



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA
MONODEHIDROASCORBATO REDUCTASA DE MANGO
(*Mangifera indica* L.)**

Por:

Nacxit Delgado Torres

TESIS APROBADA POR LA

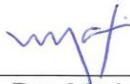
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

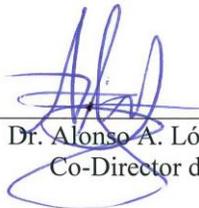
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Nacxit Delgado Torres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. María A. Islas Osuna
Directora de Tesis



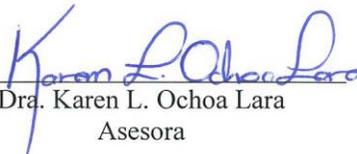
Dr. Alonso A. López Zavala
Co-Director de Tesis



Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Asesora



Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Asesor



Dra. Karen L. Ochoa Lara
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada durante el posgrado y por el proyecto CB2012-01-178296 “Estudios moleculares de la maduración del mango Ataulfo (*M. indica* L.): uso de la transcriptómica para identificar genes responsables de la pérdida de la firmeza” (otorgado a la Dra. Maria Islas) que financió mi trabajo de investigación para obtener mi grado de Maestro en Ciencias.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por abrirme sus puertas para realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco a la Dra. Islas por permitirme trabajar bajo su tutela y haberme abierto las puertas para realizar un posgrado.

Agradezco al Dr. López por apoyarme en el transcurso del posgrado por su tiempo y conocimiento.

Agradezco a la Dra. Contreras por siempre estar para todos los alumnos, por formar parte de mi comité y ayudarme en mi progreso.

Agradezco al Dr. Sotelo por abrirme las puertas a su laboratorio por permitirme trabajar con grandes mentes que me ayudaban a cuestionar y aprender.

Agradezco a la Dra. Ochoa por siempre mostrar disponibilidad para estar presente en todos los acontecimientos de mi posgrado, por sus sugerencias y apoyo para sacar adelante este proyecto.

Agradezco a la Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Vegetal por abrirme sus puertas para formar parte de una coordinación con grandes investigadores y profesores.

Agradezco al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, a mis compañeros: Ana Paulina Sortillón, Andrés López y Martin Andrade por haber transcurrido todo este tiempo conmigo.

Agradezco al Laboratorio de Estructura Biomolecular y a todos sus integrantes: a Karina García, Ignacio Valenzuela, Leonardo Fox, a Carolina Gómez, a Danya Castro y Cristian Rodríguez por permitirme formar parte de su ambiente de trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Investigación en Alimentos (UNISON) por abrirme sus puertas para realizar mis experimentos, a sus integrantes: al Mtro. César, a Luis Vásquez, al Dr. Aldo Arvizu, a Machuy y a Elena Moreno.

Agradezco al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales por permitirme hacer uso de sus equipos.

Agradezco al M. en. C. Javier Ojeda por su amistad, sus ánimos y apoyo.

Agradezco al Dr. Corona por su apoyo en el proceso experimental de la cinética enzimática.

Agradezco a todos mis profesores por haberme transmitido su conocimiento y haberme ayudado a llegar hasta este momento.

Agradezco a mi familia: Francisco Delgado, Alma Rosa Torres, Ixchel Delgado, Tohil Delgado y mi sobrina Ivanna Xcaret.

Agradezco a la familia de mi novia por siempre mostrar interés y siempre apoyarme a seguir adelante.

Agradezco a mis amigos Flor Soto, Arturo Zamora, Aaron Calles, David Argüelles, Ramón Acedo por siempre apoyarme en todo momento que lo necesité

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Francisco de Jesús Delgado Burgueño y Alma Rosa Guadalupe Torres Moreno, que en un principio sin su esfuerzo en darme educación, amor y todo su apoyo no hubiera podido pararme hoy aquí y salir adelante.

También, quiero dedicar este trabajo a mi Tía Ivonne Kaanta, deseo que en paz descanse, ya que siempre desde mi infancia estuvo ahí apoyándome, un abrazo hasta donde estés.

Y, por último, pero no menos importante quiero dedicar este trabajo a una persona muy querida y amada de mi parte Estrella Acevedo, que con su constante apoyo, amor y esfuerzo me ayudó a levantarme varias veces de la frustración de querer dejar todo de lado. Gracias por estar ahí, gracias por compartir tus días conmigo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE ECUACIONES	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1.El Ácido Ascórbico y su Función en las Plantas.....	18
2.1.1. Ácido Ascórbico como Antioxidante y su Relación con el Crecimiento de las Plantas.....	19
2.2. Participación de la Enzima Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR) en la Ruta de Reciclaje del Ácido Ascórbico.....	21
2.2.1. Reciclaje de Monodehidroascorbato, Importancia Fisiológica para las Plantas ante Situaciones de Estrés.....	22
2.3. Características Generales de la MDHAR.....	24
2.3.1. Mecanismo de Acción y Actividad Enzimática de la MDHAR.....	28
2.4. El Mango como Modelo de Estudio.....	30
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Análisis de Secuencias Nucleotídica y Deducida de Aminoácidos y Estructura de MiMDHAR.....	34
5.1.1. Secuencia Codificante de MiMDHAR.....	34
5.1.2. Modelación de la Estructura Tridimensional de la MiMDHAR....	34
5.2. Expresión Heteróloga de MiMDHAR Recombinante.....	35
5.2.1. Obtención del Constructo del Gen Sintético de MiMDHAR.....	35
5.2.2. Sobreexpresión de MiMDHAR Recombinante.....	37
5.3. Purificación de MiMDHAR por Cromatografía de Ni-NTA.....	38
5.3.1. Preparación del Extracto Celular.....	38

5.3.2. Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados.....	39
5.3.3. Determinación del Estado Oligomérico de MiMDHAR.....	40
5.4. Determinación de la Actividad Enzimática de MiMDHAR.....	41
5.5. Determinación de las Constantes Cinéticas de MiMDHAR.....	42
5.6. Determinación del Efecto de la Temperatura y el pH sobre la Actividad Enzimática de MiMDHAR.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
6.1. Análisis de Secuencia Aminoacídica de MiMDHAR.....	44
6.2. Análisis Estructural de MiMDHAR.....	47
6.3. Sobreexpresión Heteróloga de MiMDHAR.....	55
6.4. Purificación de MiMDHAR.....	56
6.5. Determinación del Estado Oligomérico de MiMDHAR.....	58
6.6. Determinación de la Actividad Enzimática de MiMDHAR.....	59
6.7. Determinación de las Constantes Cinéticas de MiMDHAR.....	61
6.8. Determinación del Efecto de la Temperatura y pH sobre la Actividad Enzimática de MiMDHAR.....	64
7. CONCLUSIONES.....	68
8. RECOMENDACIONES.....	69
9. ANEXO.....	70
10. REFERENCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas de biosíntesis y reciclaje del ácido ascórbico en plantas.....	19
2	Ciclo Ascorbato-Glutatión.....	22
3	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de múltiples MDHARs..	25
4	Estructura Cristalográfica de la enzima MDHAR de Arroz <i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i> (OsMDHAR).....	27
5	Mecanismo de Transferencia de Electrones Propuesto para MDHAR en Arroz.....	28
6	Mapa del vector de expresión pET-11a y mapa región de expresión-clonación.....	36
7	Ensayo acoplado de MDHAR.....	41
8	Gen sintético de MiMDHAR.....	45
9	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de múltiples MDHARs..	46
10	Modelo estructural de MDHAR de mango realizado por homología a la estructura cristalizada de la MDHAR de arroz (OsMDHAR) (PDB: 5JCI).....	48
11	Visualización del dominio de unión al FAD.....	49
12	Diagrama de interacciones del dominio FAD y su cofactor.....	50
13	Visualización del dominio de unión al NAD del modelo obtenido con templado 5JCI.....	51
14	Visualización del dominio de unión al NAD del modelo obtenido con templado 5JCK.....	52
15	Diagrama de interacciones del dominio NAD y su cofactor.....	53
16	Visualización del residuo catalítico.....	54
17	Perfil electroforético de la sobreexpresión de MiMDHAR.....	56
18	Perfil electroforético de la purificación de MiMDHAR por medio de IMAC.....	57
19	Perfil electroforético de las fracciones puras de MiMDHAR por medio de IMAC.....	57

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

20	Cromatografía de exclusión molecular de MiMDHAR.....	58
21	Barrido de luz UV-Vis.....	60
22	Ajuste de cinética de Michaelis-Menten y gráfico de Lineweaver-Burk del ácido ascórbico.....	62
23	Ajuste de cinética de Michaelis-Menten y gráfico de Lineweaver-Burk del NADH.....	63
24	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de MiMDHAR.....	64
25	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de MiMDHAR.....	66
26	Efecto de la temperatura del tratamiento hidrotérmico sobre la actividad de la MiMDHAR.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Comparación de actividad específica en U/mg de proteína de diferentes plantas modelos de estudios.....	59

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Coeficiente de partición.....	40
2	Actividad total.....	42
3	Actividad específica.....	42

RESUMEN

Las plantas se encuentran expuestas al medio ambiente de manera constante bajo condiciones que pueden ser desfavorables, llevándolas a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) causándoles estrés oxidativo. Para protegerse de los daños causados por las ERO, cuentan con sistemas enzimáticos y no enzimáticos; en las plantas la principal molécula antioxidante es el ácido-L-ascórbico (AA). Cuando el AA actúa sobre las ERO, su concentración celular disminuye, por lo que existen dos rutas de generación de AA para restablecer su homeostasis, la síntesis *de novo* y la de reciclaje, esta última teniendo una función importante en la adaptación y respuesta al estrés. En esta vía actúan dos enzimas que reciclan los productos oxidados del AA, la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR). Para conocer mejor a la MDHAR, el objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímicamente a la MDHAR de mango (MiMDHAR). Para esto, la proteína se expresó de manera heteróloga en *Escherichia coli* y se purificó por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados. Con la proteína pura se determinó la actividad enzimática y su estabilidad a diferentes temperaturas y pH. Como resultados, se logró expresar y purificar de forma soluble la MiMDHAR y se determinó su estado oligomérico obteniéndose en forma de monómero, así como la presencia de su cofactor flavin adenosin dinucleótido (FAD) unido de forma natural a la proteína recombinante. La proteína pura mostró una actividad enzimática de 537.78 ± 161.26 U/mg proteína, y constantes cinéticas V_{max} , K_m , k_{cat} , para el monodehidroascorbato de 44.4 $\mu\text{M}/\text{min}$, 148 μM y 540 min^{-1} , respectivamente. Los resultados muestran que la MiMDHAR es estable en un rango de temperatura de 10 a 55°C y pH de 5.0 a 11.0, siendo una de las más activas entre las MDHAR reportadas a la fecha.

Palabras clave: MDHAR, Expresión heteróloga, Mangifera indica, Estabilidad, pH, temperatura, Actividad enzimática, Constantes cinéticas.

ABSTRACT

The plants are subject to the natural environment, and these conditions can be unfavorable leading to the production of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress. To protect themselves from the damages caused by ROS, plants have enzymatic and non-enzymatic systems where antioxidant molecules such as L-ascorbic acid (AsA) participates as the principal. When the AsA acts on the ROS, its cellular concentration decreases, so there are two routes of generation of AsA to restore its homeostasis, the *de novo* synthesis and the recycling, the latter having an important role in the adaptation and response to stress. Two enzymes participate in this route, Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR); they act to recycle the products of AsA oxidation. To know better the MDHAR, the objective of this work is to biochemically characterize mango MDHAR (MiMDHAR). For this, the protein was expressed heterologously in *Escherichia coli* and purified by immobilized metal affinity chromatography. With the pure protein we determined the enzymatic activity and its stability to different temperatures and pH. As results, it was possible to express and purify MiMDHAR in a soluble form; studies were carried out to determine the oligomeric state obtained in the form of a monomer and with the cofactor flavin adenosine dinucleotide (FAD) bound naturally to the recombinant protein. The pure protein shows an enzymatic activity of 537.78 ± 161.26 U / mg protein, and kinetic constants V_{max} , K_m , k_{cat} were determined, being 44.4 μ M / min, 148 μ M and 540 min⁻¹ respectively for the monodehydroascorbate. It was observed that the MiMDHAR is stable in a temperature range of 10 to 55 ° C and pH of 5.0 to 11.0. The MiMDHAR is one of the most active among the MDHARs reported to date

Keywords: MDHAR, Heterologous expression, *Mangifera indica*, Stability, pH, temperature, Enzymatic activity, Kinetic constants.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de mango (*Mangifera indica* L.) representa una gran derrama económica para México con una tasa de exportación de más de 330,000 toneladas y una ganancia que excede los 300 millones de dólares (FAOSTAT, 2013). Además, una de las propiedades nutricionales que hacen atractivo a este fruto es su alto contenido de ácido L-ascórbico (vitamina C). El ácido ascórbico, juega un papel crucial tanto en plantas como en animales participando en procesos biológicos y fisiológicos, ayudando en humanos al mantenimiento de la salud y la defensa a enfermedades. Uno de los principales papeles fisiológicos que desempeña es como antioxidante hidrosoluble permitiendo la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rosalie *et al.*, 2015).

Las ERO se generan comúnmente durante el metabolismo aerobio de las células, en adición a ciertas condiciones de estrés. En el caso de las plantas, al ser organismos sésiles se encuentran expuestas al ambiente que los rodea. En conjunto, esto genera y produce acumulación de ERO causando un desbalance que puede repercutir en un daño oxidativo a las células. De tal modo que, para mantener un balance de ERO, las plantas cuentan con sistemas detoxificantes que involucran como componentes primarios moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico (Feng *et al.*, 2014; Harb *et al.*, 2010).

El ácido ascórbico se encuentra contenido en la mayoría de los tejidos vegetales y compartimentos celulares (Park *et al.*, 2016; Drew *et al.*, 2014), a su vez forma parte de una de las principales rutas enzimáticas conocida como el ciclo Ascorbato-Glutatión (AA-GSH). Este ciclo está conformado de una serie de reacciones de óxido-reducción donde se involucran cuatro enzimas: Ascorbato Peroxidasa (APX), Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR), Dehidroascorbato Reductasa (DHAR) y Glutatión Reductasa (GR), las cuales ayudan a mantener en su forma activa el ácido ascórbico permitiendo la regulación de las ERO (Noshi *et al.*, 2016; Palma *et al.*, 2006).

A la fecha se ha purificado y caracterizado la enzima MDHAR de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, el arroz (*Oriza sativa*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*). En éstos se ha observado que los cambios en la expresión de esta enzima confieren tolerancia a diversas condiciones de estrés como el frío, la salinidad, entre otros (Murshed *et al.*, 2014). Do y col. (2014) reportaron la purificación, actividad enzimática y estudios preliminares de cristalografía de una MDHAR recombinante de arroz (*Oryza sativa* L. *japónica*). Ellos lograron purificar la proteína de la fracción soluble por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), seguida de una cromatografía de exclusión molecular después de añadir el cofactor NADH, logrando una pureza del 95%. Al analizar la actividad reductasa de la proteína obtuvieron aproximadamente 380 U/mg de proteína, confirmando que la proteína existe en su forma funcional.

Estudios posteriores realizados por Park y col. (2016) reportan la primera estructura cristalográfica de la MDHAR de arroz, donde localizan tres dominios principales. A su vez proponen un mecanismo catalítico de tipo *ping pong* donde dos electrones del cofactor NAD(P)H son transferidos y reducen al FAD, quien posteriormente transfiere esos electrones al residuo catalítico el cual reduce el sustrato monodehidroascorbato a ácido ascórbico. Otros autores como Dalton y col. (1992) han reportado los efectos del pH sobre la actividad específica de MDHAR en nódulos de soya (*Glycine max* L. *Merr*), la cual resultó ser estable en un rango de 8.0-9.0. Además Sano y col. (2005) reportaron una MDHAR de espinaca, estable en un rango de 6.5-9.0, mientras que Huang y col. (2010) reportan una MDHAR de camote (*Ipomea batatas* L. *Lam*) estable al pH en un rango de 6.0-10.0; adicionalmente reportan el primer estudio del efecto térmico sobre la estabilidad en la enzima a 70 °C, reportando una inactivación media a los 12.4 min.

En nuestro grupo de Investigación, Dautt-Castro y cols. (2018) reportaron el transcriptoma del mango cv. Ataulfo (Acceso PRJNA286253) en el cual se obtuvieron algunos transcritos que codifican para DHARs y MDHARs, las cuales participan en conjunto en el reciclaje del ácido ascórbico. En trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación, Fimbres-García (2016) y Moreno-Bojórquez (2017) caracterizaron una DHAR cuyo transcrito se obtuvo del transcriptoma de mango cv. Ataulfo (MiDHAR).

