos (Ercal et al., 2001). Por último, existe un aumento en la expresión de enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos, estas enzimas son glutatión S transferasa y UMP/CMP cinasa, el aumento de expresión es en respuesta al estrés oxidativo causado por cromo hexavalente, el cual favorece la síntesis de ROS a nivel intracelular, enzimas como glutatión-S-transferasa y UMP cinasa tienen función en la producción de factores celulares detoxificantes como el glutatión (Hernández et al., 2017).

8.1 Análisis *in silico* de la enzima glutatión S transferasa expresada en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente

8.1.1 Función e importancia de la enzima glutatión S transferasa en el metabolismo de xenobióticos

La enzima glutatión S actúa como agente detoxificante, esta relacionada con el metabolismo de la ciclofosfamida, la ciclofosfamida es un agente alquilante del ADN el cual tiene acción antitumoral, el mecanismo de acción de la ciclofosfamida parte de la activación en citocromo P450 donde es metabolizado a 4-hidroxiciclofosfamida (Chen et al., 1997), el cual es disociado a acroleína y fosforamida mostaza, la actividad de la ciclofosfamida se debe a la presencia de grupos bis-(2-cloroetil), una de las cadenas de 2-cloroetilo sufre una ciclización molecular y a través de una cadena de reacciones conllevan a la alquilación de los residuos de guanidina del ADN, la alquilación vuelve más lábil al anillo imidazólico causando daños a la cadena de ADN, mientras que la segunda cadena de cloro-etilo alquila un segundo residuo de guanidina provocando un entrecruce de las cadenas de ácidos nucleicos o la unión de un ácido nucleico con una proteína (Schwartz., 2001), estos daños producirán el inicio del proceso apoptótico en la célula, el metabolismo de la ciclofosfamida se muestra en la **Figura 8** en el cual se observa el metabolismo de la ciclofosfamida, dentro del diagrama se observa la enzima glutatión S transferasa, cuya función en este diagrama es la inactivación de la ciclofosfamida para su posterior excreción.

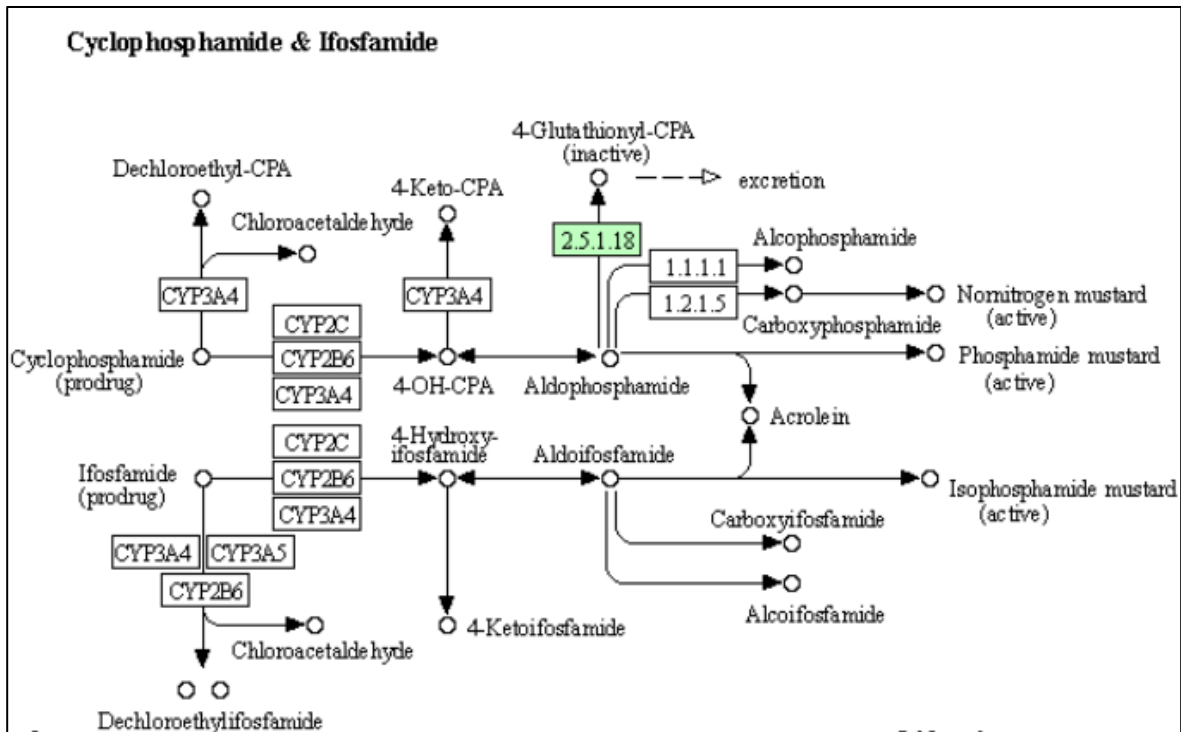


Figura 8. Señalización de la ciclofosfamida para su activación como compuesto antitumoral. En el diagrama se observa la presencia de la enzima glutatión S transferasa (2.5.1.18) en el metabolismo de la ciclofosfamida, el cual es un compuesto con actividad antitumoral. Tomado de Kanehisa., 2019.

La reacción de glutatión S transferasa en el metabolismo de ciclofosfamida es una sustitución electrofílica, el producto es 4-glutationil ciclofosfamida, este compuesto no tiene actividad y es excretado al medio extracelular por medio de transportadores de ATP dependientes a través del sistema del citocromo P450 (Rea., 1999). La reacción química de esta enzima se representa en la **Figura 9**.

Catalytic activity³

- glutathione + RX = a halide anion + an S-substituted glutathione + H⁺
EC:2.5.1.18
Source: Rhea. « Hide

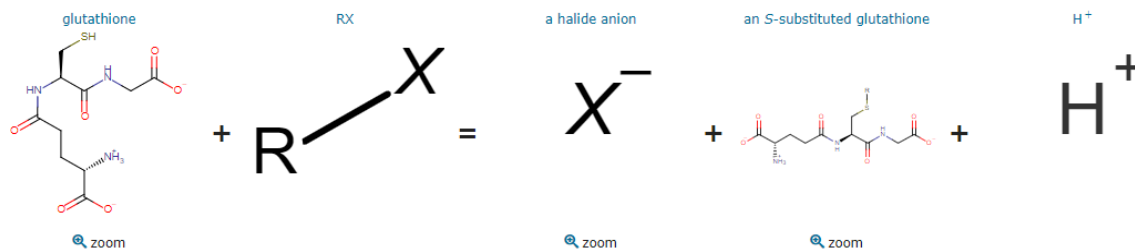


Figura 9. Glutación S transferasa reacciona con los grupos funcionales de xenobióticos. La reacción de la enzima glutación S transferasa (2.5.1.18) inactiva a los compuestos con los que forma un enlace covalente mediante el grupo tiol de glutación S transferasa. Tomado de UniProt Consortium., 2021.

La actividad de glutación S transferasa ayuda a metabolizar compuestos para su detoxificación por parte de las isoenzimas pertenecientes al sistema del citocromo P450, esta enzima tiene un papel importante debido a que tiene un amplio rango de sustratos, existen diversas familias de estas enzimas especializadas para cada organismo (Nutricati et al., 2006).

8.1.2 Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de las enzimas glutación S transferasa en la plataforma UNIPROT

Una vez determinado el papel de la glutación S transferasa en *Arabidopsis thaliana* en la cual está relacionada en el metabolismo de xenobióticos como ciclofosfamida, el cual es un ejemplo del mecanismo de acción detoxificante de esta enzima, se determinó el identificador para la secuencia de la enzima obtenido de la plataforma KEGG/BLASTKOALA, se realizó su búsqueda en la plataforma bioinformática UNIPROT, y se encontró la secuencia de aminoácidos perteneciente a la enzima, el organismo al que pertenece y el gen codificante, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de glutación S transferasa, como se muestra en la **Tabla 5**, a partir de la cual se realizó el modelado de la estructura terciaria en la plataforma SWISS MODEL.

Tabla 5. Las secuencias canónicas permiten la visualización clara de la estructura a pesar de la existencia de modificaciones post traduccionales

Número de acceso	Q9SHH7
Proteína	Glutación S transferasa
Gen	GSTU25
Organismo	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Secuencia FASTA	MADEVILLDFWPSMFGMRTRIALEEKNVKFDYREQDLWNKSPILLEMN PVHKKIPVLIHNGNPVCESLIQIEYIDEVWPSKTPLLPSDPYQRAQAKFW GDFIDKKVYASARLIWGAKGEEHEAGKKEFIEILKTLESELGDKTYFGG ETFGYVDIALIGFYSWFEAYEKFGSFSIEAECPKLIAWKGRCVERESVAK SLPDSEKIIKFVPELRKKLGIIE
Longitud	221
Masa (Da)	25 591

La plataforma UNIPROT es una herramienta bioinformática útil que concentra una gran cantidad de secuencias pertenecientes a análisis proteómicos, presenta una base de datos de proteomas de diversos organismos y comparte bases de datos con la plataforma GenBank (UniProt Consortium., 2021), debido a esto se emplea para la determinación de secuencias de aminoácidos, donde identifica la secuencia comparada con la base de datos representativa hasta el momento disponibles en la bibliografía, organismo y el gen que codifica para su expresión, obteniendo la secuencia canónica, la cual se determina a partir del análisis de diversas secuencias del mismo gen, para la enzima glutación S transferasa se encontró una secuencia de 221 residuos aminoacídicos y con una masa de 25 591 kDa, la secuencia se muestra en la **Tabla 5**.

GSTU 25 es el gen que expresa a glutación S transferasa en *Arabidopsis thaliana*, este gen pertenece al grupo tau, el cual se conoce su papel en la respuesta a estresores ambientales en *Arabidopsis thaliana*, estos estresores son variaciones en la temperatura, así como especies reactivas de oxígeno y sales de metales (Nutricati., 2006).

8.1.3 Análisis *in silico* de la estructura proteica terciaria de la enzima glutatión S transferasa en la plataforma Swiss Model

La estructura de la enzima glutatión S transferasa en *Arabidopsis thaliana* expuesta a cromo (VI) contiene 221 residuos aminoacídicos, es un homodímero, conformado por cuatro hojas betas plegadas en las posiciones VAL 5 – ASP 9, ASP 31 – GLU 34, VAL 56 – HIS 59 y ASN 62 – CYS 65 y nueve alfa hélices, las cuales están en las posiciones MET 14 – GLU 25, PRO 42 – MET 47, SER 67 – VAL 77, PRO 89 – GLY 115, GLY 118 – LEU 139, TYR 152 – TYR 161, PHE 164 – GLU 178, PRO 180 – SER 198, SER 202 – LYS 215, tiene sitios de unión a GSH en las posiciones SER 13, PHE 15, LEU 37, LYS 40, LYS 52, LYS 53, ILE 54, PHE 55, GLU 66, SER 67, PHE 15, TYR 107 y ARG 111, contiene cuatro residuos aminoacídicos de metionina, equivalentes al 1.80% de los residuos totales en las posiciones MET 1, MET 14, MET 17, MET 47, y tiene doce residuos aminoacídicos de prolina equivalentes al 5.42%, estos se encuentran en las posiciones PRO 12, PRO 42, PRO 49, PRO 55, PRO 63, PRO 79, PRO 83, PRO 86, PRO 89, PRO 180, PRO 202, PRO 209, como se muestra en la **Figura 10**.