Fimbres-García reportó que la MiDHAR mantiene su actividad a altas temperaturas y mostró una T_m de 46.6°C y a pH alcalino. Mientras que Moreno-Bojórquez reportó que la DHAR es estable a temperaturas elevadas en el rango de 50-70°C. A partir de este transcriptoma también se identificaron tres transcritos que codifican para MDHAR, que se ha reportado que participa en la recuperación del ácido ascórbico para la eliminación de ERO generadas por estrés. Lo anterior nos llevó a realizar la caracterización bioquímica de la MDHAR de mango y preguntar si mantiene su actividad bajo condiciones de temperatura elevadas y pH alcalino, siendo el objetivo de este trabajo. Los resultados obtenidos sugieren que es posible proponer alternativas de modificaciones genéticas en plantas sensibles al calor, de tal manera que la MiMDHAR les confiera resistencia a este tipo de estrés que se presenta debido al cambio climático.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Ácido Ascórbico y su Función en las Plantas

El ácido ascórbico (AA) es un compuesto orgánico con fórmula molecular $C_6H_8O_6$ y un peso molecular de 176.13 g/mol (Zhang, 2013); además, es el principal antioxidante hidrosoluble en plantas y animales. El ácido ascórbico es una de las vitaminas más sencillas, se encuentra relacionada con los azúcares de 6 carbonos, específicamente la L-galactosa, que contiene un grupo enodiol en los carbonos 2 y 3 los cuales utiliza para donar electrones (Davey *et al.*, 2000). A la fecha se han reportado cuatro rutas de biosíntesis de AA en las plantas, de las cuales la ruta de L-galactosa, también conocida como Smirnoff-Wheeler es considerada como la principal vía de producción de ácido ascórbico (Gallie, 2013) (Figura 1). No obstante, estas vías no son la única manera en que las plantas generan AA ya que cuentan con una vía alterna conocida como la ruta del reciclaje, la cual se ha visto tiene un importante rol en la demanda AA, así como en el desarrollo, adaptación y respuesta al estrés. En esta ruta participan dos enzimas principales, la Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR) y la Dehidroascorbato Reductasa (DHAR), las cuales reducen a su forma activa los productos de la oxidación del ácido ascórbico.

En las plantas, el AA es un metabolito crítico, el cual se encuentra involucrado en diversos procesos como la fotosíntesis, fotoprotección, el crecimiento de la pared celular, la expansión y la división de la célula, así como en resistencia contra el estrés ambiental, donde juega su papel principal como antioxidante (Smirnoff y Wheeler, 2000). Respecto a esta última función, un antioxidante biológico eficiente es aquel que además de reaccionar con radicales libres, se encuentra en cantidad adecuada en la célula y debe ser capaz de regenerarse (Arrigoni y Tullio, 2002). Estas propiedades, las cuales definen a un buen antioxidante, son típicas del ácido ascórbico, lo cual es de interés ya que permite mantener una respuesta a diversos tipos de estrés a los que se puede ver sometida una planta en su ciclo de vida (Eltelib *et al.*, 2011).

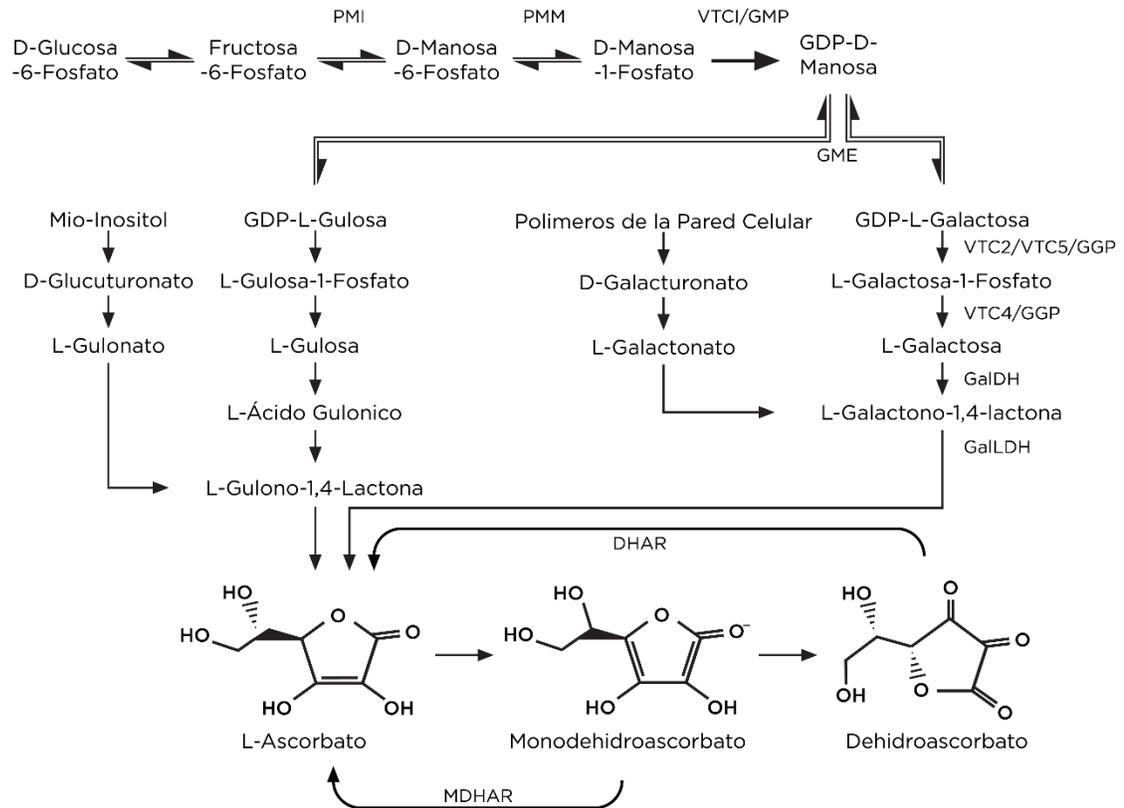


Figura 1. Rutas de biosíntesis y reciclaje del ácido ascórbico en plantas. Principales enzimas participantes en la ruta de Smirnoff-Wheeler. PMI: Manosa-6-fosfato isomerasa; PMM: Fosfomanosa mutasa; VTC1: GDP-manosa pirofosforilasa, GMP: Manosa-1-fosfato guanililtransferasa; GME: GDP-Manosa-3',5'-epimerasa; GDP: GDP-L-galactosa fosforilasa; GPP: L-galactosa-1-fosfato fosfatasa; GaldH: Galactosa deshidrogenasa; GallDH: L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa. Enzimas participantes en el reciclaje del Ácido Ascórbico. MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa y DHAR: Dehidroascorbato reductasa. Adaptado de Gallie (2013).

2.1.1. Ácido Ascórbico como Antioxidante y su Relación con el Crecimiento de las Plantas

El ácido ascórbico como antioxidante juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo, el cual es generado por la exposición a distintas condiciones adversas, que pueden ser bióticas y abióticas. Estas últimas son ocasionadas por la exposición a factores ambientales como: el frío, el calor, la salinidad, la luz intensa, el ozono,

herbicidas, metales pesados, la sequía, entre otros (Buchanan *et al.*, 2015), que promueven la producción de EROS. Además, cabe señalar que estos compuestos también son generados en condiciones normales, tanto en la fotosíntesis como en el metabolismo aerobio de las células (Conklin, 2001). Cuando las condiciones anteriores superan la capacidad antioxidante de la célula, se provoca la acumulación de estas especies tóxicas causando daños en componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN, hasta una posible muerte celular (Batth *et al.* 2017; Shin *et al.* 2014).

Para que las plantas mantengan niveles controlados de las ERO, éstas desarrollaron varios mecanismos de defensa donde los componentes primarios son moléculas antioxidantes a las que pertenece el ácido ascórbico (Harb *et al.* 2010). El ácido ascórbico se encuentra presente en la mayoría de los compartimentos intracelulares de las plantas, donde participa como antioxidante para proteger a las células del daño causado durante el estrés oxidativo. Éste actúa de forma directa e indirecta para eliminación de ERO, ya sea eliminando radicales libres o como donador de electrones (Drew *et al.* 2007), en esta última formando parte del ciclo Ascorbato-Glutatión.

El ciclo Ascorbato-Glutatión es uno de los principales sistemas antioxidantes en las células de las plantas, se encuentra conformado por una serie de reacciones de óxido-reducción donde se involucran cuatro enzimas: la Ascorbato Peroxidasa (APX), la Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR), la Dehidroascorbato Reductasa (DHAR) y la Glutatión Reductasa (GR), como se muestra en la figura 2. Estas enzimas ayudan a mantener el ácido ascórbico en su forma activa permitiendo su utilización para la regulación de ERO.

2.2. Participación de la Enzima Monodehidroascorbato Reductasa (MDHAR) en la Ruta de Reciclaje del Ácido Ascórbico

El ciclo ascorbato-glutatión se encuentra conformado por reacciones de óxido-reducción donde se involucran cuatro enzimas (Figura 2). Este ciclo inicia cuando el ácido ascórbico dona sus electrones a la APX durante la reducción enzimática del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando como resultado de esta reacción el monodehidroascorbato. El monodehidroascorbato es un radical de vida corta, por lo que puede sufrir una desproporción espontánea a dehidroascorbato. Este último, al igual que el monodehidroascorbato es un radical inestable el cual fácilmente es hidrolizado a 2,3-diceto-L-gulonato el cual no forma parte del ciclo ascorbato-glutatión (Shin *et al.*, 2013). Lo anterior nos indica que la reducción de los radicales monodehidroascorbato y dehidroascorbato es crucial para mantener las concentraciones de ácido ascórbico.

Las enzimas que llevan a cabo la reducción de los radicales producidos por la oxidación del ácido ascórbico, son la MDHAR y la DHAR. A ambas enzimas se les conoce como enzimas del reciclaje y se encuentran formando parte del ciclo ascorbato-glutatión (Truffault *et al.*, 2016). La MDHAR reduce el radical monodehidroascorbato a ácido ascórbico, cuya reacción es dependiente de los electrones recibidos del NAD(P)H. Por otro lado, el monodehidroascorbato que no es reducido es transformado a dehidroascorbato, el cual es reducido a ácido ascórbico por la DHAR quien utiliza al glutatión como donador de electrones (Noshi *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha reportado que bajo condiciones de hiperoxidación puede ocurrir la inactivación de la DHAR. Lo anterior sugiere que el papel de la MDHAR puede ser más eficiente en la regeneración del ácido ascórbico bajo fuertes condiciones de estrés oxidativo, en comparación con la DHAR (Park *et al.*, 2016).

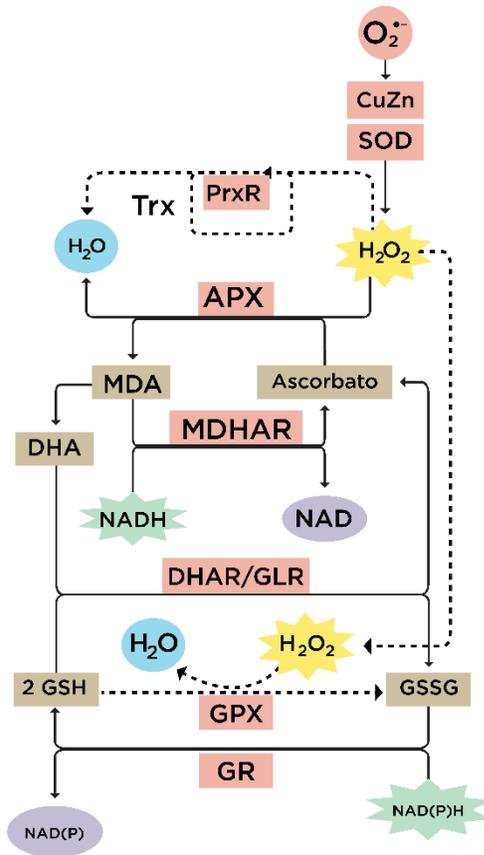


Figura 2. Ciclo Ascorbato-Glutatión. Se observa la participación de las enzimas que llevan a cabo la regeneración del Ácido Ascórbico, así como la transformación del radical Peróxido de Hidrógeno a Agua. APX: Ascorbato Peroxidasa; MDA: Monodehidroascorbato; MDHAR: Monodehidroascorbato Reductasa; DHA: Dehidroascorbato; DHAR: Dehidroascorbato Reductasa; GR: Glutatión Reductasa; GSH: Glutatión Reducido; GSSG: Glutatión Oxidado; NAD(P)H/NAD(P)⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido (Fosfato) reducido/oxidado. Adaptado de Buchanan y col. (2015).

2.2.1. Reciclaje de Monodehidroascorbato, Importancia Fisiológica para las Plantas ante Situaciones de Estrés

La enzima MDHAR ya ha sido purificada y caracterizada de algunas plantas y frutos modelo como el arroz (*Oryza sativa*), el camote (*Ipomea batatas*), la soya (*Glicine max*), entre otras (Do *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2010; Dalton *et al.*, 1992). Paralelamente se han observado los efectos fisiológicos sobre plantas y frutos sometidos a distintas fuentes de estrés, donde se han modificado las condiciones de expresión de esta enzima. Tal es el

caso presentado por Truffault y col. (2016), quienes demostraron que la reducción en la expresión de la enzima MDHAR en plántulas de tomate “cherry” retarda el crecimiento de hojas y tallo bajo distintas intensidades de luz. En ese mismo estudio, en plantas maduras de tomates “cherry” se observó que en aquellas con la expresión reducida de la enzima, los frutos obtenidos presentaban un menor desarrollo en comparación con los frutos de plantas silvestres.

A diferencia de Truffault, Li y col. (2012) llevaron a cabo la transformación de plantas de tomate que sobreexpresaban una MDHAR de cloroplasto. Dichas plantas fueron sometidas ante condiciones de estrés osmótico, presentando un aumento en la actividad enzimática de MDHAR, así como en los niveles de ácido ascórbico. Estos resultados los relacionaron con un aumento en la tolerancia contra el estrés osmótico, gracias al aumento en la expresión de la enzima. Por otro lado, Stevens y col. (2008) midieron la correlación de los niveles de ácido ascórbico en su forma reducida y la actividad enzimática de MDHAR sobre la firmeza en tomates sometidos a estrés por frío (4°C por 40 días). En este estudio observaron que la actividad de la MDHAR se encuentra activa para mantener los niveles de ácido ascórbico, resultando una ligera reducción en la firmeza del fruto durante la exposición prolongada al frío.

A su vez, Eltayeb y cols. (2007), desarrollaron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban la enzima MDHAR de *A. thaliana*, estas plantas fueron sometidas ante distintas condiciones como la presencia de ozono, altas concentraciones de sal y de polietilenglicol, midiendo el efecto sobre la tasa fotosintética. Las plantas ante el ozono pueden sufrir la inhibición de la fotosíntesis, sin embargo, las plantas que sobreexpresaban la MDHAR mantenían su tasa fotosintética superior al 50% conforme al valor obtenido previo a ser expuestas al ozono durante 30 h. Mientras que los valores obtenidos de la tasa fotosintética ante la exposición a la sal y al polietilenglicol después de 8 y 6 días respectivamente, se mantuvieron por arriba del 40 y 60%. En este mismo estudio se midió los niveles de peróxido de hidrógeno, resultando menores en las plantas que sobreexpresaban la MDHAR. Esto lo relacionaron a la actividad de la MDHAR, que

permite la regeneración de ácido ascórbico para la eliminación del peróxido generado por la fotosíntesis.

2.3. Características Generales de la MDHAR

Las MDHARs (E.C. 1.6.5.4), también conocidas como Reductasas de Radicales Libres de Ascorbato (AFR, por sus siglas en inglés), son proteínas monoméricas dependientes de NAD(P)H, con un peso molecular que se encuentra en un rango de 42 kDa (*Solanum tuberos*) a 52 kDa (*Euglena*) (Dalton *et al.*, 1992). Se ha reportado la presencia de esta enzima, al igual que el ácido ascórbico, en diversos compartimentos celulares, donde se encuentran incluidos cloroplasto, mitocondria, peroxisoma y citosol (Shin *et al.*, 2013). Las MDHARs citosólicas se encuentran compuestas de 433-436 residuos de aminoácidos. Sin embargo, esta secuencia puede aumentar de 40 a 60 residuos en sus extremos amino terminal o carboxilo terminal, por la presencia de péptidos de señalización que la redireccionan a otros compartimentos celulares (Lunde *et al.*, 2006).

En la figura 3 se muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la MDHAR de mango (este estudio), MDHAR de arroz (OsMDHAR), camote (IbMDHAR) y *A. thaliana* (AtMDHAR), lo que nos permite localizar regiones conservadas entre especies.

MiMDHAR	1	MA-ELLFKYVILGGGVAAGYAAEFKQGVNPGELAIISKEAVAPYERPALSKAYLFPFEG
IbMDHAR	1	MA-GKSFKYVILGGDVAAGYAAEFKQGVKPGELAIISKEAVAPYERPALSKAYLFPFEG
OsMDHAR	1	MASEKHFKYVILGGGVAAGYAAEFKQGVKPGELAIISKEAVAPYERPALSKAYLFPFQN
AtMDHAR	1	MA-EKSFKYVILGGGVSAAGYAAEFANQGVQPGELAVISKEAVAPYERPALSKAYLFPFEG
MiMDHAR	60	TARLPGFHVCVGS GGERLLPEWYKKGIEELI LSTEIVKVDLSCKIIVSAAGTVFKYQILI
IbMDHAR	60	AARLPGFHVCVGS GGERLLPEWYTKGISLI LSTEIVEADVASKIILISAAGETFKYEVLI
OsMDHAR	61	AARLPGFHVCVGS GGERLLPEWYSEKGIELI LSTEIVKADLASKIILTSAVGATFTYELI
AtMDHAR	60	AARLPGFHCCVGS GGEKLLPEWYKQKGIELI LSTEIVKADLSAKSIVSATGDVEKYQTLI
MiMDHAR	120	IATGSTVIRLIDFGVQGGADAKNI FYLREIDDA D LLVHAIKTKKNGKAVIVGGGYIGLELS
IbMDHAR	120	IATGSTVLRLSDFGVQGGADSKNIFYLREIDEADKLVEAIKAKKNGKAVVGGGYIGLELS
OsMDHAR	121	IATGSSVIKLSDFGTQGGADSNNI FYLREVDIADKLVAAIQAKKNGKAVIVGGGYIGLELS
AtMDHAR	120	IATGSTVLRRLIDFGVKGADSKNIFYLREIDDA D KLVEAIKAKKNGKAVVGGGYIGLELS
MiMDHAR	180	AALRINNI DVIMVPEPWCMPRLFTAGIAAFYEGY YANKGVKIKGT VAVGFTADANGEV
IbMDHAR	180	AVLRMNNIDVIMVPEPWCMPRLFTASIAAFYEGY YENKGVKIKGT VAVGFDTHPNGEV
OsMDHAR	181	AALKINDFDVIMVPEPWCMPRLFTADIAAFYESY YTNKGVKIKGT VAVGFADANGDV
AtMDHAR	180	AVLRINNL DVIMVPEPWCMPRLFTADIAAFYET YTNKGVKIKGT VASGFTAQPNGEV
MiMDHAR	240	KEVRLKDGRLVLEADIVVVGVGGRPLISLVKGGQ EEFKGGIKTDAFEKTSVPDVYAVGDVA
IbMDHAR	240	KEVRLKDGRLVLEADIVVVGVGAKPLITLFLKGGQ EEFKGGIKTDAFEKTSVPGVYAVGDVV
OsMDHAR	241	TAVNLKNGSVLEADIVGVGVGGRPLITLFLKGGQ AEFKGGIKTDAFEKTSVPGVYAVGDVA
AtMDHAR	240	KEVQLKDGRTLEADIVIVGVGAKPLITSLFLKGGQ EEFKGGIKTDAFEKTSVPDVYAVGDVA
MiMDHAR	300	TFFLKLNFNERRVEHVDHARKSAEQAVKAIKASEEGKTI DEYDYLPNFYSRAFDLSWQFYL
IbMDHAR	300	TFFLKLNFNERRVEHVEHARKSAEQAVKAIKASEEGKTSI DEYDYLPNFYSRAFDLSWQFYL
OsMDHAR	301	TFFLKMYNELRRVEHVDHARKSAEQAVKAIKASESGESVVEYDYLPNFYSRSFDLWQFYL
AtMDHAR	300	TFFLKMVGDLRRVEHVDHRSRKSAREQAVKAIKASEGGAAVEYDYLPNFYSRSFDLSWQFYL
MiMDHAR	360	GDNVGDTVLFGDGDPASATHRFQTYWIKDGKVVGVFLES GTPENKAIKAVARIQPPVDD
IbMDHAR	360	GDNVGETVLFGDNDFKSPTHRFQYWIQNGKVVGAFL ESGTPENKAIKAVARVQPPALS
OsMDHAR	361	GDNVGDTILFGDSPTSAKPFQGSYWIKDGKVVGAFL EGGSPENKAIKAVARTQPPVAN
AtMDHAR	360	GDNVGDSVLFGDSNPSNPKPRFGAYWVQGGKVVGAFL EGGSGDENKAIKAVARPSAES
MiMDHAR	420	LELVISKEGIAFASKI
IbMDHAR	420	LELVANQGITFASKI
OsMDHAR	421	LELVKKEGICFASKI
AtMDHAR	420	LELVKQGISFAAKI

Figura 3. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de múltiples MDHARs. Sombreado oscuro significa que todos los aminoácidos entre especies son 100% idénticos, el sombreado gris representa un 75% de identidad entre especies. MiMDHAR de *Mangifera indica*; IbMDHAR de *Ipomea batatas* (UniProtKB code D2CGM8); OsMDHAR de *Oryza sativa* L. japónica (UniProtKB code Q652L6); AtMDHAR de *Arabidopsis thaliana* (UniProtKB code Q9LFA3).

Con lo anterior, se observa que la secuencia primaria de las MDHARs presenta alta similitud, específicamente la MDHAR de mango tiene un porcentaje de identidad de 83% con la MDHAR de camote, 79% de identidad con la MDHAR de arroz y 79% de identidad con la MDHAR de *A. thaliana*. Así mismo, Park y col. (2016) proponen una característica que comparten las MDHARs, que es la presencia de un lazo único formado por la secuencia conservada de los residuos 63-80 (*Oryza sativa*), el cual permite distinguir la estructura de MDHARs de aquellas proteínas hierro-azufre reductasas bacterianas. Basándonos en el modelo estructural de la MDHAR de arroz descrito por Park y col. (2016), el modelo estructural de MiMDHAR se conforma de 7 hélices α y 24 hojas β .

Recientemente se ha determinado la primera estructura cristalográfica de una MDHAR (Figura 4), donde se observa que el plegamiento es similar a las proteínas hierro-azufre reductasas bacterianas. Se encontraron tres dominios principales en la MDHAR siendo: el dominio de unión a Nicotinamida Adenina Dinucleótido (Fosfato) (NAD(P)H), el dominio de unión a Flavin Adenina Dinucleótido (FAD) y el dominio carboxilo terminal, los cuales se equiparan a los presentes en las proteínas hierro-azufre reductasas de bacterias. Sin embargo, al llevar a cabo una superposición de estructuras se observa una gran diferencia respecto al sitio de unión de sustrato, donde un lazo único del residuo 63-80 en MDHARs se ve involucrado en la formación de una cavidad catalítica, donde entran moléculas pequeñas como el monodehidroascrobato (Park *et al.*, 2016).

El dominio de unión a FAD descrito en la OsMDHAR adopta un plegamiento típico α/β , el cual se conforma por dos hojas β antiparalelas y una paralela, rodeadas por cuatro hélices α . El FAD se une en una hendidura en el sitio de unión de la proteína a través de puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals. Los residuos que participan en las interacciones de Van de Waals y el FAD son Gly13, Gly15, Ala122, Thr123, Gly297 y Ala319. La mayoría de estos se encuentran localizados al fondo de la hendidura y son altamente conservados entre especies. Por otro lado, la Lys53 forma un puente salino con Glu178, participando en la formación de un puente de hidrógeno con el carboxilo de la Pro49. Esta interacción es altamente conservada y se ha observado que la red de puentes de hidrógeno entre Lys53, Glu178 y el FAD se da comúnmente en otras enzimas, por ejemplo, en la glutatión reductasa (Park *et al.* 2016).

Por otro lado, el sitio de unión del NAD está conformado por los residuos 125 al 264. El dominio de unión de NAD en OsMDHAR se compone de hojas β antiparalelas y paralelas rodeadas por 3 hélices α . Los residuos que participan en las interacciones son Tyr174, Glu178, Glu196, Arg202, Glu314, His315 y Phe348. Así mismo, Park y col. (2016) proponen que el residuo que lleva a cabo la conversión del radical monodehidroascorbato a ácido ascórbico es una Tyr349.

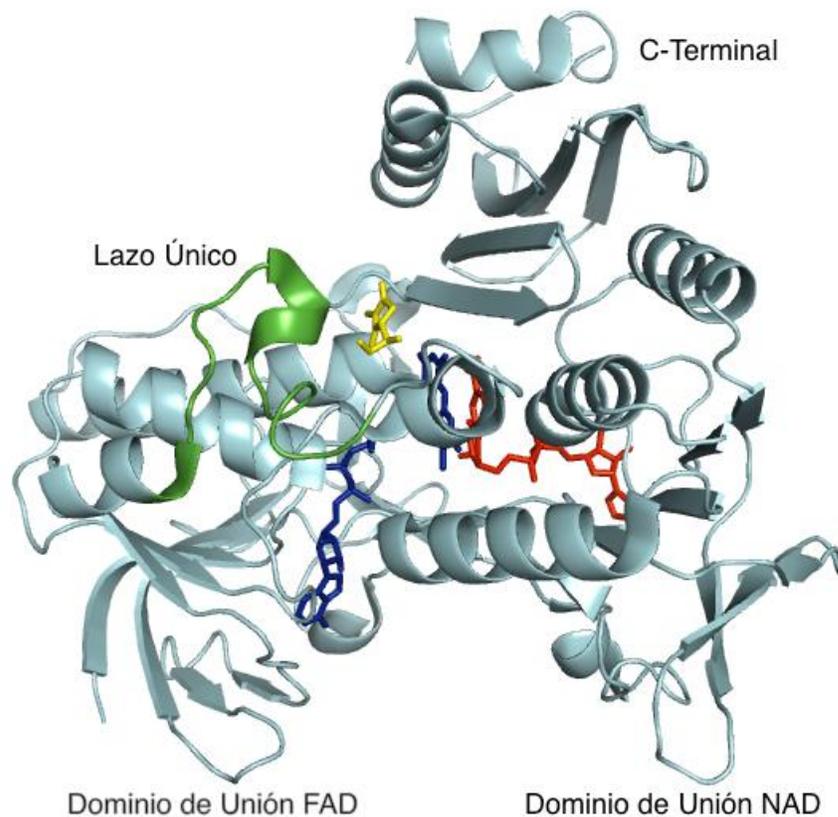


Figura 4. Estructura cristalográfica de la enzima MDHAR de arroz *Oryza sativa* L. japonica (OsMDHAR) (PDB: 5JCN). Se muestra de color azul el FAD en su sitio de unión, de color rojo se muestra el NAD en su sitio de unión, de color verde se muestra el lazo único y de color amarillo se muestra la estructura del ácido ascórbico.

2.3.1. Mecanismo de Acción y Actividad Enzimática de la MDHAR

A diferencia de la DHAR, la cual utiliza una cisteína como residuo catalítico, la MDHAR utiliza un residuo de tirosina para regenerar el ácido ascórbico. Se ha sugerido que el mecanismo de transferencia de electrones es de tipo *Ping Pong*, el cual inicia cuando dos electrones del NAD(P)H son transferidos al FAD reduciéndolo a FADH₂ en la OsMDHAR. Durante la reacción oxidativa, dos electrones son secuencialmente transferidos del FADH₂ a la Tyr349, resultando una reacción intermedia de flavin semiquinona. Entonces, los electrones son transferidos desde la Tyr349 a dos moléculas de radical monodehidroascorbato, generando dos moléculas de ácido ascórbico como se muestra en la figura 5.

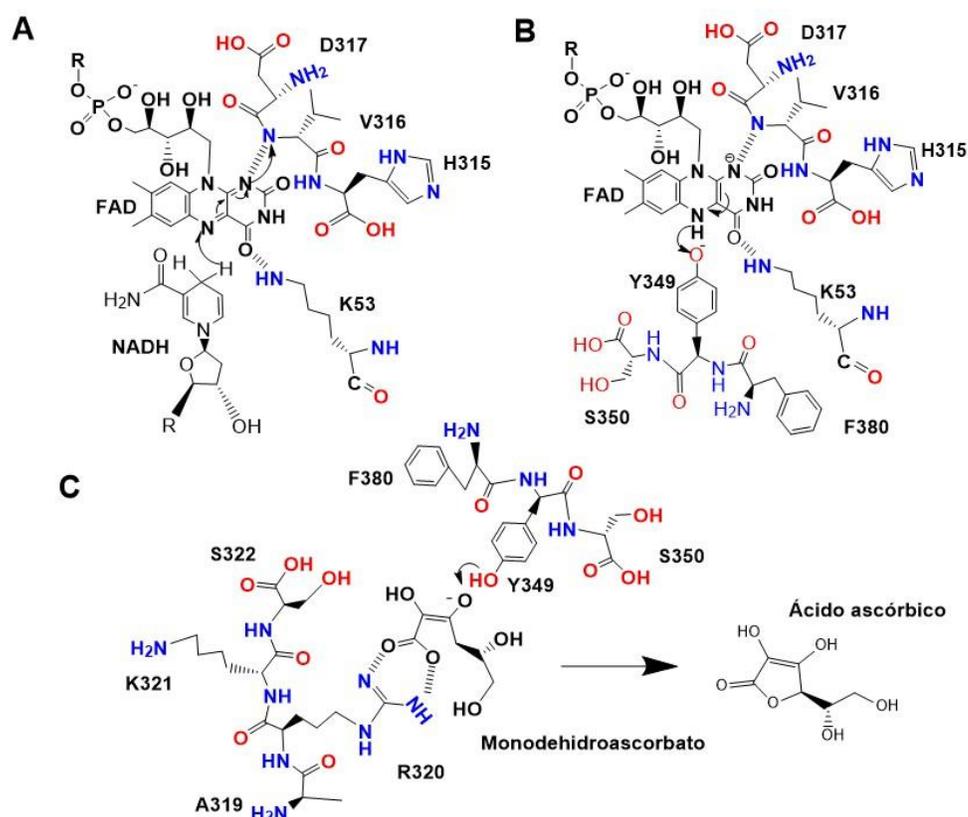


Figura 5. Mecanismo de transferencia de electrones propuesto para MDHAR en arroz (Park *et al.*, 2016). A: el NAD(P)H transfiere sus electrones al FAD, la V316 ayuda a estabilizar la carga negativa o puede proveer un protón; B: se muestra el proceso de reducción de la Tyr349 por el FADH₂; C: proceso de la reducción del sustrato unido monodehidroascorbato por la Tyr349 y producto final.

Con la estructura cristalográfica de la MDHAR de arroz se logró confirmar la preferencia por el NADH en lugar del NADPH como donador de electrones; al obtener la estructura del complejo NAD-MDHAR se observó un puente de hidrógeno entre la Glu196 y la molécula de O2B en el anillo adenosina del NAD. Para resaltar esta preferencia, se comparó colocando el NADP en la cavidad de unión al NAD y se observó que el residuo Glu196 se encuentra ocupando el sitio del grupo 2-fosfato del NADP (Park *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se han realizado estudios de cinética enzimática de MDHARs, como el realizado por Huang y col. (2010), quienes reportan las constantes cinéticas de una MDHAR de camote con valores de K_m y V_{max} con el sustrato MDA de 21.1 μM y 244 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente. También reportaron valores para el NADH donde se obtuvieron valores de K_m de 39.7 μM y V_{max} igual a 286 $\mu\text{M}/\text{min}$. En este mismo estudio se analizó el efecto térmico y el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, observándose que mantenía su actividad después de los 10 minutos a 70 °C, y en un rango de pH de 6.0 a 10.0 conserva un 90% de su actividad.

Por otro lado, también hay estudios como el de Sano y col. (2005), donde no solo obtuvieron valores de K_m para el NADH, sino también para el NADPH de una MDHAR de espinaca, resultando de 6.3 y 430 μM para NADH y NADPH respectivamente. En este estudio también observaron el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, reportando que el pH óptimo se encuentra en un rango de 6.5 a 9.0. Por otro lado, Dalton y col. (1992), midieron el efecto del pH sobre la actividad específica de una MDHAR de nódulos de soya en un rango de 5.6 a 10.1, y se observó que la mayor actividad se encuentra en un rango de 8.0 a 9.0. A su vez, reportan valores de K_m de 5.6, 150 y 7.0 μM para NADH, NADPH y monodehidroascorbato, respectivamente.

2.4. El Mango como Modelo de Estudio

El mango (*Mangifera indica* L.) perteneciente a la familia Anacardiaceae, es uno de los principales cultivos de frutas tropicales a nivel mundial. Este fruto es atractivo para los consumidores debido a su color, su delicioso aroma y alto contenido nutricional. México, ocupa el puesto número cinco de los principales productores de este fruto a nivel mundial, con una producción anual de 1,451,890 toneladas (SIAP, 2017). Además, se posiciona en el primer lugar en exportación de este fruto, con una tasa mayor de 330,000 toneladas y ganancias que superan los 300,000,000 de dólares (FAOSTAT, 2016).