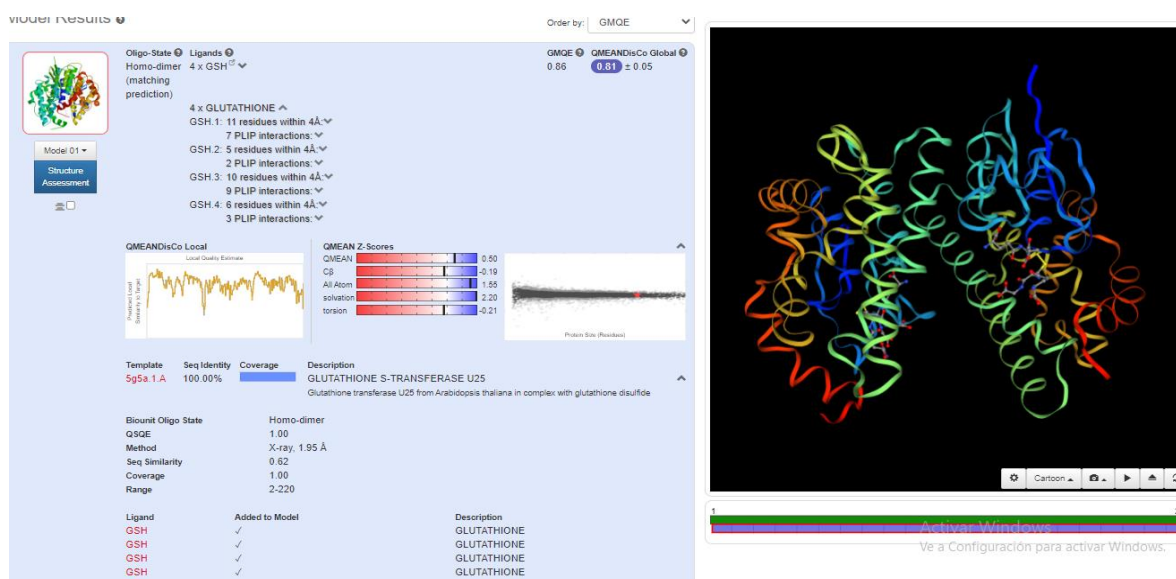


Figura 10. El modelado predictivo de GST muestra las posiciones de estructuras, sitio activo y ligandos. El modelado de la estructura terciaria de la enzima glutatión S transferasa muestra la estructura conformada por alfa hélices y hojas betas laminares, la posición del sitio activo y predice estadísticamente la actividad biológica

Dentro de los parámetros de validación para modelos predictivos de proteínas, Swiss model nos refiere a un diagrama de dispersión como se muestra en la **Figura 11**, en el cual, se comparan los modelos biológicos y predictivos existentes de la base de datos con el modelo generado de la enzima, a su vez representa gráficamente la posición del modelo estudiado que es mostrado con una estrella en la gráfica de dispersión (**Figura 11**) en esta figura se observa una comparación con los modelos presentes en la base de datos PDB de las enzimas glutatión S transferasa, y grafica el tamaño de la proteína contra el Normalized QMEAN4 Score, (Waterhouse et al., 2018) esta comparación permite determinar en un intervalo de confianza de $p \leq 0.05$ que el modelo es consistente y presenta similitudes con los modelos de comparación, por lo tanto, la representación gráfica indica que mientras más cercano el modelo se muestre al aglomerado de los puntos dentro de la gráfica, es estadísticamente más probable que la secuencia de aminoácidos pertenezca a una enzima con actividad biológica.

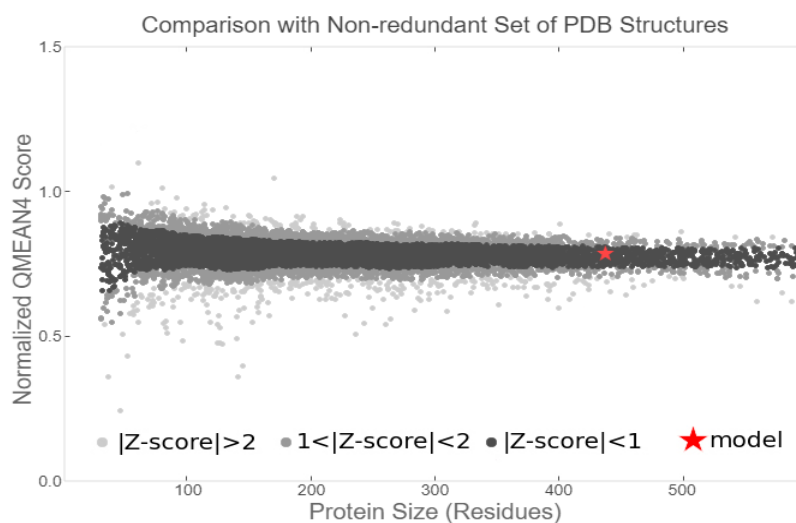


Figura 11. Los diagramas de dispersión demuestran la relación entre un conjunto de variables. En el diagrama podemos encontrar el modelo de la enzima glutatión S transferasa, donde tenemos como variables el tamaño de la proteína y el valor de QMEAN4, dicho valor permite hacer una línea de tendencia con la cual comparar el modelo obtenido, la comparación con los modelos existentes en la plataforma crea intervalos de confianza donde tenemos el rango $Z\text{ score} < 1$ estadísticamente, todos los modelos en este intervalo presentan la actividad biológica estudiada, ya que el modelo creado está en este intervalo se deduce que presenta actividad.

La **Figura 12** muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de nuestro modelo comparada con los modelos presentes en la base de datos, en este se muestra la distribución de la secuencia de aminoácidos y su distribución, los aminoácidos pertenecientes a la glutatión S transferasa y aquellos que pertenecen a modelos de la base de datos presentan variaciones respecto a la secuencia utilizada, los aminoácidos que no se encuentran en el intervalo de confianza están remarcados de color rojo y se observan en la gráfica. Los aminoácidos de color rojo son aquellos que estadísticamente no corresponden al aminoácido ni la posición de los modelos de comparación con nuestra secuencia de aminoácidos, dichas posiciones son: ALA 2, LYS 81, THR 82, GLU 219, las cuales no se encuentran en las posiciones del sitio activo de la enzima.

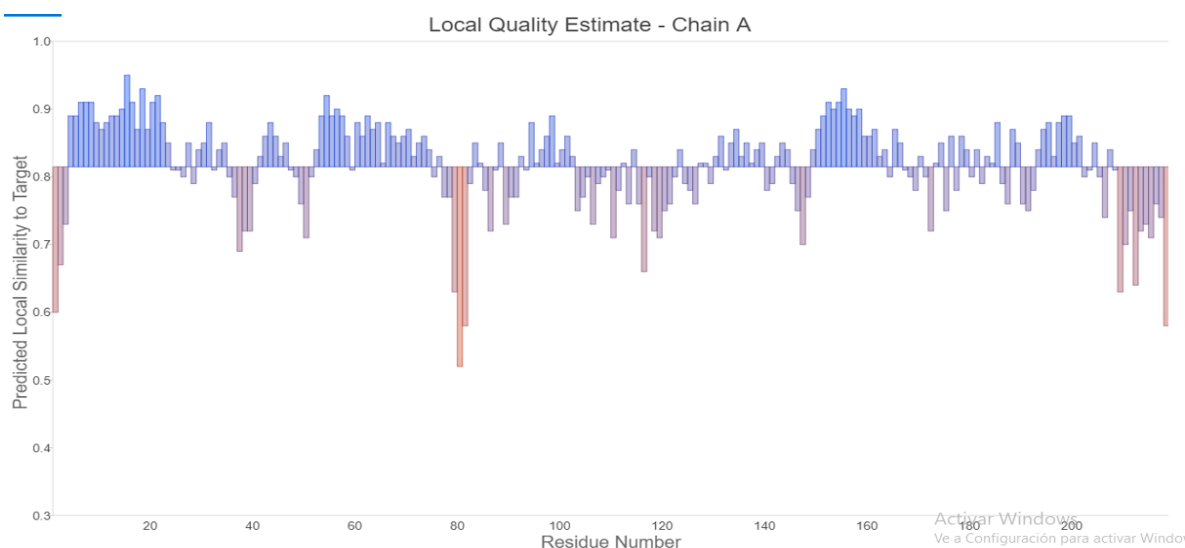


Figura 12. La comparación de la secuencia de aminoácidos no muestra alteraciones en el sitio activo de GST. En el diagrama se observa el análisis de la secuencia de aminoácidos de glutatión S transferasa, donde tenemos como criterio la predicción de similitud, en el diagrama se muestra la secuencia de aminoácidos, los coloreados en rojo representan las posiciones que varían en comparación con las secuencias obtenidas de las bases de datos. Tomado de Waterhouse et al., 2018.

Un parámetro importante en el análisis de estructuras proteicas es la identificación del sitio activo, los cuales fueron señalados anteriormente, de esta forma se conoce el sitio activo de *A. thaliana* el cual está conformado por 13 residuos aminoacídicos en las posiciones posiciones SER 13, PHE 15, LEU 37, LYS 40, LYS 52, LYS 53, ILE 54, PHE 55, GLU 66, SER 67, PHE 15, TYR 107 y ARG 111. El sitio activo de *O. sativa* interacciona con GSH,

está conformado por 16 residuos aminoacídicos en las posiciones SER 13, THR 14, ALA 15, VAL 16, ARG 18, LEU 37, GLN 42, LYS 43, GLY 54, GLN55, VAL 56, PRO 57, ASP 68, SER 69, ARG 70 y GLN 108. Por último, *Z. mays* posee un sitio activo para lactoglutación conformado por 12 residuos en las posiciones SER 12, ASN 14, PHE 36, HIS 41, LYS 42, GLN 54, VAL 55, PRO 56, GLU 67, SER 68, ARG 69 y ASN 104. Los sitios activos de *O. sativa* y *Z. mays* se encuentran conformados por 13 y 16 residuos aminoacídicos.

Los sitios activos de glutatión S transferasa en *O. sativa* y *Z. mays* y *A. thaliana* no tienen alteraciones en sus secuencias de aminoácidos, se deduce que su función biológica no es afectada por la presencia de cromo (VI).

8.1.4 Análisis filogenético de la enzima glutatión S transferasa en la plataforma NCBI

El análisis filogenético de la enzima fue realizado en la plataforma bio informática NCBI donde usando el identificador de la enzima glutatión S transferasa y el organismo, fue seleccionado. Se obtuvo el mapa filogenético de la enzima, la glutatión S transferasa tiene una gran diversidad de patrones de expresión durante estrés, actualmente se tienen identificados 55 isotipos de GST en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Dixon., 2010), el gen responsable de la expresión de glutatión S transferasa bajo condiciones de estrés por cromo (VI), es GSTU25 como se muestra en la **Figura 13**.