El mango representa una rica fuente de carotenoides, ácido ascórbico y compuesto fenólicos. Se ha visto que estos compuestos difieren en tipo y cantidad dependiendo del cultivar de mango, la especie, el estado de madurez del fruto, su almacenamiento, procesamiento y condiciones de maduración (Liu *et al.*, 2013). El alto contenido de ácido ascórbico en los frutos del mango se puede ver afectado por diversos factores, como el estrés, en particular el térmico. Este tipo de estrés es de gran interés en la comercialización de los frutos de mango, ya que éstos son sometidos a un tratamiento cuarentenario (tratamiento hidrotérmico), para eliminar a la larva de la mosca de la fruta y así llevar a cabo su exportación (Jacobi *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, los contenidos de ácido ascórbico en el fruto del mango se pueden ver afectados por diversos factores de estrés, es aquí donde se ve involucrado el proceso de síntesis y regeneración a través del reciclaje. Este último con gran importancia ya que representa un menor gasto energético en el fruto y permite mantener los niveles de ácido ascórbico, donde la participación de las enzimas MDHAR y DHAR juega un papel importante.

En nuestro grupo de trabajo Dautt-Castro y col. (2015 y 2018) realizaron estudios de transcriptómica del mango Kent (GenBank PRJNA258477) y Ataulfo (GenBank PRJNA286253). En estos transcriptomas se localizaron transcritos que codifican para

MDHARs y DHARs. En el caso de las DHARs Fimbres-García (2016) y Moreno-Bojorquez (2017) caracterizaron bioquímica y estructuralmente una DHAR de mango, lo cual proporcionó conocimiento sobre la actividad de la enzima en la regeneración del ácido ascórbico y su tolerancia a dos condiciones de estrés (temperatura y pH). Por otro lado, a la fecha no se han realizado estudios sobre una MDHAR de mango, por lo que en este trabajo se caracterizó bioquímicamente y se analizó el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática de una MDHAR de mango, para poder comparar la participación de la MDHAR en el reciclaje del ácido ascórbico, así como su actividad con otras MDHARs ya caracterizadas.

3. HIPÓTESIS

La Monodehidroascorbato Reductasa de Mango (*Mangifera indica* L.) mantiene su actividad enzimática ante condiciones elevadas de temperatura y pH alcalino.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática de la Monodehidroascorbato reductasa de mango (MiMDHAR) recombinante.

4.2. Objetivos Específicos

1. Elaborar un modelo estructural de MiMDHAR por homología.
2. Purificar la MiMDHAR recombinante a partir de cultivo en lote en *Escherichia coli*.
3. Determinar las constantes cinéticas para ácido ascórbico como sustrato y NADH como cofactor de la MiMDHAR.
4. Evaluar el efecto de la temperatura y el efecto del pH sobre la actividad enzimática de MiMDHAR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Análisis de las Secuencias Nucleotídica y Deducida de Aminoácidos, y Estructura de MiMDHAR

5.1.1. Secuencia Codificante de MiMDHAR

La secuencia codificante de la MiMDHAR (clave c19463) citosólica fue obtenida a partir del análisis del transcriptoma de mango (Dautt-Castro *et al.*, 2018). Se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), comparándola contra secuencias contenidas en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). La comparación de la secuencia aminoacídica deducida por la traducción de nucleótidos en esta base de datos, permitió identificarla como una MDHAR. El cDNA de la MiMDHAR es de 1750 pares de bases (pb) con una región codificante de 1305 pb y codifica una proteína de 434 aminoácidos. Esta región codificante se mapeó al genoma de mango cv. Tommy Atkins (Dr. David N. Kuhn, comunicación personal) y es similar a una MDHAR codificada en el cromosoma 19:4,294,010 – 4,297,847 (cadena +) que contiene 10 exones y 9 intrones. Al comparar las regiones codificantes de la MiMDHAR y la clona del genoma son 99.3 % idénticas.

5.1.2. Modelación de la Estructura Tridimensional de la MiMDHAR

A partir de la secuencia de aminoácidos se obtuvo un modelo estructural por homología de MiMDHAR a través del servidor Phyre2 (Lawrence *et al.*, 2015) y SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) para producción, análisis y modelado de proteínas.

Adicionalmente se realizó un análisis comparativo y estructural por medio de la sobreposición del modelo teórico de la estructura de la MiMDHAR, con la estructura de la MDHAR de arroz (OsMDHAR) depositada en la base de datos Protein Data Bank PDB (Berman *et al.*, 2000): 5JCI y 5JCK, que se visualizó utilizando el programa PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger) y el paquete de visualización CCP4MG (McNicholas *et al.*, 2011).

5.2. Expresión Heteróloga de MiMDHAR Recombinante

5.2.1. Obtención del Constructo del Gen Sintético de MiMDHAR

A partir de la secuencia de nucleótidos identificada como MDHAR, se seleccionó el marco de lectura abierto (ORF) que codifica para la proteína, esta secuencia a su vez fue optimizada para ser expresada en *Escherichia coli*. Se utilizó un vector de expresión pET-11a (Novagen), en el cual se ligó el gen sintético (G-Block, IDT) de la secuencia codificante para MiMDHAR. El gen sintético MiMDHAR, además de la región codificante, contenía los codones para una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal, la cual facilitó la purificación de la proteína. La clonación del gen sintético en el vector de expresión pET-11a, se llevó a cabo por medio de los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *BamHI*. El vector de expresión pET-11a a su vez contiene un gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa) (Figura 6), para la selección de las clonas recombinantes positivas.

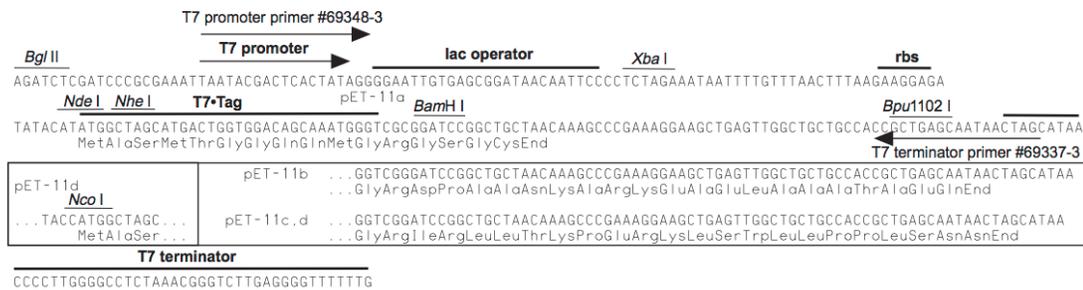
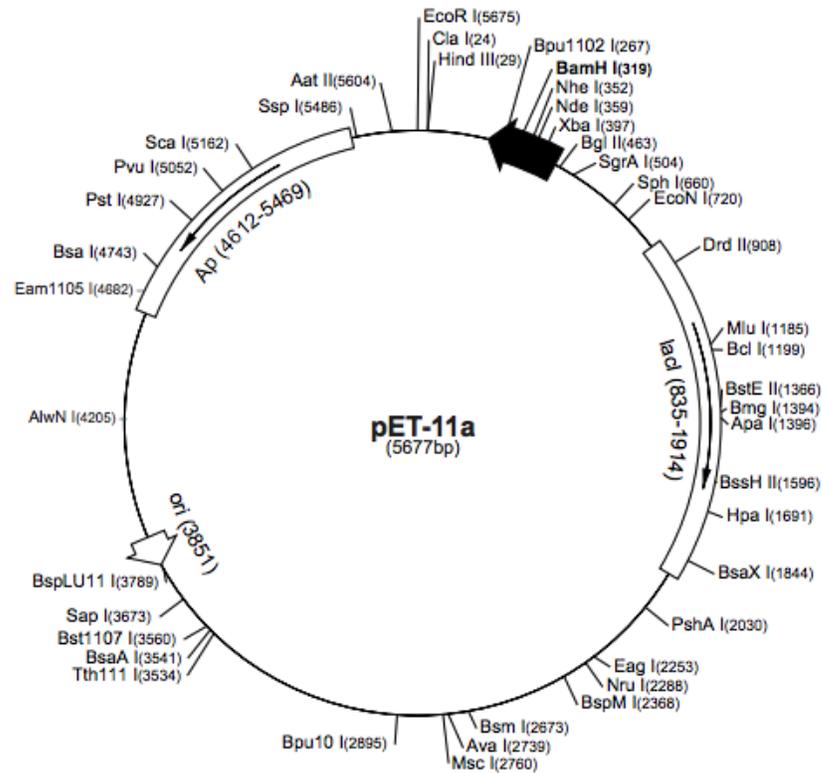


Figura 6. Mapa del vector de expresión pET-11a y mapa de la región de expresión-clonación (Novagen). La secuencia MiMDHAR se insertó el vector con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. Ap representa la secuencia codificante de resistencia a ampicilina, *lacI* la secuencia codificante del represor *lac*.

Para la transformación con el vector de expresión que contenía el gen de interés, se utilizaron células de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) por el método de choque térmico; posteriormente se cultivaron en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100 µg/mL) para identificar colonias positivas. Las placas se incubaron por 18 h a 37 °C y a partir de las colonias positivas se obtuvo DNA plasmídico por el método de lisis alcalina o miniprep (Green y Sambrook, 2012), el cual fue secuenciado en el

Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiente (LANBAMA) del IPICYT, S.L.P. para confirmar la secuencia nucleotídica de la clona de MiMDHAR.

5.2.2. Sobreexpresión de MiMDHAR Recombinante

Confirmada la secuencia nucleotídica de MiMDHAR se transformó la cepa de sobreexpresión *E. coli* Gold BL21 (DE3), las cuales se sembraron en placas Petri con agar LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 18 h. Se seleccionó una colonia, la cual se inoculó en tubos de ensaye con caldo LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 18 h en agitación constante, con el fin de obtener un cultivo saturado como preinóculo. Con el cultivo saturado se inoculó un matraz con medio Terrific Broth (TB) adicionado con ampicilina (100 µg/mL), el cual se incubó en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Al alcanzar esta densidad óptica, se procedió a realizar la inducción de la sobreexpresión con isopropil-β-D-tiogalactopironósido (IPTG) como inductor en una concentración final de 0.1 mM.

La sobreexpresión se indujo en frío, colocando el matraz en un baño de agua con hielo durante 15 min. Posteriormente a la inducción se incubó el cultivo a 25 °C en agitación constante durante 16 h. Se recolectaron muestras de 1.5 ml del cultivo por duplicado a partir de la inducción (tiempo 0, T0) para monitorear la sobreexpresión a las 2h (T2), 4h (T4), 6h (T6) y 16h (T16). Con las muestras recolectadas se obtuvo el paquete celular por medio de centrifugación a 4°C y 16887 g durante 3 min, el cual se resuspendió con 200 µL de solución buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 200 mM).

Posteriormente se incubó durante 15 min en hielo y se procedió a realizar la lisis celular por medio de sonicación con 20 pulsos al 40% con pausas de 20 segundos por 4 repeticiones (Sonifier 450, BRANSON), manteniendo las muestras en hielo. El lisado se clarificó por centrifugación a 4°C y 9,300 g durante 20 min, obteniéndose el sobrenadante y el precipitado bacteriano, para analizarlos como la fracción soluble e insoluble

respectivamente. El análisis de estas fracciones se realizó por medio de electroforesis en geles de acrilamida al 12%, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Para lo anterior, a los sobrenadantes obtenidos se les añadió buffer carga 5x y DTT recién preparado, mientras que a los precipitados bacterianos se les agregó buffer carga 2x y DTT fresco, y se calentaron las muestras a 96°C durante 10 minutos. Los resultados de la electroforesis se visualizaron por medio de tinción con azul de Coomassie, utilizando un equipo de fotodocumentación BIO RAD Gel Doc™ EZ Imager (Software Image Lab™)

5.3. Purificación de MiMDHAR por Cromatografía de Ni-NTA

5.3.1. Preparación del Extracto Celular

Se cosechó el paquete celular de la sobreexpresión a las 16 h por centrifugación (SORVALL RC 5C PLUS) a 4°C y 2702 g (4000 rpm) durante 15 min. La pastilla celular se resuspendió en solución de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 200 mM) a una razón de 4 mL por gramo de pastilla. Posteriormente, se incubó durante 15 min en hielo y se llevó a cabo la lisis celular por medio de sonicación, utilizando 20 pulsos al 40% con pausas de 20 segundos por 4 repeticiones (Sonifier 450, BRANSON) manteniendo la muestra en hielo. El lisado se clarificó por centrifugación a 4°C y 11,953 g (10,000 rpm) durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante, y el proceso de lisis celular y clarificación se realizó por duplicado. Posteriormente la muestra fue filtrada para ser utilizada en el proceso de purificación.

5.3.2. Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados

La purificación de la MiMDHAR recombinante se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Se utilizó una columna de Níquel-Sefarosa (HisTrap HP de 5 mL), donde el níquel se encuentra unido al ácido nitriloacético (Ni-NTA), que fue acondicionada conforme al protocolo descrito por el fabricante (GE Healthcare). Como primer paso, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de buffer de limpieza (Fosfato de Sodio 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM). Después se aplicaron 5 volúmenes de columna con el buffer de unión (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 200 mM) y un lavado de 5 volúmenes de columna con agua antes de recargar la columna. La columna se recargó con 2.5 mL de una solución 0.1 M de NiSO₄. Posteriormente, se lavó con 5 volúmenes de agua y 5 volúmenes de buffer de unión.

La cromatografía se realizó utilizando un equipo ÄKTA Prime (GE Healthcare) de mediana presión, donde la columna se acondicionó con el buffer de unión. La MiMDHAR se inyectó a la columna y posteriormente se utilizó un buffer de elución (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 200 mM, Imidazol 500 mM) para obtener las fracciones de proteína pura. Las condiciones en que se realizó la cromatografía fueron las siguientes, cabe mencionar que durante todo el proceso se monitoreó la absorbancia a 280 nm.

La inyección de la MiMDHAR se realizó a un flujo de 0.5 mL/min, posteriormente a la inyección se realizó el lavado de la columna por lo que se modificó el flujo a 1 mL/min, este lavado permitió que todas aquellas proteínas que no interactúan con la matriz eluyan. Después de lavar la columna y permitir que la absorbancia disminuya a línea base se inició el proceso de elusión en modo escalonado para 3 distintos porcentajes de elusión. El primer escalón al 2 %, el segundo al 10% y el tercero al 15%, en cada escalón se observó un aumento en la absorbancia y al igual que en lavado se dejó disminuir hasta línea base para continuar con el siguiente escalón. Las fracciones recolectadas durante la inyección y lavado fueron de un volumen de 5 mL y cada fracción que se recolectó durante la elusión

fue de un volumen de 3 mL. Las fracciones se recolectaron y analizaron por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La concentración de proteína de las fracciones puras se determinó por el método de Ácido Bicinconínico (BCA) usando albúmina de suero bovino (BSA) (Kit Pierce BCA Protein Assay Thermo Scientific) cómo estándar.

5.3.3. Determinación del Estado Oligomérico de MiMDHAR

Para llevar a cabo la determinación del estado oligomérico de la MiMDHAR se realizó una cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex75 10/300 GL para filtración en gel, en el equipo ÄKTA Pure (GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con una solución de Fosfato de Sodio 20 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM, y posteriormente se inyectaron 500 μ L de MiMDHAR concentrada hasta 1 mg/mL. La columna fue previamente calibrada con las proteínas Conalbúmina (75.0 kDa), Ovoalbúmina (44.0 kDa), Anhidrasa Carbónica (29.0 kDa), Ribonucleasa A (13.7 kDa), Aprotinina (6.5 kDa), con las cuales se obtuvo una curva estándar. La curva estándar se generó con el logaritmo del peso molecular ($\log PM$) y el coeficiente de partición (k_{av}), ya que existe una relación lineal entre ambos valores. El k_{av} se determinó como se muestra en la ecuación 1. A partir de la curva estándar se calculó el peso molecular, para el estado oligomérico de la proteína MiMDHAR, se realizó una división entre el peso molecular obtenido experimentalmente y el peso molecular teórico del monómero de la MiMDHAR.

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (1)$$

Donde V_e corresponde al volumen de elución de la proteína, V_o es el volumen vacío de la columna el cual corresponde al volumen de elusión de Azul de Dextran 2000 y V_t siendo el volumen total de la columna.

5.4. Determinación de la Actividad Enzimática de MiMDHAR

La determinación de la actividad enzimática de MiMDHAR se realizó a través de un ensayo acoplado donde el sustrato monodehidroascorbato es generado por la oxidación del ácido ascórbico (AA) en presencia de la enzima ascorbato oxidasa (AOx) como se muestra en la figura 7. La medición se realizó de manera espectrofotométrica mediante la cuantificación de la oxidación del NADH en un equipo Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, EEUU), monitoreando la reacción a una longitud de onda de 340 nm durante 5 minutos, a 25 °C, y, conforme al protocolo reportado por Hossain y col. (1984).

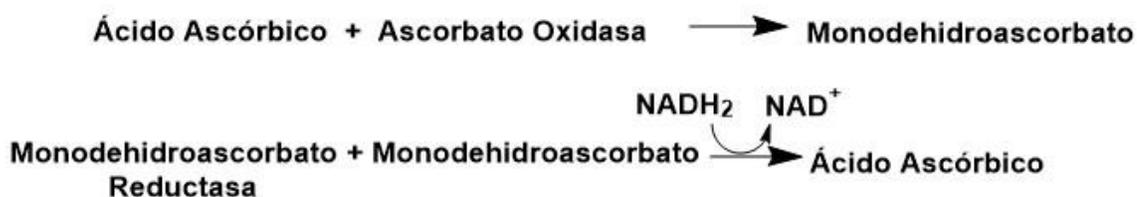


Figura 7. Ensayo acoplado de MDHAR. La primera reacción muestra la generación del sustrato monodehidroascorbato por la reacción catalizada entre el ácido ascórbico y ascorbato oxidasa. La segunda reacción muestra la recuperación del ácido ascórbico por la reducción del sustrato monodehidroascorbato a través de la MDHAR utilizando NADH como cofactor.

Para lo anterior, se utilizó el sistema de generación de monodehidroascorbato propuesto por Arrigoni y col. (1981), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción (volumen final de 1 ml) estaba constituida de un buffer de fosfato de potasio monobásico 100 mM, fosfato de sodio dibásico 4 mM (pH 7.2), EDTA 0.5 mM, AA 3 mM, NADH 0.2 mM, AOx 0.1 U/mL y 4 µg de MiMDHAR; la reacción se inició con la adición del AA. La actividad enzimática se calculó haciendo uso de las ecuaciones 2 y 3, utilizando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $6.22 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Hossain y Asada, 1984), definiéndose una unidad de actividad MDHAR como la cantidad de enzima que oxida 1 µmol de NADH por min. La actividad de MDHAR se corrigió restando los valores de absorbancia del blanco de reacción.

$$\text{Actividad Total} = m \left[\frac{\text{Volumen de Reacción}}{\epsilon (\text{Volumen Muestra en la Reacción}) l} \right] \quad (2)$$

Donde m es la pendiente de la reacción, ϵ es el coeficiente de extinción molar y l la longitud de la celda por la que atraviesa el haz de luz, obteniéndose como resultado la Actividad Total en valores de $\mu\text{M}/\text{min}$.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Actividad Total}}{\text{Concentración de Proteína}} \quad (3)$$

Actividad Total en valores de $\mu\text{M}/\text{min}$ y la concentración de proteína en valores de mg , para obtener valores de actividad específica en $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

5.5. Determinación de las Constantes Cinéticas de MiMDHAR

Los parámetros cinéticos K_m , V_{\max} y k_{cat} se determinaron con la MiMDHAR recombinante midiendo la actividad enzimática como está descrita anteriormente, utilizando diferentes concentraciones de AA y NADH en un rango de 0 a 3.0 mM y 0 a 0.2 mM, respectivamente. Para el AA se mantuvo fija la concentración de NADH a 0.2 mM y se varió la concentración de AA, como se describió anteriormente. Para el NADH se mantuvo fija la concentración de AA a 3.0 mM y se varió la concentración de NADH, de igual forma como se describe anteriormente (Huang *et al.*, 2010). Las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos experimentales se ajustaron por medio de regresión no lineal a partir de la ecuación de Michaelis-Menten, para obtener los valores de K_m , V_{\max} como recomienda Perrin (2017), quien menciona que los datos cinéticos ajustados por regresión lineal son anormales ya que los datos son heterocedásticos. Aun así, se

linealizaron por medio del gráfico de doble recíprocos de Lineweaver-Burk (Segel, 1993) para mostrar el ajuste linearizado.

5.6. Determinación del Efecto de la Temperatura y el pH sobre la Actividad Enzimática de MiMDHAR

La determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de MiMDHAR recombinante, se evaluó incubando la proteína en un rango de 10 a 80 °C durante 15 minutos en intervalos de 10°C. Posteriormente se midió la actividad enzimática conforme a las condiciones descritas en el ensayo de actividad enzimática y se realizó un ajuste por medio de la ecuación de Boltzmann para la determinación de la temperatura media (T_m).

Para la determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática de MiMDHAR, la proteína se incubó en soluciones amortiguadoras en un rango de pH de 4.0 a 11.0, durante 30 min. Para cada pH se utilizaron las siguientes soluciones: pH 4.0 y 5.0 se conformó de una solución de citratos 110 mM, para los pH 6.0, 7.0 y 8.0 se utilizó una solución fosfatos de potasio 110 mM, para el pH 9.0 se utilizó una solución Tris 110 mM y para los pH 10.0 y 11.0 se utilizó una solución de CAPS (ácido 3-(ciclohexilamino)propanosulfónico) 110 mM. La actividad enzimática se determinó posteriormente conforme al ensayo descrito anteriormente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de Secuencia Aminoacídica de MDHAR

La secuencia de MiMDHAR (Figura 8) cuenta con un marco de lectura abierto (ORF) de 1305 nucleótidos, que codifican para una proteína deducida de 434 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 46.98 kDa. valor que se encuentra dentro del rango de MDHARs reportadas. Al realizar un alineamiento múltiple con otras MDHARs (Figura 9), se observa que MiMDHAR conserva una identidad de 83, 79 y 79% con IbMDHAR, OsMDHAR y AtMDHAR, respectivamente. Además, se localizaron los residuos que conforman los dominios FAD y NAD altamente conservados entre especies. En este mismo alineamiento se puede localizar el lazo único descrito por Park y col. (2016), el cual ayuda a formar una cavidad catalítica para moléculas pequeñas como el monodehidroascorbato, y a su vez permite distinguir las MDHARs de proteínas hierro azufre reductasas de bacterias. Así mismo, se localizó el residuo Tyr349 en OsMDHAR, en la posición 348 en MiMDHAR, el cual lleva a cabo la catálisis de transformación del sustrato oxidado monodehidroascorbato nuevamente a ácido ascórbico, en colaboración con otros residuos cercanos que permiten el acomodo del sustrato.

```

1   ATGCATCATCATCATCACCATTTGGAAGTGTGTGTTCCAAGGACCTGGTAGCATGGCAGAA
1   M H H H H H H L E V L F Q G P G S M A E
61  CTTCTGTTCAAATATGTCATCCTGGGTGGGGGAGTAGCGGCGGGCTATGCAGCGCGTGAG
21  L L F K Y V I L G G G V A A G Y A A R E
121 TTTGCCAAACAAGGGGTTAATCCGGGTGAATTGGCTATTATCTCAAAAGAGGCTGTGGCT
41  F A K Q G V N P G E L A I I S K E A V A
181 CCCTACGAACGCCAGCTCTTAGTAAGGCGTACCTGTTCCCGGAGGGAACAGCACGCTTG
61  P Y E R P A L S K A Y L F P E G T A R L
241 CCGGGGTTCCATGTTTTGTGTGCGGCAGTGGCGGTGAGCGCCTTTTGCCGGAATGGTATAAA
81  P G F H V C V G S G G E R L L P E W Y K
301 GAGAAGGGAATTGAGTTAATTCTGTCCACAGAAATTGTTAAAGTAGATCTGAGCTGTAAG
101 E K G I E L I L S T E I V K V D L S C K
361 ACCTTGGTATCAGCAGCGGGCACTGTCTTCAAATACCAGATTCTTATTATTGCCACTGGC
121 T L V S A A G T V F K Y Q I L I I A T G
421 AGTACGGTTATCCGTCTGACGGACTTTGGAGTACAGGGTGCCGACGCGAAAAACATCTTC
141 S T V I R L T D F G V Q G A D A K N I F
481 TATTTACGCGAAATCGATGACGCTGATTTGCTTGTCTGAAGCAATTAAGACGAAAAAAC
161 Y L R E I D D A D L L V E A I K T K K N
541 GGAAAAGCAGTGATCGTAGGAGGCGGATACATCGGGCTTGAATTGTCGGCTGCGCTGCGT
181 G K A V I V G G G Y I G L E L S A A L R
601 ATTAATAACATTGACGTTTTCCATGGTGTATCCCGAGCCCTGGTGTATGCCCGCTTATTC
201 I N N I D V S M V Y P E P W C M P R L F
661 ACTGCTGGTATCGCAGCTTTCTATGAGGGCTACTATGCGAATAAAGGGGTGAAAATCATC
221 T A G I A A F Y E G Y Y A N K G V K I I
721 AAGGGGACAGTCGCTGTGGGCTTACC CGCAGATGCAAATGGCGAAGTCAAAGAGGTAAAG
241 K G T V A V G F T A D A N G E V K E V K
781 TTAAAAGACGGCCGCGTATTGGAAGCGGATATCGTAGTAGTCGGGGTAGGGGGCGTCCA
261 L K D G R V L E A D I V V V G V G G R P
841 CTTATTTCAATTAGTAAAAGGTCAGTTAGAAGAGGAAAAAGGGGGCATTAAAACAGATGCG
281 L I S L V K G Q L E E E K G G I K T D A
901 TTTTTTAAGACATCTGTTCCAGATGTTTATGCTGTTGGTGATGTAGCGACCTTCCCGCTG
301 F F K T S V P D V Y A V G D V A T F P L
961 AAATTGTTCAATGAAATCCGTCGCGTTGAACACGTAGACCATGCGCGTAAGTCAGCAGAA
321 K L F N E I R R V E H V D H A R K S A E
1021 CAGGCGGTCAAAGCAATTAAGGCGTCCGAAGAAGGAAAGACGATCGACGAATACGACTAC
341 Q A V K A I K A S E E G K T I D E Y D Y
1081 TTGCCATTCTTCTACTCTCGTGCTTTCGATTTATCTTGGCAATTCTATGGGGACAACGTA
361 L P F F Y S R A F D L S W Q F Y G D N V
1141 GGGACACCGTTCTTTTTGGTGATGGAGATCCTGCTAGTGCAACACACAAATTCGGTACA
381 G D T V L F G D G D P A S A T H K F G T
1201 TATTGGATTAAGGACGGAAGGTAGTCGGTGTATTCTTGGAGTCCGGCACTCCTGAGGAA
401 Y W I K D G K V V G V F L E S G T P E E
1261 AATAAGGCGATTGCTAAGGTGGCCGTATCCAGCCCGCGTTGATGATTTAGATGTATTA
421N K A I A K V A R I Q P P V D D L D V L
1321 AGTAAAGAGGGTATCGCCTTTGCTAGTAAGATTTAA
441 S K E G I A F A S K I -

```

Figura 8. Gen sintético de MiMDHAR y secuencia aminoacídica. Los codones fueron optimizados para ser sobreexpresada en *E. coli*. La etiqueta de histidinas se muestra en el extremo amino terminal.

MiMDHAR	1	MA-ELLFKYVVIIGEGVAAGYAAEF	AKQGVNPGELATISKEAVAPYERPALS	KAYLFPEG																																																					
IbMDHAR	1	MA-GKSFKYVVIIGEDVAAGYAAEF	SKQGVKPGELATISKEAVAPYERPALS	KYLFPEG																																																					
OsMDHAR	1	MASEKHFKYVVIIGEGVAAGYAAEF	AKQGVKPGELATISKEAVAPYERPALS	KYLFPPQN																																																					
AtMDHAR	1	MA-EKSFKYVVIIGEGVSAGYAAEF	ANQGVQPGELAMISKEAVAPYERPALS	KYLFPEG																																																					
MiMDHAR	60	TARLPGFHV	CVGSGGERLLP	WYKEKGI	ELILSTEIVKVDL	SKLILVSAAGT	VFKYQILI																																																		
IbMDHAR	60	AARLPGFHV	CVGSGGERLLP	WYTEKGIS	LILSTEIVEADV	ASKLILSAAGET	FKYEVLI																																																		
OsMDHAR	61	AARLPGFHV	CVGSGGERLLP	WYSEKGI	ELILSTEIVKADL	ASKLILSAVGAT	FTYEILI																																																		
AtMDHAR	60	AARLPGFH	CVGSGGKLLP	SYKQKGI	ELILSTEIVKADL	SAKSLVSA	TGDVFKYQTLI																																																		
MiMDHAR	120	IATG	STVIRLDFGV	QGADAKN	IFYIREDDADL	LVEAIKTKKNG	KAVIVGGGYIGIELS																																																		
IbMDHAR	120	IATG	STVLRRLDFGV	QGADSKN	IFYIREDDADKL	VAAIKAKKNG	KAVVGGGYIGIELS																																																		
OsMDHAR	121	IATG	SSVIRLDFG	TQGADSN	ILYIREDDADKL	VAAIQAKKNG	KAVIVGGGYIGIELS																																																		
AtMDHAR	120	IATG	STVLRRLDFGV	KGADSKN	ILYIREDDADKL	VAAIKAKKNG	KAVVGGGYIGIELS																																																		
MiMDHAR	180	AALR	INNI	DVSMV	FE	PWCMER	LFTAGIAAFYEGYYANKGVKI	IKGT	VAVGFTAD	ANGEV																																															
IbMDHAR	180	AVLR	MNN	IDV	IMV	FE	PWCMER	LFTASIAAFYEGYYENKGVKI	IKGT	VAVGFDTH	NGEV																																														
OsMDHAR	181	AALK	IND	F	D	V	IMV	FE	PWCMER	LFTADIAAFYESYYTNKGVKI	IKGT	VAVGFDAD	ANGDV																																												
AtMDHAR	180	AVLR	IN	NLDV	IMV	FE	PWCMER	LFTADIAAFYETYYTNKGVKI	IKGT	VASGFTAQ	PNGEV																																														
MiMDHAR	240	KEV	KLK	DGRV	LEAD	I	VVGVGGR	PLTISL	VKQV	EE	KGGIKTDAFF	FKTSVP	DVYAV	GDVA																																											
IbMDHAR	240	KEV	KLK	DGRS	LEAD	I	VVGVGGR	PLTTL	FKQV	EE	KGGIKTDAFF	FKTSVP	GVYAV	GDV																																											
OsMDHAR	241	TAV	N	L	K	N	G	S	V	LEAD	I	V	G	V	G	R	PLT	T	L	F	K	Q	V	EE	K	G	G	I	K	T	D	A	F	F	E	T	S	V	P	G	V	Y	A	V	G	D	V										
AtMDHAR	240	KEV	Q	L	K	D	G	R	T	LEAD	I	V	V	G	V	G	R	PLT	S	L	F	K	Q	V	EE	K	G	G	I	K	T	D	A	F	F	FKTSVP	DVYAV	GDVA																			
MiMDHAR	300	TFP	K	L	F	N	E	I	R	R	V	E	H	V	D	H	A	R	K	S	A	E	Q	A	V	K	A	I	K	A	S	E	E	G	K	T	I	D	E	Y	D	L	P	E	Y	S	R	A	F	D	L	S	W	Q	F	Y	
IbMDHAR	300	TFP	L	K	L	Y	N	E	Q	R	R	V	E	H	V	D	H	A	R	K	S	A	E	Q	A	V	K	A	I	F	A	S	E	K	G	T	S	I	D	E	Y	D	L	P	E	Y	S	R	A	F	D	L	S	W	Q	F	Y
OsMDHAR	301	TFP	K	M	Y	N	E	L	R	R	V	E	H	V	D	H	A	R	K	S	A	E	Q	A	V	K	A	I	K	G	K	E	S	G	E	S	V	V	E	Y	D	L	P	E	Y	S	R	S	F	D	L	C	W	Q	F	Y	
AtMDHAR	300	TFP	K	M	Y	G	D	V	R	R	V	E	H	V	D	H	S	R	K	S	A	E	Q	A	V	K	A	I	K	A	E	G	G	A	A	V	E	Y	D	L	P	E	Y	S	R	S	F	D	L	S	W	Q	F	Y			
MiMDHAR	360	GDN	V	G	D	T	V	L	F	G	D	G	D	E	A	S	A	T	H	K	F	G	T	Y	W	I	K	D	G	K	V	G	V	F	L	E	S	G	T	P	E	N	K	A	L	A	K	V	A	R	I	Q	E	P	V	D	D
IbMDHAR	360	GDN	V	G	E	T	V	L	F	G	D	N	D	E	K	S	P	T	H	K	F	G	Q	Y	I	Q	N	G	K	V	G	A	F	L	E	S	G	T	P	E	N	K	A	L	A	K	V	A	R	V	Q	E	P	A	L	S	
OsMDHAR	361	GDN	V	G	D	T	I	L	F	G	D	S	D	F	T	S	A	K	P	R	F	G	S	Y	W	I	K	D	G	K	V	G	A	F	L	E	G	G	S	P	E	N	K	A	L	A	K	V	A	R	T	Q	E	P	P	V	A
AtMDHAR	360	GDN	V	G	D	S	V	L	F	G	D	S	N	F	S	N	P	K	P	R	F	G	A	Y	W	Q	G	K	V	G	A	F	M	E	G	G	S	G	E	N	K	A	L	A	K	V	A	R	E	S	A	E	S				
MiMDHAR	420	L	D	V	L	S	K	E	G	I	A	F	A	S	K	I																																									
IbMDHAR	420	L	D	E	M	A	N	Q	G	L	T	F	A	S	K	I																																									
OsMDHAR	421	L	E	E	L	K	K	E	G	L	Q	F	A	S	K	I																																									
AtMDHAR	420	L	E	L	V	K	Q	G	I	S	F	A	A	K	I																																										

Figura 9. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de múltiples MDHARs. El residuo catalítico Tyr que media la transferencia de electrones se encuentra resaltado por un cuadro color rojo. Los residuos que conforman el lazo único de MDHARs se presenta resaltado con un recuadro verde, y los residuos que conforman los domions FAD y NAD con recuadros naranja y azul, respectivamente. Los datos de las secuencias aminoacídicas utilizadas para el alineamiento son los siguientes: MiMDHAR de *Mangifera indica*; IbMDHAR de *Ipomea batatas* (UniProtKB code D2CGM8); OsMDHAR de *Oryza sativa* L. *japónica* (UniProtKB code Q652L6); AtMDHAR de *Arabidopsis thaliana* (UniProtKB code Q9LFA3).