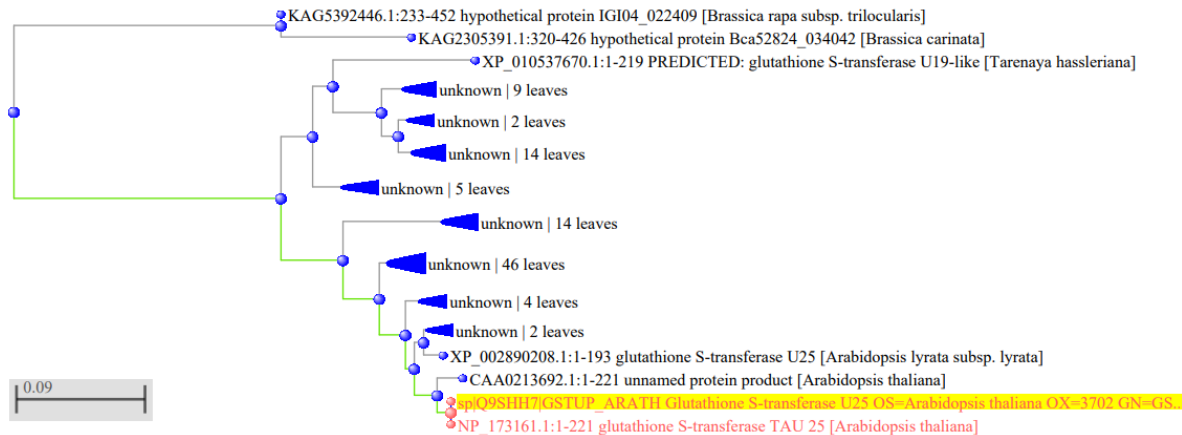


Figura 13. La presencia de cromo hexavalente altera la expresión de GST. En el árbol filogenético se observa el gen que codifica para glutatión S transferasa en *Arabidopsis thaliana*, el cual se encuentra subrayado, este mapa filogenético se realizó con el alineamiento múltiple de 33 secuencias, se usó el método neighbor-joining, así como el método Kimura, la distancia escala es de 0.09 este árbol fue realizado en la plataforma NCBI.

En el árbol filogenético se dibuja la escala con longitudes de rama medidas por el número de sustituciones por sitio. El análisis de la enzima glutatión S transferasa presenta una secuencia paróloga, la cual se sospecha es causada por la presencia de cromo (VI), que modifica la expresión de dicha enzima. No obstante, se debe tener en cuenta los alcances de los análisis filogenéticos, cuyo fin es obtener una estimación de la similitud entre las secuencias comparadas, para realizar este árbol filogenético se incluyeron 33 secuencias las cuales se encuentran en el **Anexo 1**. El árbol filogenético obtenido es del tipo cladograma, se utilizó el método de distancia Kimura, este método es aplicado únicamente para aminoácidos, este método permite evaluar la similitud de dos secuencias, donde predice la distancia evolutiva entre las secuencias analizadas, en este método las secuencias son tratadas por separado (Kimura., 1980). Además, se realizó con el método de agrupación neighbor-joining, con el objetivo de minimizar la distancia entre secuencias, la distancia a escala presenta las diferencias entre secuencias la cual tiene valores de 0 a 1, siendo 0.09 el 9% de diferencia entre secuencias para este árbol filogenético, este criterio es importante ya que la homología de un árbol filogenético permite realizar un análisis significativo al tener genes similares, con los cuales se discernirá del gen a estudiar (Hall., 2013), en este análisis se muestra la cercanía de la secuencia de aminoácidos con la secuencias pertenecientes de la especie *Arabidopsis thaliana* y la especie *Arabidopsis lyrata* asegurando con un 100% y 99% de identidad

respectivamente, mientras que para *Brassica rapa* se muestra una identidad de un 89%, este valor representa la distancia dentro del árbol y la diferencia de rama en la cual se encuentran dichos organismos.

Después de obtener el árbol filogenético se realizó un análisis de identidad entre las enzimas glutatión S transferasa de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*, Se realizó la comparación de las enzimas glutatión S transferasa de *Arabidopsis thaliana* con *Zea mays* (**Tabla 6**), sin embargo, en *Oryza sativa* el resultado de la comparación demuestra que las enzimas de estos organismos no guardan relación entre ellas.

Tabla 6. La selección de secuencias es importante de acuerdo al objetivo del análisis filogenético.

Comparación de glutatión S transferasa: <i>A. thaliana</i> – <i>Z. mays</i>	
Porcentaje de identidad	23.29%
Valor E	0.031

La comparación de las secuencias aminoacídicas de glutatión S transferasa en *A. thaliana*, *O. sativa* y *Z. mays*, demostró no tener similitud entre las secuencias de *A. thaliana* y *O. sativa*. En el análisis con la secuencia de *Z. mays* obtuvo un 23.29% de similitud, a pesar de ser las mismas enzimas no presentan un porcentaje de similitud relevante, este valor no es representativo, respecto a bases de datos de proteínas las cuales consideran que para que exista una similitud representativa deben tener un 70% de identidad, esto tiene como efecto que las secuencias de aminoácidos codificantes para estas proteínas tengan una estructura similar (Heringa., 2008).

Con la información antes mencionada, se deduce que no existe relación entre las enzimas de glutatión S transferasa de *O. sativa* y *Z. mays*, respecto a la enzima de *A. thaliana*, esto se debe a las variaciones en la secuencia aminoacídica, así como el porcentaje de identidad. A pesar de las variaciones en la secuencia de aminoácidos codificante, se consideró esta comparación con dichos organismos debido a la existencia de estudios de efectos de altas concentraciones de metales pesados en estos (Yang et al., 2015) (Srivastava et al., 2018), esperando obtener una respuesta equiparable en *Arabidopsis*. En *Oryza sativa* el gen que expresa a la enzima glutatión S transferasa es OsGSTU30, el cual tiene un amplio rango de

respuesta a estresores. En el estudio de Srivastava et al., 2018 se analizó la expresión de este gen, el cual se sobre expresa bajo condiciones de estrés por cromo (VI) y sequía. La expresión de los genes GSTU 25 y OsGSTU30 tienen efectos similares y OsGSTU30 es sobre expresado bajo condiciones de estrés por cromo (VI).

8.2 Análisis *in silico* de la enzima UMP/CMP cinasa expresada en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés por cromo hexavalente

8.2.1 Función e importancia de la enzima UMP/CMP cinasa en el metabolismo de xenobióticos

Los resultados de las alteraciones en el metabolismo de xenobióticos indican la expresión de la enzima UMP/CMP cinasa en el metabolismo del fluorouracil; este es un compuesto con actividad antineoplásica, el cual para tener actividad debe ser metabolizado a 5-deoxifluridin, este compuesto inhibe a la timidilato sintasa y en consecuencia inhibe la síntesis de DNA (Pinedo et al., 1988), como se muestra en la **Figura 14**.

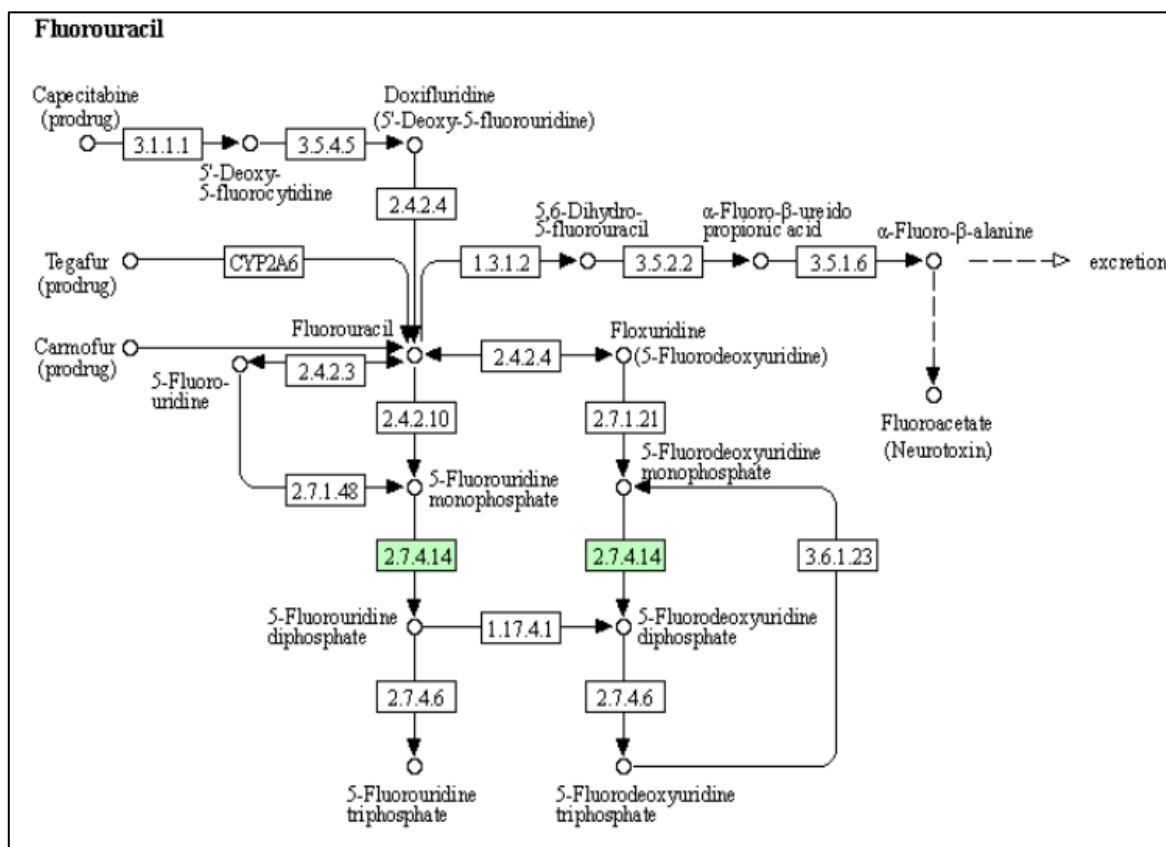


Figura 14. La reacción de UMP/CMP cinasa en fluorouracil confiere actividad biológica a su metabolito. En el diagrama se observa la presencia de UMP/CMP cinasa, la cual es la enzima 2.7.4.14 en el metabolismo de fluorouracil, su función es la activación de este compuesto para generar actividad biológica. Tomado de Kanehisa., 2019.

La actividad de UMP/CMP cinasa en el metabolismo de fluorouracil es la fosforilación de 5-fluorodeoxidin monofosfato, el cual es un precursor para 5-fluorodeoxidin trifosfato, este compuesto tiene actividad antitumoral, la reacción de la enzima UMP/CMP cinasa esta representada en la **Figura 15**.

Catalytic activity¹

- ATP + CMP = ADP + CDP [UniRule annotation](#) [1 Publication](#)
 - EC:2.7.4.14 [UniRule annotation](#) [1 Publication](#)
- Source: Rhea. [Hide](#)

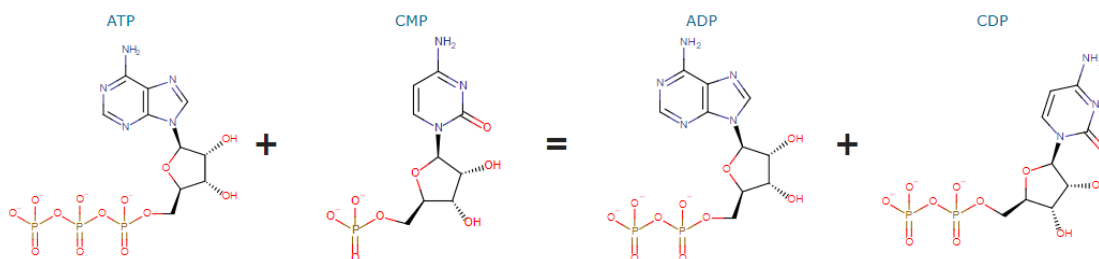


Figura 15. UMP/CMP cinasa está relacionada a la síntesis de proteínas. La actividad principal de UMP/CMP cinasa es en el metabolismo de pirimidinas donde se encarga de la formación de citidín trifosfato (CTP) y uridín trifosfato (UTP). Tomado de UniProt Consortium., 2021.