6.2. Análisis Estructural de MiMDHAR

Se obtuvo un modelo estructural de la enzima MDHAR de mango, por homología mediante los servidores Phyre2 y SWISS-MODEL. Estos servidores utilizaron como templatado la estructura cristalina de la MDHAR de arroz (OsMDHAR) PDB: 5JCI y 5JCK respectivamente. La existencia de estas estructuras cristalográficas, reportadas por Park y col. en 2016, nos permitió obtener un modelo más preciso que aquellos modelos por homología obtenidos por otros autores. Tal es el caso de Huang y col. (2010) quienes utilizaron como templatado una putidaredoxin reductasa de *Pseudomonas putida*, que cuenta con un porcentaje de identidad de 29%. Sin embargo, aun teniendo la estructura cristalizada de OsMDHAR los servidores de predicción siguen mostrando una cobertura de alineamiento de hasta 98% con esas proteínas bacterianas y una confiabilidad del 100%. No obstante, estos valores no representan la precisión del modelo. Lo que nos lleva a comparar el porcentaje de identidad entre la secuencia y el templatado.

El porcentaje de identidad entre el modelo homólogo de MiMDHAR con el modelo cristalino de la OsMDHAR presenta un valor del 80%, lo cual es altamente preciso, mientras que el porcentaje con las reductasas bacterianas son menores o iguales a 29%. El modelo está conformado en su totalidad por 25% hélices alfa y 29% de hojas beta, valores proporcionados por el servidor Phyre2, así como 100% de confiabilidad y el 100% de modelación. Para el modelo obtenido por Swiss-MODEL se obtuvo un 80% de identidad, cobertura del 100%, así como valores para calidad de estimación global del modelo (GMQE) de 0.95, representando la exactitud del modelo. También QMEAN de 0.57. En la figura 10 panel A, se muestra el modelo obtenido de MiMDHAR, donde se observan los extremos N-terminal, C-terminal, así como el lazo distintivo de MDHAR. Adicionalmente, se realizó una sobreposición de la estructura cristalina de OsMDHAR 5JCI y el modelo homólogo MiMDHAR obtenido con dicho templatado (figura 10 panel B), donde se obtuvieron valores de 0.228 de distancia media cuadrática mínima (RMSD) y 409 aminoácidos sobrepuestos. Por otra parte con el modelo OsMDHAR 5JCK y el

modelo homólogo obtenido con dicho templado, se obtienen valores de 0.066 de RMSD y 417 aminoácidos se sobreponen.

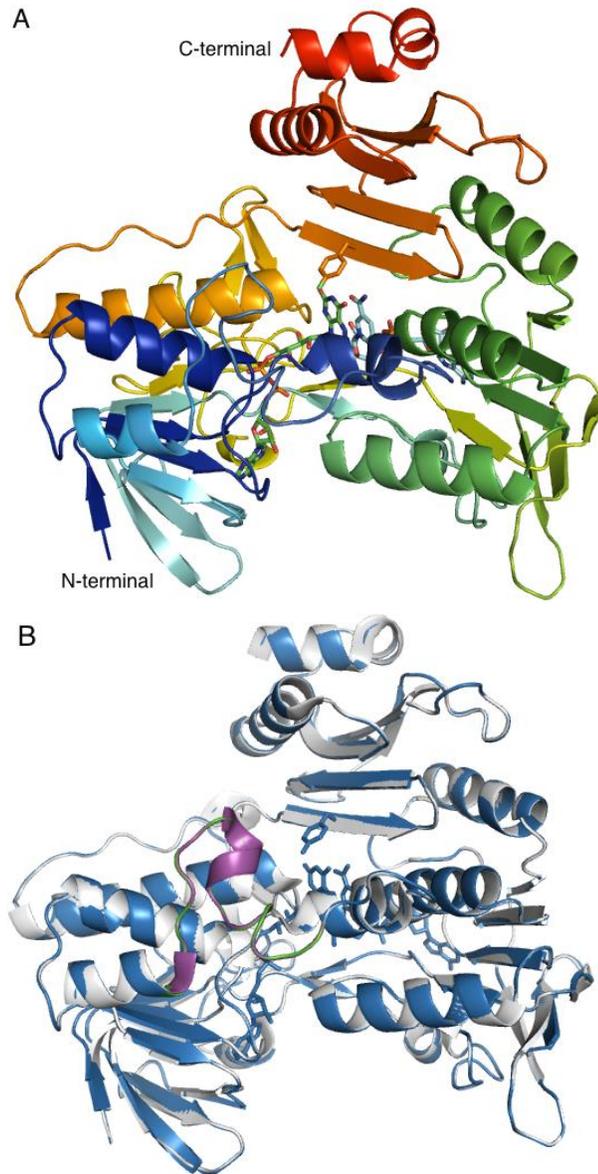


Figura 10. Modelo estructural de MDHAR de mango realizado por homología a la estructura cristalizada de la MDHAR de arroz (OsMDHAR) (PDB: 5JCI). A: El modelo está representado en forma de listón mostrando de azul el extremo N-terminal y en rojo el extremo C-terminal. B: Sobreposición del modelo cristalino OsMDHAR (blanco) y modelo homólogo MiMDHAR (azul), el lazo se muestra de color magenta y verde, respectivamente.

Al modelo estructural de MiMDHAR obtenido en Phyre2 con el templado 5JCI se le añadieron los sustratos FAD, NAD, así como el producto final, siendo el AA conforme a la posición que se muestra en la estructura cristalina de la OsMDHAR (PDB # 5JCN). Al añadir estos sustratos y analizar los residuos que conforman cada dominio conforme a lo descrito por Park y col. (2016) se puede corroborar que dichos residuos altamente conservados ayudan al posicionamiento de los cofactores y sustrato. Referente al sitio de unión FAD, los residuos que participan en MiMDHAR son Gly12, Gly14, Lys39, Arg47, Pro48, Lys52, Ala121, Thr122, Arg146, Glu147, Gly296, Asp297 y Ala318 (Figura 11), por otro lado, se generó un diagrama de las interacciones entre los residuos (ligplot (Laskowski *et al.*, 2011) de la cavidad y el cofactor mostrándose en la figura 12.

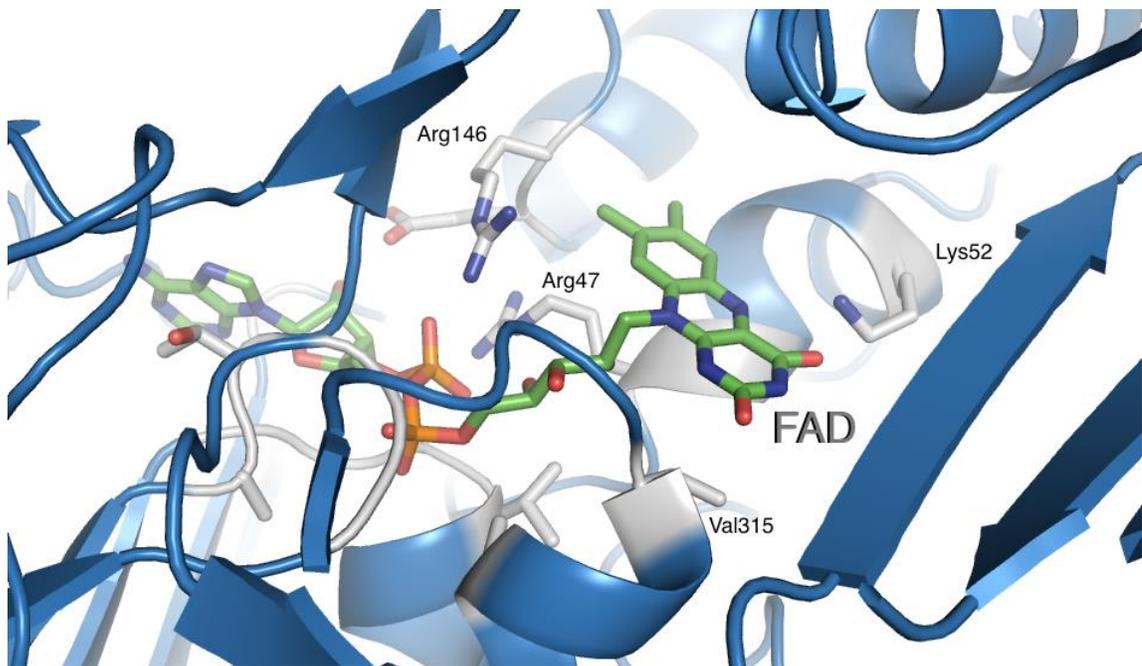


Figura 11. Visualización del dominio de unión al FAD. El modelo teórico de MiMDHAR de color Azul. El FAD se encuentra representado en forma de barras y coloreado por tipo de átomos (carbono en verde, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo, fósforo en naranja). Algunos de los residuos que conforman la hendidura de unión al FAD se visualizan en cilindro y coloreado por tipo de átomos en un patrón distinto al FAD (carbono blanco, nitrógeno azul, oxígeno rojo).

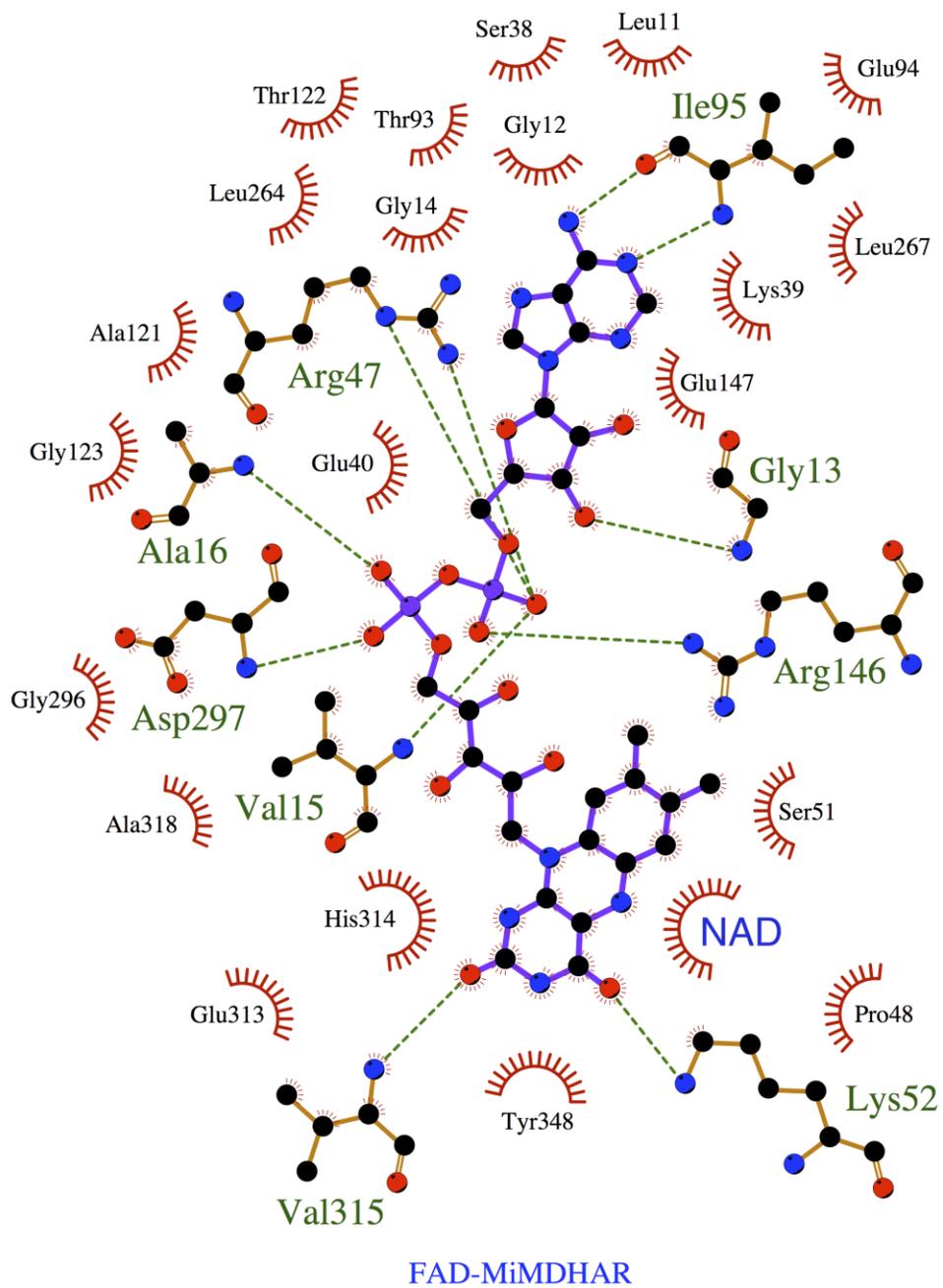


Figura 12. Diagrama de interacciones del dominio FAD y su cofactor. Con etiqueta verde los residuos que conforman la red de puentes de hidrógeno. Con etiqueta negra los residuos formando interacciones hidrofóbicas y de azul el cofactor NAD.

Los residuos del sitio de unión al NAD se identificaron como la Tyr173, Glu177, Glu195, Arg201, Glu313, His314 y Phe347 (Figura 13). Sin embargo, el residuo Tyr173 en el modelo homólogo de MiMDHAR obtenido con el templado de la estructura 5JCI, se encuentra en conflicto con uno de los anillos del NAD. No obstante, éste al ser un modelo teórico y no uno obtenido de manera experimental nos deja en duda de cómo los residuos se encuentran realmente ordenados en el espacio. Por otro lado, nos deja pensar si al momento de interactuar el NADH en su hendidura ocurriese un cambio conformacional permitiendo una correcta interacción entre cofactor y sustrato con la proteína. A su vez en este modelo teórico se pueden observar como otros residuos pueden ayudar en el balance del NAD, como podría ser el caso de Phe132 y Ser349.

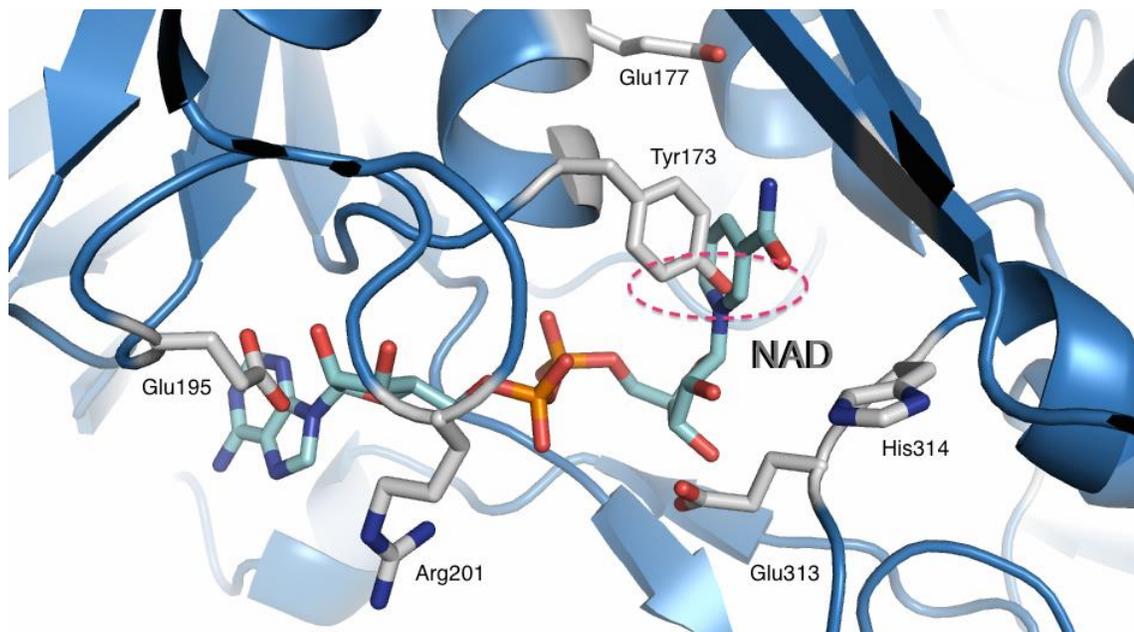


Figura 13. Visualización del dominio de unión al NAD del modelo obtenido con templado 5JCI. El modelo teórico de MiMDHAR de color Azul. El NAD se encuentra representado en forma de barras y coloreado por tipo de átomos (carbono en cian, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo, fósforo en naranja). Algunos de los residuos que conformar la cavidad de unión al NAD se visualizan en cilindro y coloreado por tipo de átomos en un patrón distinto al NAD (carbono blanco, nitrógeno azul, oxígeno rojo). Encerrado en un círculo punteado de rojo la colisión entre Tyr173 y el anillo NAD.