La enzima UMP/CMP cinasa tiene dos funciones en los metabolismos de *Arabidopsis thaliana*, la síntesis de pirimidinas, las cuales son importantes para la síntesis de proteínas y aumenta su expresión durante la germinación (Kafer et al., 2004). Así como en el metabolismo de xenobióticos, donde esta enzima ayuda en la activación de fluorouracil.

8.2.2 Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma UNIPROT

El análisis de secuencia de aminoácidos de UMP/CMP cinasa fue realizado a partir de la búsqueda en la plataforma UNIPROT, donde a partir del identificador de la plataforma KEGG/BLASTKOALA se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la enzima, conjunto al organismo respectivo y el gen codificante para la expresión de esta enzima como se muestra en la **Tabla 7**. Para la enzima UMP/CMP cinasa se encontró una secuencia canónica de 202 residuos aminoacídicos y con una masa de 22 485kDa.

Tabla 7. Las secuencias canónicas permiten la visualización clara de la estructura a pesar de la existencia de modificaciones post traduccionales.

Número de acceso	O04905
Proteína	UMP/CMP cinasa
Gen	UMK3
Organismo	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Secuencia FASTA	MGSVDAANGSGKKPTVIFVLGGPGSGKGTQCA YIVEHYGYTHLSAGDLL RAEIKSGSENGTMIQNMKEGKIVPSEVTIKLLQKAIQENGNDKFLIDGFP RNEENRAAFEKVTEIEPKFVLFFDCPEEEMEKRLGRNQGREDDNIETIRK RFKVFLESSLPVIHYEAKGKVRKINA AKPIEAVFEEVKAFSPEAEKVEA
Longitud	202
Masa (Da)	22 482

8.2.3 Análisis *in silico* de la estructura proteica terciaria de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma Swiss Model

El modelado de la enzima UMP/CMP cinasa obtenida de *Arabidopsis thaliana* expuesta a 100 mg/kg de cromo (VI) se conforma por 202 residuos aminoacídicos, es un monómero, que está conformado por 5 hojas betas plegadas en las posiciones: THR 15- GLY 21, THR 41 – SER 44, PHE 94 – ASP 97, GLU 116 – ASP 124, VAL 173 – ASN 177, y por 8 alfa hélices en las posiciones: LYS27 – TYR 38, ALA 45 – LYS 54, GLY 60 – GLU 69, SER 75 – GLU 88, GLU 103 – VAL 112, GLU 127 – ARG 137, ILE 146 – GLU 168, ILE 182 – PHE 193, tiene sitios de unión a adenosín difosfato en las posiciones GLY 14, PRO 15, GLY 16, SER 17, GLY 18, LYS 19, GLY 20, THR 21, ARG 127, ARG 131, ARG 176, ASP 177, VAL 178, además tiene sitios de unión para citidín monofosfato en las posiciones ALA 37, GLY 38, LEU 41, ARG 42, MET 58, ILE 59, GLY 62, ASP 63, ILE 64, VAL 65, GLY 90, PHE 91, ARG93, ASN 97, ARG 137, ASP 139, ARG 148 y requiere de magnesio (Mg²⁺) como cofactor, contiene cuatro residuos aminoacídicos de metionina, equivalentes al 1.9% de los residuos totales en las posiciones MET 1, MET 62, MET 66, MET 130, y tiene nueve residuos aminoacídicos de prolina equivalentes al 4.45%, estos se encuentran en las posiciones PRO 14, PRO 23, PRO 74, PRO 100, PRO 117, PRO 126, PRO 162, PRO 181, PRO 195. La estructura proteica de la enzima UMP/CMP cinasa se muestra en la **Figura 16**.

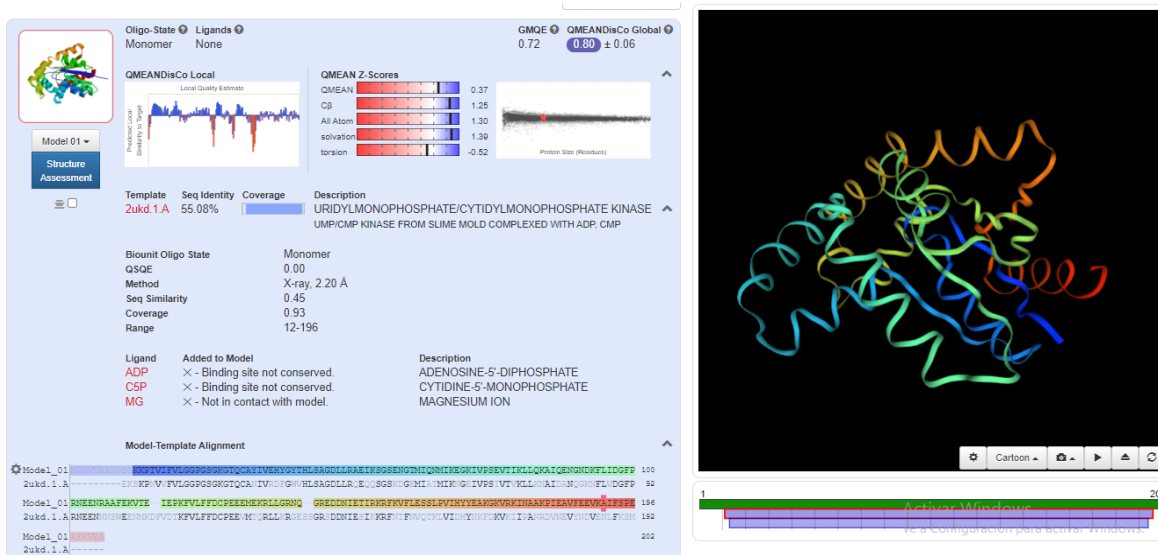


Figura 16. El modelado predictivo de UMP/CMP cinasa muestra posiciones de estructuras, sitio activo y ligandos. Se obtuvo el modelado de la estructura terciaria de la enzima UMP/CMP cinasa donde los programas de modelado y predictivos estiman la veracidad que tiene el modelo.

La **Figura 17** muestra la comparación de modelos biológicos y predictivos existentes en la base de datos de la plataforma, en la figura se muestra la posición del modelo estudiado, el cual es remarcado con una estrella en la gráfica de dispersión (**Figura 17**). La representación gráfica señala que es estadísticamente más probable que la secuencia de aminoácidos pertenezca a una enzima biológicamente activa.

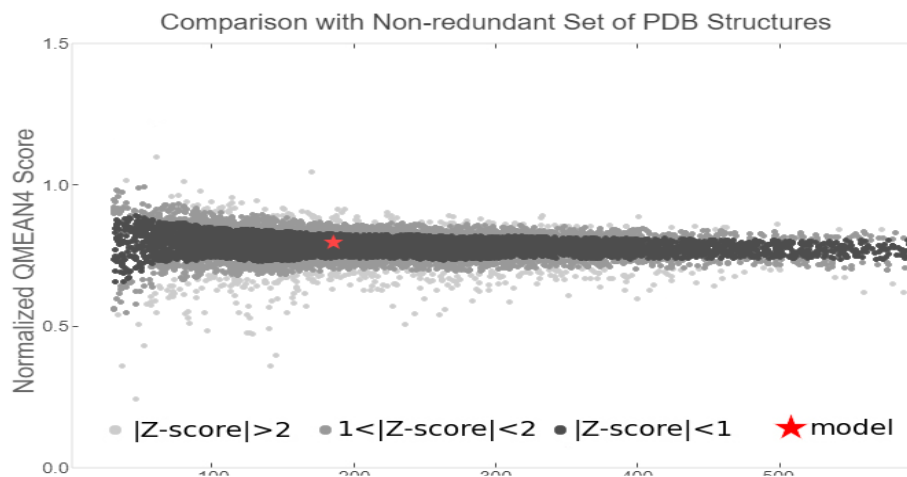


Figura 17. Los diagramas de dispersión demuestran la relación entre un conjunto de variables. En el diagrama encontramos el modelo de la enzima UMP/CMP cinasa, donde tenemos como variables el tamaño de la proteína y el valor de QMEAN4, dicho valor permite hacer una línea de tendencia con la cual comparar el modelo obtenido, la comparación con los modelos existentes en la plataforma crea intervalos de confianza donde tenemos el rango $Z\text{ score} < 1$, todos los modelos en este intervalo presentan la actividad de la enzima estudiada, ya que el modelo creado está en este intervalo se deduce que presenta actividad biológica.

En la **Figura 18** se muestra la comparación de la secuencia aminoacídica empleada contra los modelos presentes en bases de datos, los aminoácidos remarcados de color rojo son aquellos que no están en el límite de confianza, los aminoácidos de color rojo son aquellos que estadísticamente no corresponden al aminoácido ni la posición de los modelos de comparación con nuestra secuencia de aminoácidos, dichas posiciones son LYS 12, ASN 91, GLN 139, GLY 140 y ARG 141.

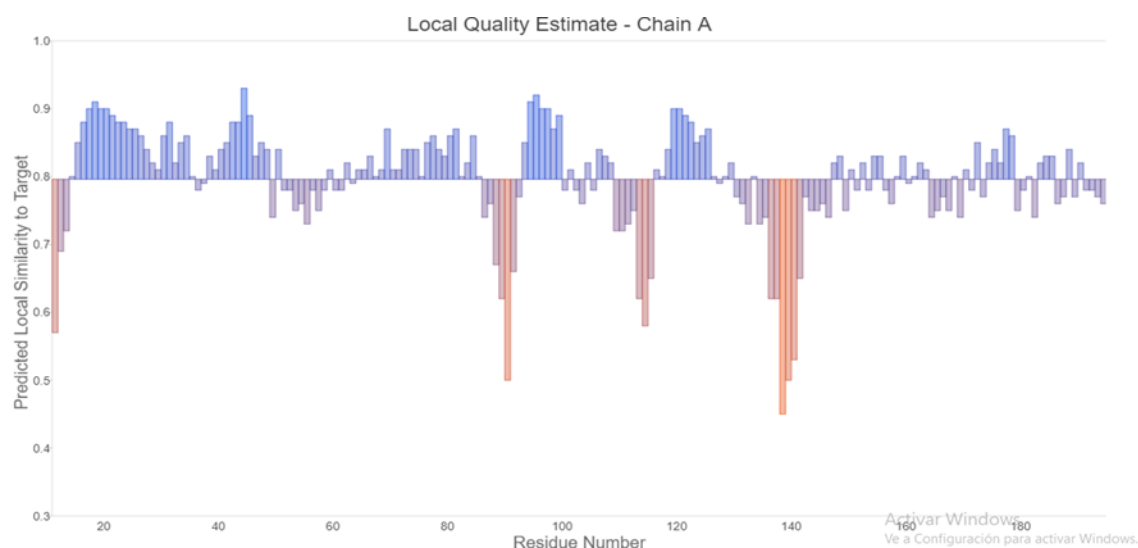


Figura 18. Las alteraciones en los aminoácidos en UMP/CMP cinasa están en las posiciones del sitio activo. En el diagrama observamos el análisis de la secuencia de aminoácidos UMP/CMP cinasa, donde tenemos como criterio la predicción de similitud, el cual la plataforma sitúa como control de calidad, este valor no es confiable si está por debajo de 0.6 los aminoácidos de color rojo son aquellos que estadísticamente no corresponden al aminoácido ni la posición. Tomado de Waterhouse et al., 2018.