Por otro lado, con el modelo obtenido en el servidor SWISS-Model, utilizando como templado la estructura 5JCK. Por otro lado, se observa cómo hay un cambio

conformacional en 3 residuos, de los cuales la Tyr 173 está en conflicto con el NADH en el modelo obtenido con el templado 5JCI; sin embargo en el nuevo modelo (utilizando 5JCK como templado) se encuentra en una posición donde no hay una colisión entre el anillo del cofactor y el aminoácido (Figura 14). Adicionalmente, se presenta el diagrama de interacciones de los residuos (ligplot) (Laskowski *et al.*, 2011) de la cavidad NAD con cofactor NAD en la figura 15.

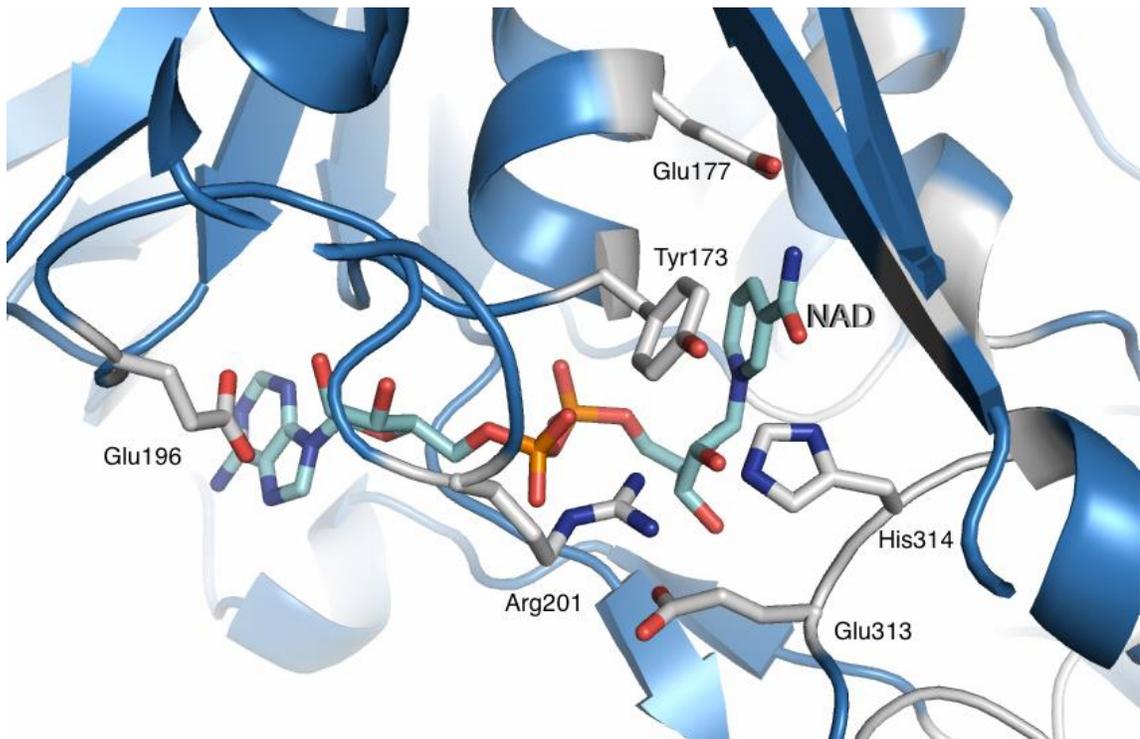


Figura 14. Visualización del dominio de unión al NAD del modelo obtenido con templado 5JCK. El modelo teórico de MiMDHAR de color azul. El NAD se encuentra representado en forma de barras y coloreado por tipo de átomos (carbono en cian, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo, fósforo en naranja). Algunos de los residuos que conforman la cavidad de unión al NAD se visualizan en barras y coloreado por tipo de átomos en un patrón distinto al NAD (carbono blanco, nitrógeno azul, oxígeno rojo).

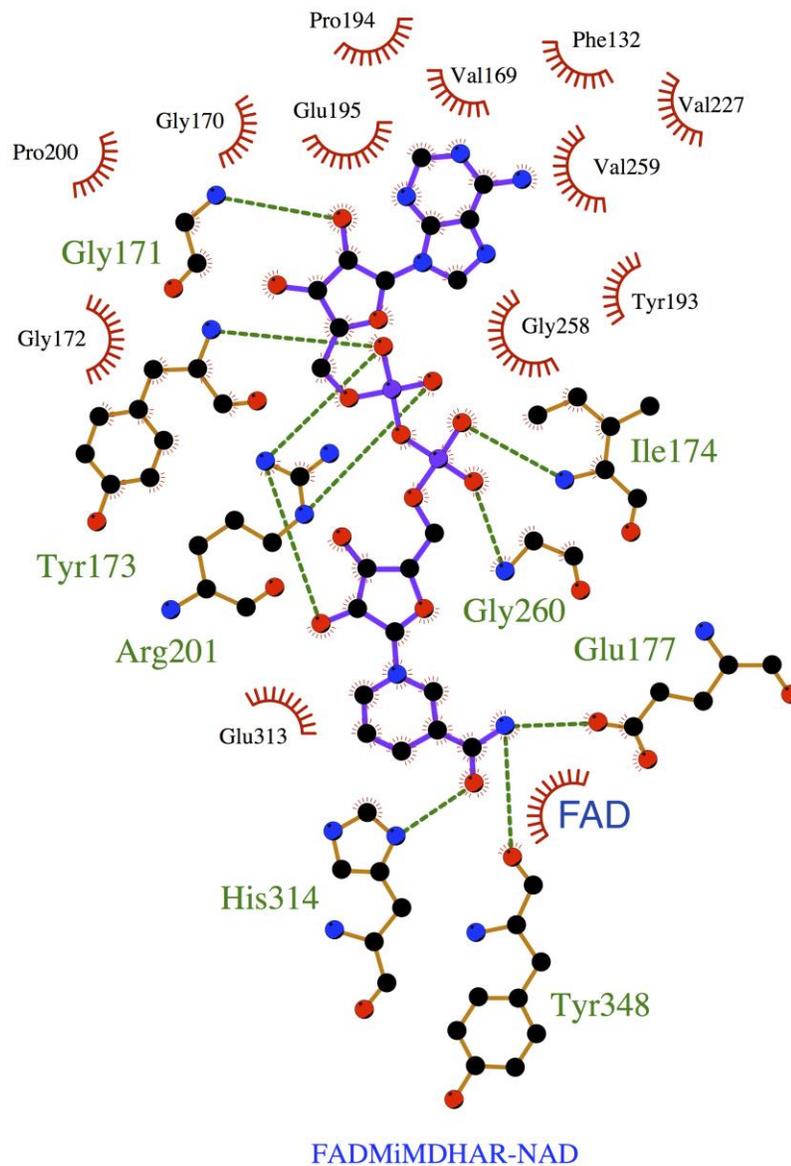


Figura 15. Diagrama de interacciones del dominio NAD y su cofactor. Con etiqueta verde los residuos que conforman la red de puentes de hidrógeno. Con etiqueta negra los residuos formando interacciones hidrofóbicas y de azul el cofactor FAD.

Park y col. (2016) proponían, en el caso de la OsMDHAR que una Tyr349 llevaba a cabo la actividad catalítica junto a el residuo Arg320, y después de obtener la estructura cristalina con el producto final AA, observaron que efectivamente esa Tyr ayudaba en la reducción del monodehidroascorbato, y la Arg320 ayudaba en el acomodo del sustrato

para su conversión a AA. Ellos corroboraron esto al obtener mutantes de MDHAR cambiando el residuo Tyr por Ala, Phe y Trp, y al medir su actividad enzimática, ésta disminuyó en valores menores al 10%, mientras que para la Arg320 la mutaron a Ala obteniendo un valor de actividad menor del 30%. En el modelo homólogo de MiMDHAR se muestra que efectivamente se puede esperar una interacción entre el residuo Tyr348 y el sustrato monodehidroascorbato, así como la presencia de la Arg319 ayudando en su posicionamiento al producto final AA. A su vez, los residuos Lys52 y Val315, que se espera lleven a cabo la estabilización de FAD en la transferencia de electrones, se encuentran cercanos a este al FAD (Figura 16).

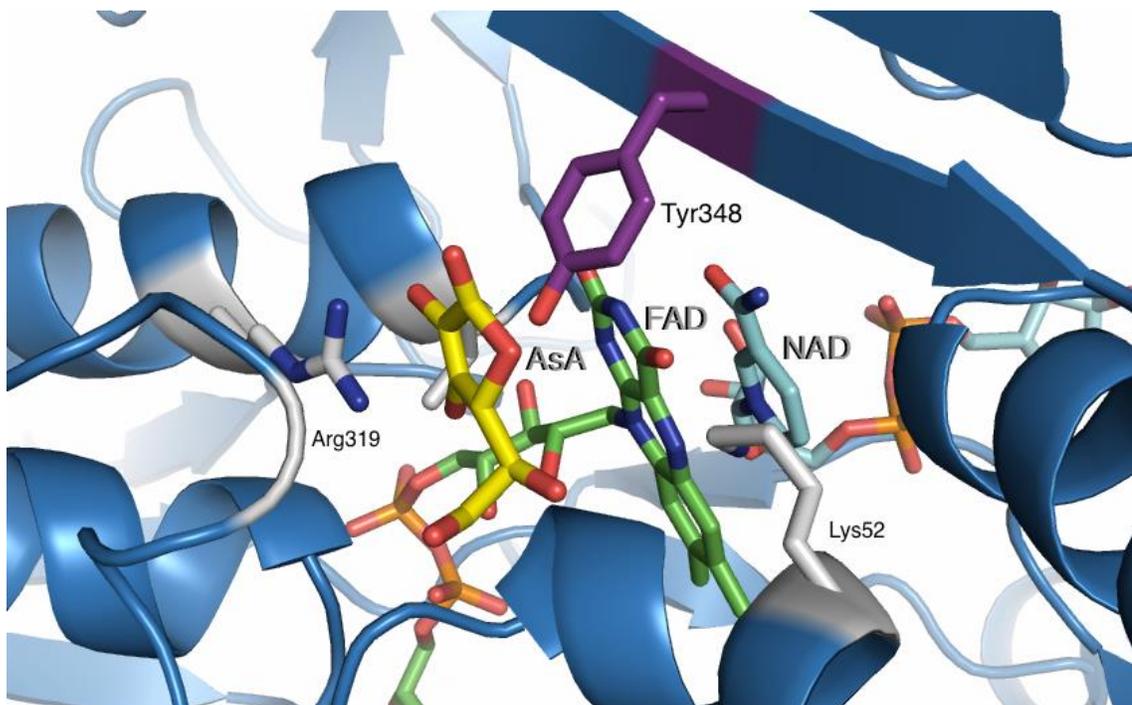


Figura 16. Visualización del residuo catalítico. El residuo catalítico Tyr348 de color morado, el producto final AA de color amarillo. Los residuos Lys52 y Val315 que estabilizan la transferencia de electrones de FAD a Tyr348 coloreados por átomos (carbono blanco, nitrógeno azul, oxígeno rojo), así como la Arg319 que ayuda a la estabilización del AA. El NAD se encuentra representado en forma de cilindro y coloreado por tipo de átomos (carbono en cian, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo, fósforo en naranja). El FAD se encuentra representado en forma de cilindro y coloreado por tipo de átomos (carbono en verde, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo, fósforo en naranja).

6.3. Sobreexpresión Heteróloga de MDHAR

La sobreexpresión de MiMDHAR se llevó a cabo en cepas de *E. coli* Gold BL21 (DE3), obteniéndose la proteína de manera soluble, la cual se muestra en la figura 17, como una banda de aproximadamente 45 kDa. Esto se debe a que la secuencia que codifica para una MDHAR, que corresponde a un peso molecular de 46.98 kDa, se le adicionó una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal, datos similares se han reportado por Do y col. (2014). Se observa un aumento en la sobreexpresión conforme transcurre el tiempo después de llevar a cabo la inducción con 0.1 mM de IPTG. Con base al monitoreo de la sobreexpresión desde el tiempo 0 (T0) hasta las 24 horas (T24), se seleccionó un tiempo de 16 horas para llevar a cabo la sobreexpresión de la MiMDHAR y recuperar la biomasa.

Datos similares se han reportado por otros autores, tal es el caso de Do y col. (2014) quienes sobreexpresaron la OsMDHAR en cepas *E. coli* NiCo21 (DE3) con 0.2 mM IPTG durante 20 horas. A su vez Huang y col. (2012) sobreexpresaron una IbMDHAR en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, utilizando una concentración final de IPTG de 0.5 mM durante 20 horas.

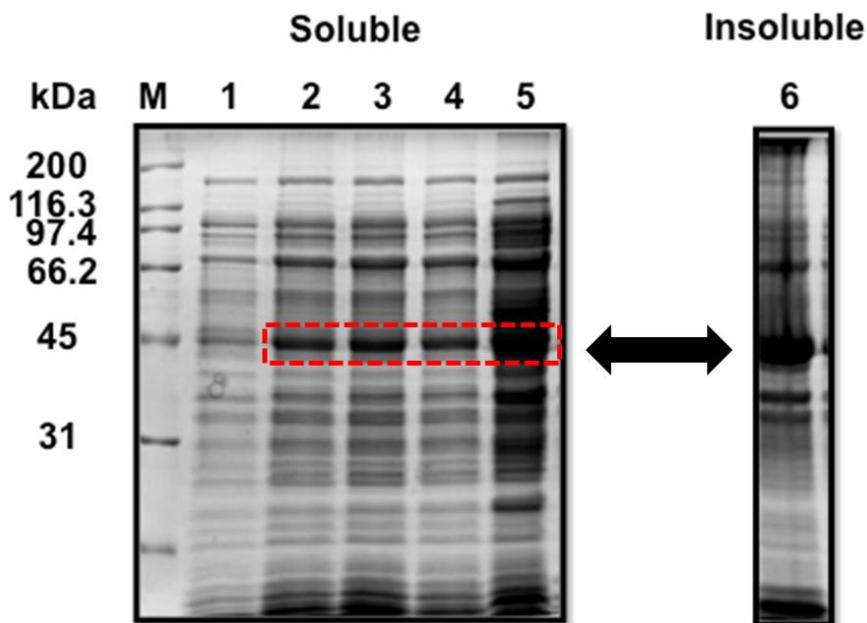


Figura 17. Perfil electroforético de la sobreexpresión de MiMDHAR. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Carril M, Marcador de peso molecular, Carril 1, 2, 3, 4 y 5 fracción soluble del cultivo inducido con 0.1 mM IPTG en los tiempos 0, 2, 4, 6 y 24 horas. Carril 7 fracción insoluble de cultivo inducido con 0.1 mM IPTG en el tiempo de 6 horas.

6.4. Purificación de MiMDHAR

La proteína MiMDHAR se obtuvo de manera pura a partir de la cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, como se muestra en la figura 18 con tinción azul de Coomassie y en la figura 19 en tinción con plata las fracciones puras de la cromatografía, este tipo de purificación ya ha sido utilizado para otras MDHARs como se reporta en el trabajo de Huang y col. (2010). Las fracciones puras se mezclaron y concentraron a 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para realizar los experimentos correspondientes.