UMP/CMP cinasa tiene dos sitios activos, para adenosín difosfato y citidín monofosfato, la localización de estos sitios activos en la enzima *A. thaliana* son, para adenosín difosfato en las posiciones GLY 14, PRO 15, GLY 16, SER 17, GLY 18, LYS 19, GLY 20, THR 21, ARG 127, ARG 131, ARG 176, ASP 177, VAL 178, y citidín monofosfato en las posiciones ALA 37, GLY 38, LEU 41, ARG 42, MET 58, ILE 59, GLY 62, ASP 63, ILE 64, VAL 65, GLY 90, PHE 91, ARG 93, ASN 97, ARG 137, ASP 139, ARG 148. Así como, en *O. sativa*, donde los sitios de unión con adenosín difosfato en las posiciones GLY 14, PRO 15, GLY 16, SER 17, LYS 19, GLY 20, THR 21, ARG 127, ARG 131, ARG 176, GLU 177, VAL 178, además tienen sitios de unión con citidín monofosfato ALA 37, GLY 38, LEU 41, ARG 42, MET 58, ILE 59, GLY 62, GLU 63, ILE 64, VAL 65, GLY 90, PHE 91, ARG 93, ASN

97, ARG 137, ASP 139, ARG 148. Por último, en *Z. mays* tiene sitios de unión con adenosín difosfato en las posiciones GLY 14, PRO 15, GLY 16, SER 17, LYS 19, GLY 20, THR 21, ARG 127, ARG 131, ARG 176, GLU 177, VAL 178, además tienen sitios de unión con citidín monofosfato ALA 37, GLY 38, LEU 41, ARG 42, MET 58, ILE 59, GLY 62, GLU 63, ILE 64, VAL 65, GLY 90, PHE 91, ARG 93, ASN 97, ARG 137, ASP 139, ARG 148.

Con la información obtenida del análisis de estructuras primaria se demuestra que los sitios activos de UMP/CMP cinasa son idénticos con un número de sitios activos iguales para adenosín difosfato siendo 13 residuos aminoacídicos y citidín monofosfato con 17 residuos aminoacídicos, sin embargo, el sitio activo de citidín monofosfato tiene aminoácidos que no están en el intervalo de confianza en las posiciones PHE 91, ASP 139.

8.2.4 Análisis del árbol filogenético de la enzima UMP/CMP cinasa en la plataforma NCBI

El análisis filogenético de la enzima fue realizado en la plataforma bio informática NCBI, a partir del identificador de la enzima UMP/CMP cinasa el organismo fue seleccionado, se obtuvo el árbol filogenético de la enzima, en la **Figura 19** se observa el árbol filogenético donde está presente la enzima UMP/ CMP cinasa a pesar de pertenecer al género *Arabidopsis* su expresión es singular en comparación a las otras secuencias, con base a la evidencia gráfica podemos afirmar que la enzima UMP/CMP cinasa es una secuencia ortóloga en comparación con las enzimas expresadas en *Arabidopsis suecica*, *Arabidopsis lyata* y *Capsella rubella*.

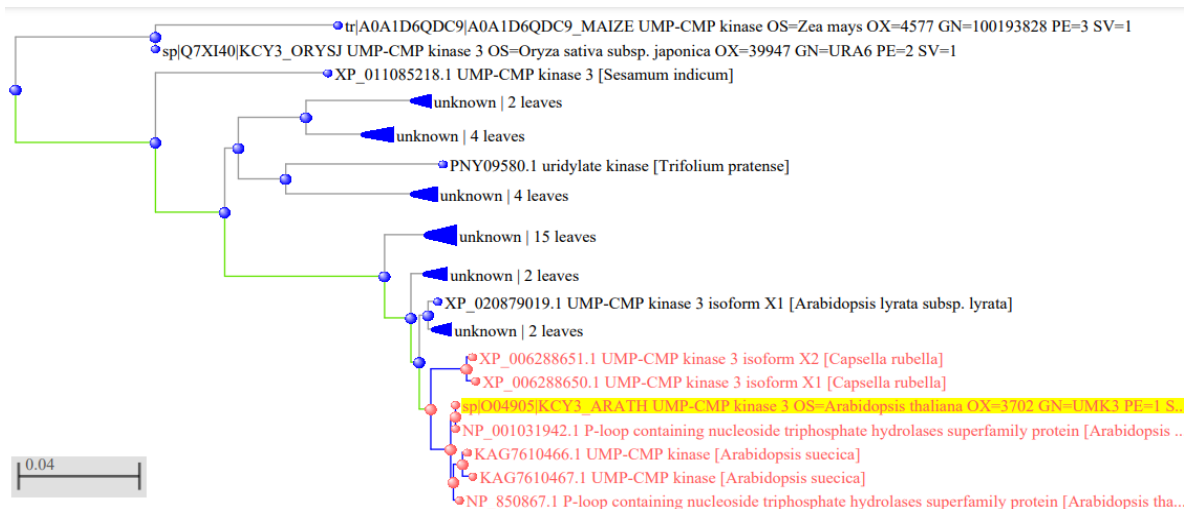


Figura 19. La enzima UMP/CMP cinasa guarda relación con otras presentes en el género *Arabidopsis*.

En el mapa filogenético podemos observar el gen que codifica para UMP/CMP cinasa en *Arabidopsis thaliana*, el cual se encuentra subrayado, este árbol filogenético se realizó con la comparación de 40 secuencias, se usó el método neighbor-joining, así como el método Kimura, la distancia escala es de 0.04 este árbol fue realizado en la plataforma NCBI.

Para realizar este árbol filogenético se comparó con secuencias, estas son encontradas en el **Anexo 2**. La distancia a escala presenta las diferencias entre secuencias la cual tiene valores de 0 a 1, siendo 0.04 el 4% de diferencia entre secuencias para este árbol filogenético. En este análisis se muestra la cercanía de secuencias pertenecientes del género *Arabidopsis* y la especie *Capsella rubella*, donde la secuencia de UMP/CMP cinasa de *A. thaliana* es una secuencia ortóloga respecto a *A. suecica* asegurando con un 100% y 99.5% de identidad respectivamente, mientras que para *Sesamum indicum* se muestra una identidad de 84.31%, este valor es equivalente a la distancia dentro del árbol filogenético y la diferencia en la rama en que se encuentran dichos organismos.

UMP/CMP cinasa cataliza la conversión de UMP a UDP, siendo el primer paso para el metabolismo de las pirimidinas (Zhou., 1998), donde tiene funciones en el desarrollo de los cloroplastos, respuesta a calor y heridas (Moisyadi et al., 1994). Las plantas tienen procesos de desarrollo que requieren altos niveles de nucleótidos de pirimidina, estos procesos son: la germinación de semilla, crecimiento del tubo polínico, desarrollo de flores y semillas (Kafer et al., 2004). Además, se realizó la comparación de la enzima UMP/CMP cinasa de los organismos *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*, la comparación de las enzimas

UMP/CMP cinasa de *Arabidopsis thaliana* con *Oryza sativa* se muestra en la **Tabla 8** y *Zea mays* **Tabla 9**, respectivamente.

Tabla 8. El porcentaje de identidad es un parámetro para conocer la homología entre secuencias.

Comparación de UMP/CMP cinasa: <i>A. thaliana</i> – <i>O. sativa</i>	
Porcentaje de identidad	83.68%
Valor E	1e-117

Tabla 9. El alineamiento de secuencias permite conocer la similitud entre ellas.

Comparación de UMP/CMP cinasa: <i>A. thaliana</i> – <i>Z. mays</i>	
Porcentaje de identidad	79.58%
Valor E	3e-115

La comparación de las enzimas UMP/CMP cinasa de los organismos demuestra la similitud entre secuencias, siendo en *O. sativa* 83.68% y en *Z. mays* de 79.58%, por lo que esta enzima es similar en los organismos, esta enzima es necesaria en las plantas para el desarrollo de proteínas y la síntesis de RNA.

El análisis *in silico* de UMP/CMP cinasa en *A. thaliana* demostró el aumento de expresión de esta enzima bajo condiciones de estrés por cromo (VI), posteriormente, se comparó con las enzimas presente en *O. sativa* y *Z. mays*. Se puede observar que tiene un porcentaje de similitud elevado, siendo un 70% el necesario para considerar a dos secuencias homologas. Con los valores de identidad obtenidos, los resultados indican que estas secuencias son homólogas, como se muestra en el árbol filogenético las secuencias de *O. sativa* y *Z. mays* no muestran una cercanía filogenética.

9 CONCLUSIÓN

Arabidopsis thaliana es un modelo vegetal ampliamente utilizado en el estudio de mecanismos de respuesta a la exposición al estrés biótico y abiótico, en este trabajo mediante la técnica de microarreglos se determinó la sobreexpresión de enzimas relacionadas con el proceso de detoxificación celular, enzimas como la glutatión S transferasa y UMP/CMP cinasa, juegan roles importantes en el desarrollo de la expresión del sistema del citocromo P450, su sobre expresión se debe a los posibles efectos de ambas en la reparación de los daños causados por el cromo hexavalente y las altas concentraciones de ROS, además, de la adaptación de *Arabidopsis thaliana* al estrés causado por este elemento tóxico. El análisis *in silico* de las estructuras proteicas a través de modelos predictivos creados en la plataforma Swiss model muestran la estructura de ambas enzimas y la predicción de la actividad biológica de las mismas, demostrando que los modelos predictivos generados pertenecen a una proteína con actividad biológica y que esta no varía respecto a la función conocida y descrita en la bibliografía, los resultados del análisis filogenético de la enzima glutatión S transferasa muestra que la presencia de cromo hexavalente no altera la expresión de genes en la secuencia analizada, respecto a los organismos empleados para la comparación a esta enzima se encontraron modelos del género *Brassica*, organismos ampliamente utilizados en el estudio de la fisiología vegetal, como se muestra en el árbol, estos organismos no guardan relación filogenética con *Arabidopsis thaliana*, así como con los organismos *Oryza sativa* (Arroz) y *Zea mays* (Maíz), debido a los valores en porcentaje de identidad obtenidos en los organismos no se observan presentes en el árbol filogenético. El análisis filogenético de la enzima UMP/CMP cinasa nos muestra la especiación del gen codificante para UMP/CMP cinasa, se deduce que esta especiación ocurre debido al efecto del cromo hexavalente, la comparación con otros organismos como *Sesamum indicum* (Ajonjolí), *Oryza sativa* y *Zea mays* no muestran ninguna cercanía filogenética. Las enzimas Glutatión S transferasa y UMP/CMP cinasa tienen una actividad biológica según lo reportado en la bibliografía, son importantes en la detoxificación celular y su actividad es corroborada en los análisis realizados en este trabajo, debido a esto se explicaría la importancia de estas enzimas en los mecanismos adaptación de *Arabidopsis thaliana* al estrés causado por cromo hexavalente.

10 REFERENCIAS

- Aldrich, M. V., Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., & Parsons, J. G. Barber. (2003). Uptake and Reduction of Cr (VI) to Cr (III) by Mesquite (*Prosopis* spp.): Chromate-Plant Interaction in Hydroponics and Solid Media Studied Using XAS. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 37:1859-1864.
- Andersson, I., Backlund, A., (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol. 46:275-291.
- Appenroth, K. – J. (2009). Definition of “Heavy Metals” and Their Role in Biological Systems. *Soil Heavy Metals.* 19-29. DOI: 10.1007/978-3-642-02436-8_2.
- Appenroth, K.-J., Stöckel, J., Srivastava, A., & Strasser, R. (2001). Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environmental Pollution*, Vol. 115: 49–64.
- Baker, A. J. M., (1981). Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* Vol. 3:643-654. DOI: 10.1080/01904168109362867.
- Barber, D. J. W., Thomas, J. K., (1978). Reactions of radicals with lecithin bilayers. *Radiat. Res.* Vol. 74:51–65.
- Becquer, T., Quantin, C., Sicot, M., & Boudot, J. B., (2003). Chromium availability in ultrafamic soils from New Caledonia. *Sci Total Environ.* Vol. 301:251–261.
- Candela, C. M., Cires E. (2012). ARABIDOPSIS THALIANA COMO ORGANISMO MODELO EN BIOLOGÍA. *Bol. Cien. Nat. R.I.D.E.A*, Vol. 52:175-178.
- Channey, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., & Baker, A. J., (1997). Phytoremediation of soil metals. *Enviromental biotechnology.* Vol. 8: 279 – 284.
- Chen, L., Yu, J. L., Waxman, J. D., (1997). Potentiation of cytochrome P450/cyclophosphamide-based cancer gene therapy by coexpression of the P450 reductase gene. *Cancer Res.* Vol. 57: 4830-7.

Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E. S., Manno, M., & Albores, A., (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 177:132–148.

Dietz, K. -J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 54:93–107.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., (2002). Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativatum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell Env.* Vol.25:687-693.

Dixon, D., Cole, D. J., Edwards, R., (1997). *Characterisation of Multiple Glutathione Transferases Containing the GST I Subunit with Activities toward Herbicide Substrates in Maize (Zea mays)*. *Pesticide Science*, 50(1), 72–82.

Dixon, D., Davis, G. B., Edwards, R., (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. *J. Biol. Chem.* Vol. 277: 30859–30869.

Dixon, D., Edwards, R., (2010) Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book*. Vol. 8.

Eleftheriou, E. P., Adamakis, I.-D. S., Melissa, P., (2011). Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma*. Vol. 249:401–416.

Ercal, N., Gurer - Orhan, H., Burns, A., (2001). *Toxic Metals and Oxidative Stress Part 1: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage*. Bentham Science Publishers. Vol. 6:529-539.

Graeber, K., Nakabashi, K., Miatton, E., Leubner – Metzger, G., Soppe, W. J. J., (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell and Environment*. DOI: 10.1111/J.1365-3040.2012.02542.X.

Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E., Zenk, M., (1989). Phytocelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Ssci USA*. Vol. 86:6838-6842.

Hall, G. B., (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Mmol. Biol. Evol.* DOI:10.1093/molbev/mst012

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R., (2005). Glutathione transferases. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* Vol. 45: 51–88.

Hein, P., Stöckel, J., Bennewitz, S., Oelmüller, R., (2009). A protein related to prokaryotic UMP kinases is involved in *psaA/B* transcript accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* Vol. 69:517–528.

Hernández, J. A., Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., (2017). Glutathione-Mediated Biotic Stress Tolerance in Plants. Department of Plant Breeding. Dinamarca. Chapter 14.

Heringa, J. (2008). Sequence Similarity. *Encyclopedia of Life Sciences.*

Hossain Z., Komatsu S., (2013). Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in plant science.* DOI: 10.3389/fpls.2012.00310.

Juarez, A. B., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Vesentini, N., Conforti, V., Gualtieri, P., (2008). In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *J Environ Monit.* Vol. 10:1313–1318.

Kafer, C., Zhou, L., Santoso, D., Guirgis, A., Weers, B., Park, S., (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience.* Vol. 9: 1611 – 1625.

Kanehisa M. (2017). Enzyme Annotation and Metabolic Reconstruction Using KEGG. *Protein Function Prediction.* 135-145. DOI: 10.1007/978-1-4939-7015-5_11.

Kanehisa, M. (2016). KEGG Bioinformatics Resource for Plant Genomics and Metabolomics. *Methods in Molecular Biology.* 55–70.

Kanehisa, M., Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28:27-30.

Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M., (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research.* Vol. 32:277-280.

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumishi, M., Tanabe, M., (2013). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research.* Vol. 42:199-205.

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K., (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428:726-731.

Kim, E., Ansell, C. M., Dudycha, J. L., (2013). Resveratrol and food effects on lifespan and reproduction in the model crustacean *Daphnia*. *J. Exp. Zool.* Vol. 321:48–56.

Kimbrough, D. E., Cohen, Y., Winer, A. M., Creelman, L., Mabuni, C., (1999). A critical assessment of chromium in the environment. *Crit Rev Environ. Sci. Technol.* Vol. 29:1–46.

Kimura, M., (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* Vol. 16: 111-120.

Laborde, E., (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death & Differentiation.* Vol. 17. 1373-1380.

Larcher W., (1995). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups.* 3rd Edition. Springer. 425.

Li, C., Deng, X., Xie, X., Liu, Y., Friedmann - Angeli, J. P., Lai, L., (2018). Activation of Glutathione Peroxidase 4 as a Novel Anti-inflammatory Strategy. *Frontiers in Pharmacology.* Vol. 9.

Listowsky, I., (2008). Proposed intracellular regulatory functions of glutathione transferases by recognition and binding to S-glutathiolated proteins. *J Pept. Res.* Vol. 65: 42–46.

Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A., Zheng, C.-C., (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated micro RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA.* Vol. 14:836-843. DOI: 10.1261/rna.895308.

Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V., Ton, J. (2011). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* Vol. 158: 844–853.

Madden, T., (2002). The BLAST Sequence Analysis Tool. *The NCBI Handbook.* National Center for Biotechnology Information.

McGrath S. P. (1995). Chromium and nickel. In: Alloway BJ Heavy metals in soils. 2 ed. Chapman and Hall. Great Britain. 152-164.

Moisyadi, S., Dharmasiri, S., Harrington, H. M., Lukas, T. J., (1994). Characterization of a low molecular mass autophosphorylating protein in cultured sugarcane cells and Pyrimidines, its identification as a nucleoside diphosphate kinase. *Plant Physiol.* Vol. 104: 1401-1409.

Molina, D., Bustillos – Cristales, M. R., Rodriguez – Andrade, O., Morales – Garcia, E. Y., Santiago – Saenz, Y., Castañeda – Lucio, M., Muñoz – Rojas, J., (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas.* Vol. 17: 24-34

Moons, A., (2005). Regulatory and Functional Interactions of Plant Growth Regulators and Plant Glutathione S-Transferases (GSTs). *Vitamins & Hormones.* Pág.155–202.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2016). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information

Neuefeind, T., Reinemer, P., Bieseler, B., (1997) Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification. *Biol Chem.* Vol. 378:199– 205.

Ngachan, S. V., Mohanty, A. K., and Pattanayak, A., (2008). Status Paper on Rice in North East India. Hyderabad: Rice Knowledge Management Portal (RKMP).

Nutricati, E., Miceli, A., Blando, F., De Bellis, L., (2006). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Reports,* Vol. 25: 997–1005.

Panda, S. K., Choudhury, S., (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology,* Vol. 17:95-102. DOI: 10.1590/S1677-04202005000100008.

Pearson, W. R., (2013). An Introduction to Sequence Similarity Searching. *Current Protocols in Bioinformatics.* Vol. 42: 3.1.1 – 3.1.8./

Pignatello, J. J., Liu, D., Huston, P., (1999). Evidence for an Additional Oxidant in the Photoassisted Fenton Reaction. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 33:1832-1839. DOI: 10.1021/es980969b.

Pinedo, H. M., Peters, G. F., (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 6:1653–1664.

Ramirez, V., Baez, A., Lopez, P., Bustillos, R., Villalobos, M. A., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz – Rojas, J., Fuentes, L. E., Martinez, J., Munive, J. A., (2020). Long-Chain Hydrocarbons (C21, C24 and C31) Released by *Bacillus* sp. MH778713 Break Dormancy of Mesquite Seeds Subjected to Chromium Stress. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00741

Rea, P. A., (1999) MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *J. Exp. Bot.* Vol. 50:895–913.

Rodriguez, E., Azevedo, R., Fernandes, P., Santos, C., (2011). Cr (VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chem Res Toxicol*. Vol. 24:1040–1047.

Salnikow, K., Zhitkovich, A., (2008). genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol*. Vol. 21: 28-44.

Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J., (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*. Vol. 37:501-506.

Schwartz, P. S., Waxman, D. J., (2001). Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol*. Vol. 60: 1268-79.

Shanker, A., Cervantes, C., Lozavera, H., Avudainayagam, S., (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*. Vol. 31:739-753.

Singh, H. P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D. R., Kohli, R. K., (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*. Vol. 11:229-254.

Srivastava, D., Verma, G., Chauhan, A. S., Pande, V., Chakrabarty, D., (2018). *Oryza sativa* tau class glutathione S-transferases (OsGSTU30) overexpression in *Arabidopsis thaliana*

modulates regulatory network leading to heavy metal and drought stress tolerance. *Metallomics*.

Swidiski, A., Sweetlove, J., Leaver, J., (2002). A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. Vol. 30:431-446.

Tchounwou, B. P., Yedjou, G. C., Patlolla, K. A., Sutton, J. D., (2014). Heavy Metals Toxicity and the Environment. NIH-RCMI Center for Environmental Health, College of Science, Engineering and Technology.

UniProt Consortium, (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 *Nucleic Acids Res.* 49.

Walls, Z. F., Gambhir, S. S., (2008). BRET-Based Method For Detection of Specific RNA Species. *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 19: 178–184.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* Vol. 46: 296-303.

Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. v., & Clemens, S., (2003). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *The Plant Journal*. Vol. 37:269-281. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2003.01960.x.

Wuana, A. R., Okieimen, E. F., (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risk and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network*. Volume 2011. DOI: 10.5402/2011/40267.

Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C., & Wang, L. (2015). *Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (Zea mays L.) and*

Rice (Oryza sativa L.). International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(12), 15100–15109.

Zhou L., Thornburg R., (1998). Site-specific mutations of conserved residues in the phosphate-binding loop of the Arabidopsis UMP/CMP kinase alter ATP and UMP binding. *Arch Biochem Biophys*. Vol. 358 :297–302.

Zhou, L., Lacroute, F., Thornburg, R., (1998). Cloning, Expression in *E. coli*, and characterization of *Arabidopsis thaliana* UMP/CMP kinase. *Plant Physiology*. Vol. 117: 245-254.

Zhu, X., Guo, S., Wang, Z., Du, Q., Xing, Y., Zhang, T., Shen, W., Sang, X., Ling, Y., He, G., (2016). Map-based cloning and functional analysis of YGL8, which controls leaf colour in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, Vol 16.

11 ANEXOS

Anexo 1. Secuencias empleadas para la elaboración del árbol filogenético de glutación S transferasa.

Sequences producing significant alignments		Download	New Select columns	Show	100	?			
<input type="checkbox"/> select all 36 sequences selected		GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment	New MSA View			
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase TAU.25 [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	449	449	100%	2e-159	100.00%	221	NP_173161.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	438	438	100%	6e-155	97.29%	221	CAA0213692.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Thioredoxin-like superfamily [Arabidopsis suecica]	Arabidopsis suecica	427	427	99%	8e-151	94.98%	219	KAG7597333.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Capsella rubella]	Capsella rubella	422	422	99%	2e-148	93.15%	219	XP_006305593.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Glutathione S-transferase C-terminal-like [Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa]	Arabidopsis thaliana x A...	421	421	99%	3e-148	93.61%	219	KAG7591973.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25 [Camelina sativa]	Camelina sativa	420	420	99%	9e-148	92.69%	219	XP_010476862.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Camelina sativa]	Camelina sativa	419	419	99%	2e-147	93.15%	219	XP_010459291.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Camelina sativa]	Camelina sativa	417	417	99%	1e-146	92.69%	219	XP_010498064.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Arabis nemorensis]	Arabis nemorensis	400	400	99%	5e-140	86.76%	219	VV91616.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IG104_038510 [Brassica rapa subsp. trilocularis]	Brassica rapa subsp. tril...	394	394	99%	1e-137	85.39%	219	KAG5387040.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Brassica rapa]	Brassica rapa	394	394	99%	1e-137	85.39%	219	XP_009117719.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_078875 [Brassica carinata]	Brassica carinata	393	393	99%	3e-137	85.39%	219	KAG2259581.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 isoform X1 [Brassica napus]	Brassica napus	391	391	99%	2e-136	84.93%	219	XP_013731202.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Brassica rapa]	Brassica rapa	390	390	99%	4e-136	84.47%	219	XP_009117717.2
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q70_00041588 [Brassica cretica]	Brassica cretica	389	389	99%	1e-135	84.47%	219	KAF2590497.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like isoform X1 [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. o...	387	387	99%	1e-134	83.56%	219	XP_013603065.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein DY000_02057507 [Brassica cretica]	Brassica cretica	387	387	99%	1e-134	84.02%	219	KAF...
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like isoform X1 [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	385	385	99%	5e-134	84.02%	219	XP_018449950.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Microthlaspi erraticum]	Microthlaspi erraticum	384	384	99%	1e-133	83.56%	219	CAA7020846.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Microthlaspi erraticum]	Microthlaspi erraticum	383	383	99%	3e-133	85.84%	211	CAA7056663.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	Arabidopsis lyrata subs...	381	381	87%	1e-132	95.34%	197	XP_002890208.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Brassica napus]	Brassica napus	381	381	99%	3e-132	82.19%	219	XP_013744562.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q69_00026942 [Brassica cretica]	Brassica cretica	380	380	99%	3e-132	82.19%	219	KAF3584185.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein N665_0929s0013 [Sinapis alba]	Sinapis alba	379	379	99%	1e-131	82.19%	219	KAF8080660.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Eutrema salsugineum]	Eutrema salsugineum	379	379	99%	2e-131	86.76%	219	XP_006416732.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. o...	377	377	99%	1e-130	81.28%	219	XP_013583715.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Brassica rapa]	Brassica rapa	376	376	99%	1e-130	81.28%	219	XP_009149163.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. o...	375	375	99%	6e-130	79.91%	219	XP_013603065.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica rapa]	Brassica rapa	375	375	99%	6e-130	80.37%	219	VDC65928.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein BRARA_F01206 [Brassica rapa]	Brassica rapa	375	375	99%	7e-130	80.82%	219	RID57860.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein BRARA_I04841 [Brassica rapa]	Brassica rapa	374	374	99%	1e-129	79.45%	219	RID48320.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 isoform X1 [Brassica rapa]	Brassica rapa	373	373	99%	3e-129	79.45%	219	XP_009117716.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	372	372	99%	8e-129	81.28%	219	XP_018479412.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_034042 [Brassica carinata]	Brassica carinata	379	521	99%	2e-128	81.11%	426	KAG2305391.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25 [Brassica napus]	Brassica napus	371	371	99%	2e-128	79.00%	219	XP_013731204.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q70_00041587 [Brassica cretica]	Brassica cretica	371	371	99%	3e-128	79.45%	219	KAF2589874.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IG104_038509 [Brassica rapa subsp. trilocularis]	Brassica rapa subsp. tril...	369	369	99%	9e-128	79.00%	219	KAG5387039.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25-like [Brassica napus]	Brassica napus	369	369	99%	1e-127	79.00%	219	XP_013707875.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein N665_0039s0028 [Sinapis alba]	Sinapis alba	367	367	99%	6e-127	79.00%	219	KAF8114263.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica napus]	Brassica napus	367	367	99%	8e-127	78.54%	219	CAF...

<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q70_00041587 [Brassica cretica]	Brassica cretica	371	371	99%	3e-128	79.45%	219	KAF2589874.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IGi04_038509 [Brassica rapa subsp. trilobularis]	Brassica rapa subsp. trilobularis	369	369	99%	9e-128	79.00%	219	KAG5387039.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25-like [Brassica napus]	Brassica napus	369	369	99%	1e-127	79.00%	219	XP_013707875.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein N665_0039e0028 [Sinapis alba]	Sinapis alba	367	367	99%	6e-127	79.00%	219	KAF8114263.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica napus]	Brassica napus	367	367	99%	8e-127	78.54%	219	CAF2114911.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	367	367	97%	1e-126	79.07%	232	XP_013602807.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q69_00063198 [Brassica cretica]	Brassica cretica	366	366	97%	2e-126	79.07%	219	KAF3572329.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein DY000_02057506 [Brassica cretica]	Brassica cretica	365	365	97%	3e-126	80.00%	222	KAF3497766.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	365	365	99%	5e-126	77.63%	219	XP_018447807.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_078902 [Brassica carinata]	Brassica carinata	367	367	97%	6e-126	79.07%	264	KAG2259608.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	364	364	99%	9e-126	78.08%	219	XP_018449403.1
<input type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U25-like [Brassica napus]	Brassica napus	364	364	99%	1e-125	76.71%	219	XP_013661866.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19-like [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	364	364	99%	1e-125	76.26%	219	XP_013618106.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_053277 [Brassica carinata]	Brassica carinata	362	362	99%	4e-125	75.80%	219	KAG2282057.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IGi04_022409 [Brassica rapa subsp. trilobularis]	Brassica rapa subsp. trilobularis	371	665	99%	5e-125	81.02%	452	KAG5392446.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase TAU 24 [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	362	362	99%	6e-125	79.00%	218	NP_173160.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U24 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata	362	362	99%	8e-125	79.91%	218	XP_020870696.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	362	362	99%	1e-124	77.17%	219	XP_018458808.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Glutathione S-transferase C-terminal domain superfamily [Arabidopsis suecica]	Arabidopsis suecica	361	361	99%	1e-124	79.91%	218	KAG7597332.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19 [Brassica napus]	Brassica napus	361	361	99%	2e-124	75.80%	219	XP_013714595.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19 [Eutrema salsugineum]	Eutrema salsugineum	360	360	99%	3e-124	78.71%	219	XP_006389991.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein DY000_02057505 [Brassica cretica]	Brassica cretica	360	360	97%	3e-124	78.60%	218	KAF3572329.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IGi04_066804 [Brassica rapa subsp. trilobularis]	Brassica rapa subsp. trilobularis	360	360	99%	5e-124	76.71%	219	KAG5387039.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19-like [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	360	360	99%	6e-124	76.26%	219	XP_018461489.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Glutathione S-transferase C-terminal domain superfamily [Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa]	Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa	359	359	99%	1e-123	79.00%	218	KAG7591972.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Thioredoxin-like superfamily [Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa]	Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa	357	357	99%	4e-123	78.54%	218	KAG7646612.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	357	357	99%	5e-123	77.17%	218	CAA0213643.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AALP_AA1G190000 [Arabis alpina]	Arabis alpina	357	357	99%	6e-123	80.00%	219	KFK43910.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19 [Brassica rapa]	Brassica rapa	357	357	99%	6e-123	75.80%	219	XP_009104572.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19-like [Tarenaya hassleriana]	Tarenaya hassleriana	357	357	99%	1e-122	75.80%	219	XP_010532670.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica napus]	Brassica napus	357	357	99%	1e-122	75.34%	219	CAF2178870.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein N665_0188e0095 [Sinapis alba]	Sinapis alba	356	356	99%	2e-122	75.34%	219	KAF8103142.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_078873 [Brassica carinata]	Brassica carinata	356	356	99%	2e-122	76.71%	218	KAG2259579.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19 [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	355	355	99%	3e-122	74.89%	219	XP_013592836.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_007169 [Brassica carinata]	Brassica carinata	355	355	99%	6e-122	75.34%	219	KAG2324441.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Arabis nemorensis]	Arabis nemorensis	355	355	99%	6e-122	75.80%	219	VVA95732.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata	354	354	97%	8e-122	76.85%	219	XP_020890024.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Microthlaspi erraticum]	Microthlaspi erraticum	354	354	96%	1e-121	76.06%	219	CAA7036990.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19 [Cannabis sativa]	Cannabis sativa	354	354	99%	1e-121	73.97%	219	XP_030489089.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Arabis nemorensis]	Arabis nemorensis	354	354	99%	1e-121	78.64%	223	VVA92140.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19-like [Brassica napus]	Brassica napus	353	353	99%	3e-121	74.89%	219	XP_013648649.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein AALP_AA2G227300 [Arabis alpina]	Arabis alpina	352	352	99%	9e-121	73.97%	219	KFK42224.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Glutathione S-transferase N-terminal [Arabidopsis suecica]	Arabidopsis suecica	352	352	97%	9e-121	76.39%	219	KAG7590569.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19 [Raphanus sativus]	Raphanus sativus	352	352	99%	1e-120	74.89%	219	XP_018446785.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	351	351	88%	1e-120	84.62%	203	XP_013603015.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U24 [Brassica rapa]	Brassica rapa	350	350	99%	2e-120	76.71%	215	XP_009149162.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	351	351	88%	1e-120	84.62%	203	XP_013603015.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U24 [Brassica rapa]	Brassica rapa	350	350	99%	2e-120	76.71%	215	XP_009149162.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U25-like isoform X2 [Brassica oleracea var. oleracea]	Brassica oleracea var. oleracea	351	351	88%	1e-120	84.62%	203	XP_013603015.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U24 [Brassica rapa]	Brassica rapa	350	350	99%	2e-120	76.71%	215	XP_009149162.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Glutathione S-transferase N-terminal [Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa]	Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa	350	350	97%	3e-120	75.93%	219	KAG7587487.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica rapa]	Brassica rapa	350	350	99%	3e-120	73.78%	225	CAG7903301.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase TAU 19 [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	349	349	97%	7e-120	75.93%	219	NP_565178.1
<input type="checkbox"/>	unnamed protein product [Brassica oleracea]	Brassica oleracea	349	349	99%	1e-119	72.89%	225	VDD62760.1
<input checked="" type="checkbox"/>	probable glutathione S-transferase isoform X2 [Cannabis sativa]	Cannabis sativa	349	349	99%	1e-119	72.60%	219	XP_030489092.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_063129 [Brassica carinata]	Brassica carinata	347	347	99%	5e-119	75.80%	215	KAG2268574.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione transferase putative [Arabidopsis thaliana]	Arabidopsis thaliana	347	347	97%	9e-119	75.46%	219	AAM64593.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19-like [Camelina sativa]	Camelina sativa	346	346	97%	1e-118	74.07%	219	XP_010472053.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U19-like [Quercus lobata]	Quercus lobata	346	346	97%	2e-118	71.76%	219	XP_030961721.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: glutathione S-transferase U19-like [Camelina sativa]	Camelina sativa	345	345	97%	3e-118	74.07%	219	XP_010428964.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein CQW23_17714 [Capsicum baccatum]	Capsicum baccatum	345	345	98%	4e-118	73.73%	220	PHT43689.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein CARUB_v10010098mg [Capsella rubella]	Capsella rubella	346	346	99%	4e-118	73.52%	251	EOA36191.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein IGi04_038508 [Brassica rapa subsp. trilobularis]	Brassica rapa subsp. trilobularis	345	345	99%	4e-118	76.71%	219	KAG5387038.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein Bca52824_078876 [Brassica carinata]	Brassica carinata	345	345	99%	5e-118	79.00%	219	KAG2259582.1
<input type="checkbox"/>	putative glutathione S-transferase [Capsicum annuum]	Capsicum annuum	345	345	98%	5e-118	73.27%	220	PHT76957.1
<input checked="" type="checkbox"/>	glutathione S-transferase U24 [Brassica napus]	Brassica napus	345	345	99%	5e-118	73.52%	218	XP_013708306.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein F2Q69_00026941 [Brassica cretica]	Brassica cretica	344	344	99%	6e-118	75.34%	217	KAF3584188.1

Anexo 2. Secuencias empleadas para la elaboración del árbol filogenético de UMP/CMP cinasa.

select all 40 sequences selected

Graphics Distance tree of results Multiple alignment **New** MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> NP_001031942.1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein [Arabidopsis thaliana]		410	410	100%	1e-151	100.00%	202	Query_65045
<input checked="" type="checkbox"/> KAG7610466.1 UMP-CMP kinase [Arabidopsis suecica]		409	409	100%	4e-151	99.50%	202	Query_65046
<input checked="" type="checkbox"/> NP_850867.1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein [Arabidopsis thaliana]		407	407	99%	3e-150	99.50%	208	Query_65047
<input checked="" type="checkbox"/> KAG7610467.1 UMP-CMP kinase [Arabidopsis suecica]		405	405	99%	7e-150	99.00%	208	Query_65048
<input checked="" type="checkbox"/> KAG7556582.1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase [Arabidopsis suecica]		397	397	100%	1e-146	97.06%	204	Query_65049
<input checked="" type="checkbox"/> XP_020879020.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]		395	395	100%	6e-146	97.52%	200	Query_65050
<input type="checkbox"/> KAG7556583.1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase [Arabidopsis suecica]		394	394	99%	2e-145	96.55%	210	Query_65051
<input checked="" type="checkbox"/> XP_006288651.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Capsella rubella]		393	393	100%	6e-145	96.59%	205	Query_65052
<input checked="" type="checkbox"/> XP_020879019.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]		392	392	99%	1e-144	97.01%	206	Query_65053
<input checked="" type="checkbox"/> KAG7551992.1 UMP-CMP kinase [Arabidopsis thaliana x Arabidopsis arenosa]		390	390	100%	8e-144	96.04%	200	Query_65054
<input checked="" type="checkbox"/> EFH48474.1 uridylate kinase [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]		390	390	100%	1e-143	96.08%	202	Query_65055
<input checked="" type="checkbox"/> XP_006288650.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Capsella rubella]		390	390	99%	2e-143	96.08%	211	Query_65056
<input checked="" type="checkbox"/> XP_006394882.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Eutrema salsugineum]		384	384	100%	3e-141	91.87%	209	Query_65057
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013643807.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Brassica napus]		384	384	100%	4e-141	92.34%	209	Query_65058
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009151138.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Brassica rapa]		383	383	100%	5e-141	92.34%	209	Query_65059
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013678023.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X1 [Brassica napus]		381	381	100%	3e-140	91.39%	209	Query_65060
<input checked="" type="checkbox"/> XP_006394880.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Eutrema salsugineum]		380	380	100%	7e-140	90.91%	215	Query_65061
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013643806.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X1 [Brassica napus]		380	380	99%	1e-139	91.83%	215	Query_65062
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009129925.1 UMP-CMP kinase 3 [Brassica rapa]		380	380	100%	1e-139	91.39%	209	Query_65063
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013643806.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X1 [Brassica napus]		380	380	99%	1e-139	91.83%	215	Query_65062
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009129925.1 UMP-CMP kinase 3 [Brassica rapa]		380	380	100%	1e-139	91.39%	209	Query_65063
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009129925.1 UMP-CMP kinase 3 [Brassica rapa]		380	380	100%	1e-139	91.39%	209	Query_65063
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009151137.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Brassica rapa]		380	380	99%	1e-139	91.83%	215	Query_65064
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013660848.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Brassica napus]		375	375	100%	8e-138	89.95%	209	Query_65065
<input type="checkbox"/> CDY65143.1 BnaC02g48410D [Brassica napus]		375	375	99%	8e-138	91.35%	215	Query_65066
<input checked="" type="checkbox"/> XP_022552959.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Brassica napus]		375	375	100%	1e-137	90.91%	208	Query_65067
<input checked="" type="checkbox"/> XP_022561544.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Brassica napus]		374	374	100%	3e-137	90.91%	208	Query_65068
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013737452.1 UMP-CMP kinase 3 [Brassica napus]		374	374	100%	4e-137	89.95%	209	Query_65069
<input checked="" type="checkbox"/> XP_013660846.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Brassica napus]		372	372	99%	2e-136	89.42%	216	Query_65070
<input checked="" type="checkbox"/> XP_009111704.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Brassica rapa]		372	372	100%	2e-136	89.47%	209	Query_65071
<input checked="" type="checkbox"/> XP_033136522.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Brassica rapa]		369	369	99%	3e-135	88.94%	211	Query_65072
<input checked="" type="checkbox"/> XP_011085218.1 UMP-CMP kinase 3 [Sesamum indicum]		353	353	99%	3e-129	84.31%	210	Query_65073
<input checked="" type="checkbox"/> PNY09580.1 uridylate kinase [Trifolium pratense]		352	352	99%	7e-129	83.50%	207	Query_65074
<input checked="" type="checkbox"/> XP_034895204.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Populus alba]		350	350	96%	4e-128	86.15%	199	Query_65075
<input checked="" type="checkbox"/> XP_034895203.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Populus alba]		349	349	96%	1e-127	86.15%	205	Query_65076
<input checked="" type="checkbox"/> RZC02585.1 UMP-CMP kinase 3 isoform E [Glycine soja]		350	350	99%	1e-127	83.50%	223	Query_65077
<input checked="" type="checkbox"/> NP_001237387.2 UMP/CMP kinase family protein [Glycine max]		349	349	99%	1e-127	82.61%	207	Query_65078
<input checked="" type="checkbox"/> XP_038709203.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Tripterygium wilfordii]		348	348	96%	4e-127	85.15%	208	Query_65079
<input checked="" type="checkbox"/> NP_001236958.2 UMP-CMP kinase family protein [Glycine max]		348	348	99%	5e-127	83.09%	207	Query_65080
<input checked="" type="checkbox"/> XP_014632802.1 UMP/CMP kinase family protein isoform X1 [Glycine max]		349	349	99%	6e-127	83.50%	236	Query_65081
<input checked="" type="checkbox"/> XP_006375091.2 UMP-CMP kinase 3 [Populus trichocarpa]		347	347	96%	7e-127	85.13%	199	Query_65082
<input checked="" type="checkbox"/> XP_038709202.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X1 [Tripterygium wilfordii]		347	347	100%	1e-126	83.73%	214	Query_65083
<input checked="" type="checkbox"/> XP_034905856.1 UMP-CMP kinase 3-like [Populus alba]		346	593	99%	3e-124	84.00%	349	Query_65084

<input type="checkbox"/>	CDY65143.1 BnaC02g48410D [Brassica napus]	375	375	99%	8e-138	91.35%	215	Query_65066
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_022552959.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Brassica napus]	375	375	100%	1e-137	90.91%	208	Query_65067
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_022551544.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Brassica napus]	374	374	100%	3e-137	90.91%	208	Query_65068
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_013737452.1 UMP-CMP kinase 3 [Brassica napus]	374	374	100%	4e-137	89.95%	209	Query_65069
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_013660846.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Brassica napus]	372	372	99%	2e-136	89.42%	216	Query_65070
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_009111704.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Brassica rapa]	372	372	100%	2e-136	89.47%	209	Query_65071
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_033136522.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Brassica rapa]	369	369	99%	3e-135	88.94%	211	Query_65072
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_011085218.1 UMP-CMP kinase 3 [Sesamum indicum]	353	353	99%	3e-129	84.31%	210	Query_65073
<input checked="" type="checkbox"/>	PNY09580.1 uridylylate kinase [Trifolium pratense]	352	352	99%	7e-129	83.50%	207	Query_65074
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_034895204.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X2 [Populus alba]	350	350	96%	4e-128	86.15%	199	Query_65075
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_034895203.1 UMP-CMP kinase 3 isoform X1 [Populus alba]	349	349	96%	1e-127	86.15%	205	Query_65076
<input checked="" type="checkbox"/>	RZC02585.1 UMP-CMP kinase 3 isoform E [Glycine soja]	350	350	99%	1e-127	83.50%	223	Query_65077
<input checked="" type="checkbox"/>	NP_001237387.2 UMP/CMP kinase family protein [Glycine max]	349	349	99%	1e-127	82.61%	207	Query_65078
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_038709203.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X2 [Tripterygium wilfordii]	348	348	96%	4e-127	85.15%	208	Query_65079
<input checked="" type="checkbox"/>	NP_001236958.2 UMP-CMP kinase family protein [Glycine max]	348	348	99%	5e-127	83.09%	207	Query_65080
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_014632802.1 UMP/CMP kinase family protein isoform X1 [Glycine max]	349	349	99%	6e-127	83.50%	236	Query_65081
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_006375091.2 UMP-CMP kinase 3 [Populus trichocarpa]	347	347	96%	7e-127	85.13%	199	Query_65082
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_038709202.1 UMP-CMP kinase 3-like isoform X1 [Tripterygium wilfordii]	347	347	100%	1e-126	83.73%	214	Query_65083
<input checked="" type="checkbox"/>	XP_034905856.1 UMP-CMP kinase 3-like [Populus alba]	346	593	99%	3e-124	84.00%	349	Query_65084
<input checked="" type="checkbox"/>	tr A0A1D6QDC9 A0A1D6QDC9_MAIZE UMP-CMP kinase OS=Zea mays OX=4577 GN=100193828 PE=3 SV=1	314	314	94%	7e-114	79.58%	194	Query_65085
<input checked="" type="checkbox"/>	spl Q7XJ40 KCY3_ORYSJ UMP-CMP kinase 3 OS=Oryza sativa subsp. japonica OX=39947 GN=URA6 PE=2 SV=1	76.3	76.3	19%	8e-22	87.18%	60	Query_65044