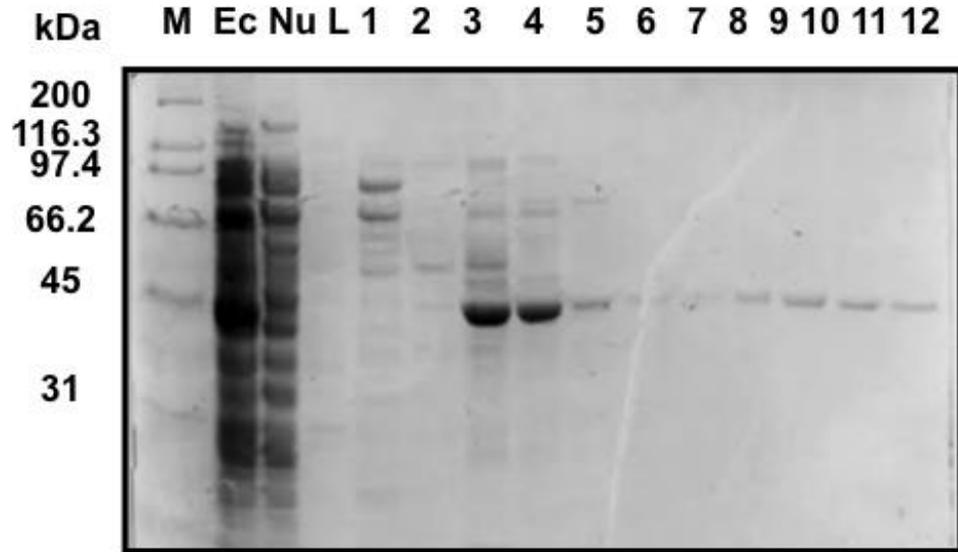


Figura 18. Perfil electroforético de la purificación de MiMDHAR por medio de IMAC. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie, Carril M (Marcador de peso molecular), EC (Extracto crudo), Nu (proteína no unida), Lav (lavado con buffer de unión), 1, 2, 3, 4, 5, 6 (fracciones no puras), 7, 8, 9, 10, 11 y 12 (fracciones puras de MiMDHAR). En el gel se observa la banda de aproximadamente 49 kDa que corresponde a MiMDHAR.

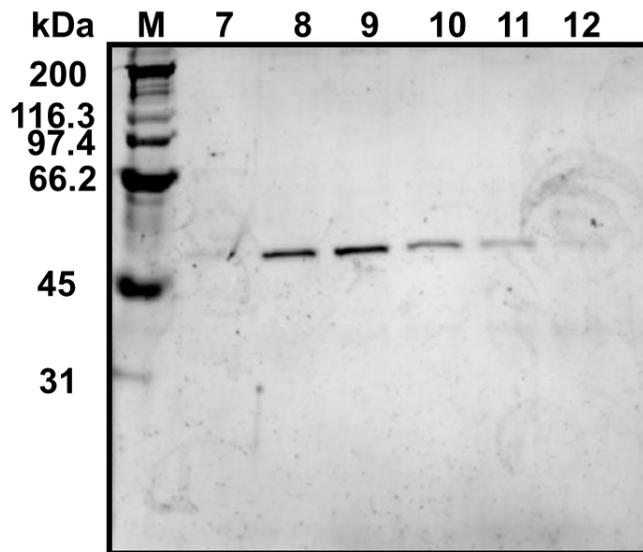


Figura 19. Perfil electroforético de las fracciones puras de MiMDHAR por medio de IMAC. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% teñido con plata, Carril M (Marcador de peso molecular), 7, 8, 9, 10, 11 y 12 (fracciones puras de MiMDHAR). En el gel se observa la banda de aproximadamente 49 kDa que corresponde a MiMDHAR.

6.5. Determinación del Estado Oligomérico

Por medio de la cromatografía de exclusión molecular se logró determinar la estructura cuaternaria de la MiMDHAR, siendo una MDHAR monomérica, de acuerdo con el pico en la elución, que al compararse con la curva estándar refleja un peso molecular de 48.97 kDa (Figura 20). Este resultado concuerda con lo obtenido por Dalton y col. (1992) quienes reportan dos MDHARs de nódulos de soja con una conformación monomérica y un peso molecular de 39 y 40 kDa, mientras que Park y col. (2016) reportan una MDHAR de arroz monomérica y un peso molecular de 45 kDa incluyendo la etiqueta de histidinas.

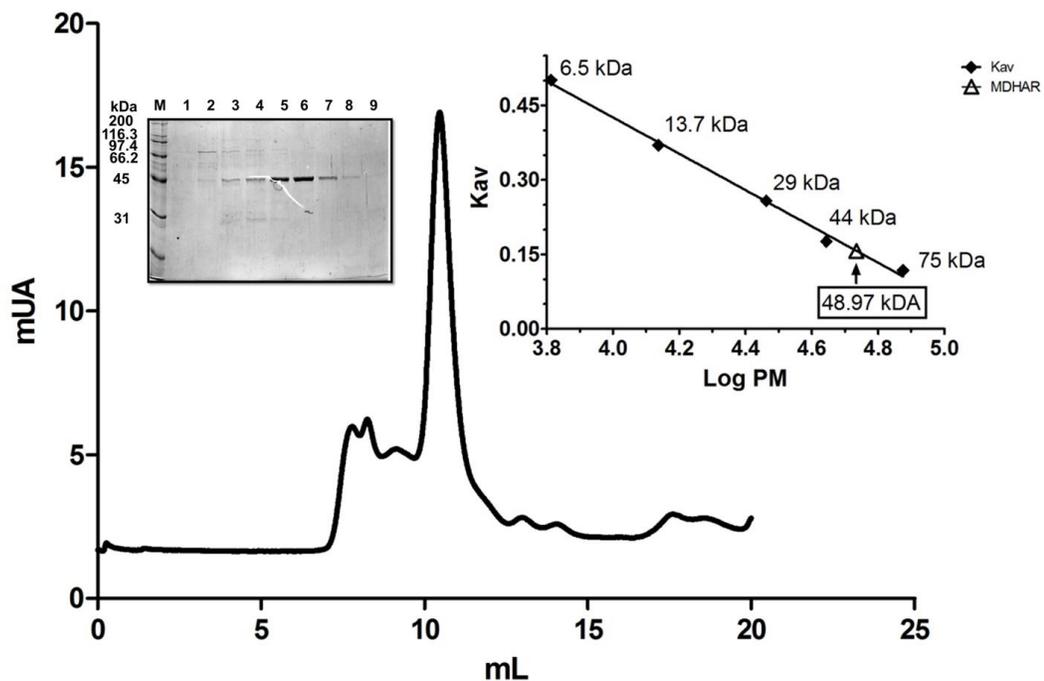


Figura 20. Cromatografía de exclusión molecular de MiMDHAR. Cromatograma donde se muestra el pico de elución indicando un estado oligomérico de monómero, así como su localización en la curva de estándares generada por los siguientes estándares: Conalbúmina (75.0 kDa), Ovoalbúmina (44.0 kDa), Anhidrasa Carbónica (29.0 kDa), Ribonucleasa A (13.7 kDa), Aprotinina (6.5 kDa).

6.6. Determinación de la Actividad Enzimática

Para llevar a cabo la determinación de la actividad enzimática se siguió la metodología descrita por Hossain y col. (1984), midiendo la oxidación de NADH a una longitud de onda de 340 nm, donde experimentalmente se obtuvieron pendientes negativas ya que se monitorea la desaparición del cofactor. Las pendientes de las gráficas de actividad, fueron utilizadas como valor absoluto para el cálculo de la actividad enzimática de la MiMDHAR. Siguiendo las ecuaciones descritas en la metodología, la MiMDHAR ante condiciones estándar a 25 °C se obtuvieron valores de actividad específica como se muestra en la table 1.

Tabla 1. Comparación de actividad específica en U/mg de proteína de diferentes plantas modelos de estudios.

Modelo de Estudio	Actividad específica (U/ mg de proteína)	Referencia
MiMDHAR (<i>Mangifera indica</i> L.)	537.78 ± 161.26	Este estudio
OsMDHAR (<i>Oriza sativa</i>)	380	Do <i>et al.</i> , 2014
AmMDHAR (<i>Avicennia marina</i>)	225	Kavitha <i>et al.</i> , 2010
PpMDHAR 1,2 y 3 (<i>Physcomitrella patens</i>)	152, 170 y 164	Drew <i>et al.</i> , 2007
SoMDHAR isoforma del cloroplasto (<i>Spinacea oleracea</i>)	100	Sano <i>et al.</i> , 2005
CsMDHAR (<i>Cucumis sativus</i>)	176	Sano <i>et al.</i> , 1995
PsMDHAR (<i>Pisum sativum</i>)	312	Murthy y Zilinskas 1994
MDHAR de nódulos de soya 1 y 2 (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	214 y 288	Dalton <i>et al.</i> , 1992
CsMDHAR (<i>Cucumis sativus</i>)	256	Hossain y Asada 1985

Como se puede observar en la tabla 1, la MiMDHAR al ser comparada con otras MDHARs ya estudiadas se coloca como una de las enzimas con mayor actividad específica entre los modelos estudiados. Adicionalmente a la obtención de la actividad enzimática de la MiMDHAR, se realizó un barrido de luz ultravioleta-visible (UV-Vis) detectando la presencia del cofactor FAD observándose un aumento en la absorbancia a 376 y 450 nm como reportan Hossain y Asada en 1985 así como un hombro derecho sobresaliente en la absorbancia de 470-475 nm como reportan Drew y col. (2007) (figura 21). El cofactor FAD permite a la MDHAR llevar a cabo la transferencia de electrones del NADH hasta el residuo catalítico, de tal modo reduciendo el sustrato monodehidroascorbato generando a AA.

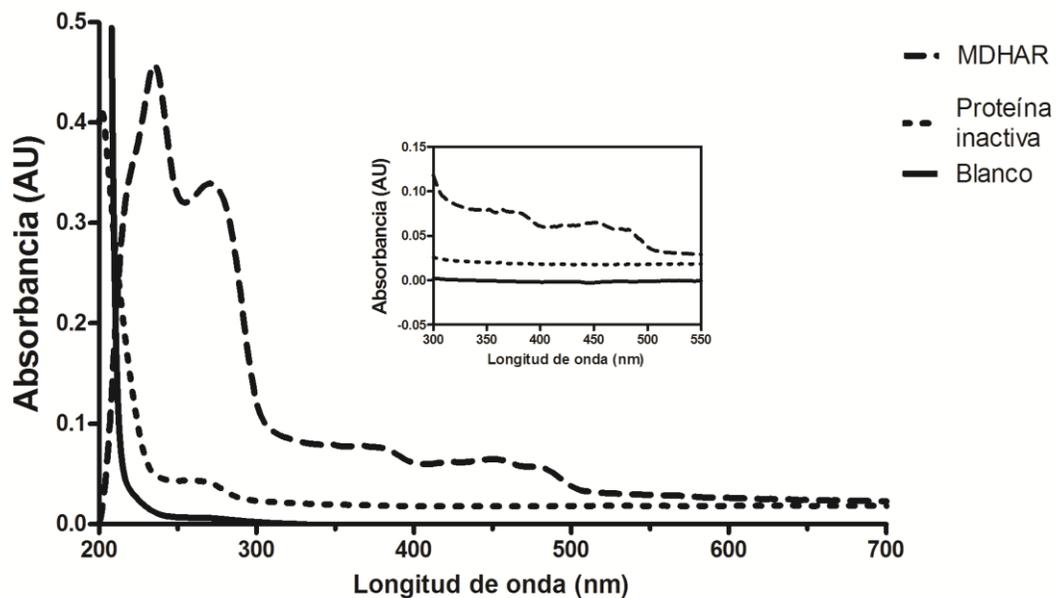


Figura 21. Barrido de luz UV-Vis. Espectro UV de MiMDHAR purificada, se observa la presencia del cofactor FAD se siguió la absorbancia en una solución fosfato de potasio 100 mM, fosfato de sodio 4 mM y EDTA 0.5 mM, pH 7.2; espectro UV de proteína inactiva; espectro UV de blanco.

6.7. Determinación de las Constantes Cinéticas de MiMDHAR

Para la determinación de las constantes cinéticas K_m y V_{max} del monodehidroacorbato se varió la concentración de ácido ascórbico desde 0.01 a 5 mM y se llevó a cabo el ajuste no lineal (Figura 22), obteniéndose una V_{max} de 44.4 $\mu\text{M}/\text{min}$ y su K_m de 148 μM y una k_{cat} igual a 540 min^{-1} . También se muestra el ajuste de los datos mediante una regresión lineal de acuerdo con el método de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, el cual es obtenido por la división de 1 entre las velocidades iniciales, así como la división de 1 entre la concentración del sustrato.

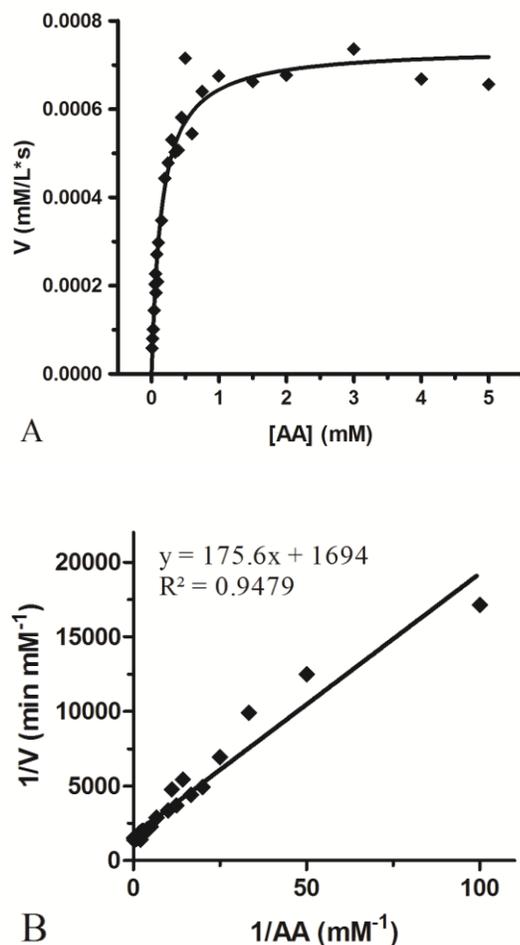


Figura 22. Ajuste de cinética de Michaelis-Menten y gráfico de Lineweaver-Burk del ácido ascórbico. A: Ajuste no lineal graficando la concentración de ácido ascórbico contra las velocidades en eje. B: Ajuste de Lineweaver-Burk mostrando el inverso de la concentración de ácido ascórbico contra el inverso de la velocidad.

Por otro lado, al modificar las concentraciones de NADH de 0.025 a 0.2 mM, se observó que los datos se ajustaban a una reacción de orden cero, y los valores obtenidos se encontraban en los de saturación. Así mismo se observó una alta dispersión de las pendientes como se observa en la figura 23. Al disminuir la concentración de NADH (< 0.025 mM) no se detectó actividad enzimática, ya que se sobrepasó el límite de detección del equipo. Se modificaron también las concentraciones de proteína en la reacción en un rango de 4 μ g a 8 μ g, sin embargo, se observó el mismo resultado. Al resultar una reacción de orden cero esto nos indica que el NADH no forma parte del sitio catalítico, lo cual es

correcto, ya que la acción de éste en la actividad de la proteína es transferir sus electrones al FAD quien posteriormente los transfiere al aminoácido catalítico reduciendo el monodehidroascorbato a AA. Por lo anterior, no fue posible obtener los valores de las constantes cinéticas para el NADH, de tal modo que no se pudo comparar cuan afín es la proteína por dicho cofactor y comparar contra las otras MDHARs.

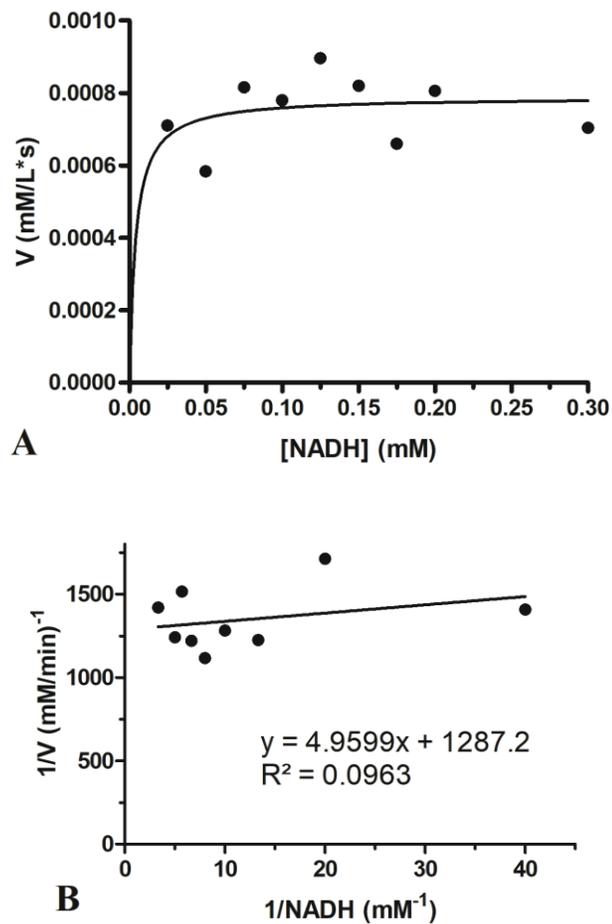


Figura 23. Ajuste de cinética de Michaelis-Menten y gráfico de Lineweaver-Burk del NADH. A: Ajuste no lineal graficando la concentración de NADH contra las velocidades. B: Ajuste de Lineweaver-Burk mostrando el inverso de la concentración de NADH contra el inverso de la velocidad.

6.8. Efecto de la Temperatura y pH sobre la Actividad Enzimática de MiMDHAR

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la MiMDHAR se muestra en la figura 24, en la cual se plasma la actividad residual en porcentaje contra la temperatura de incubación.

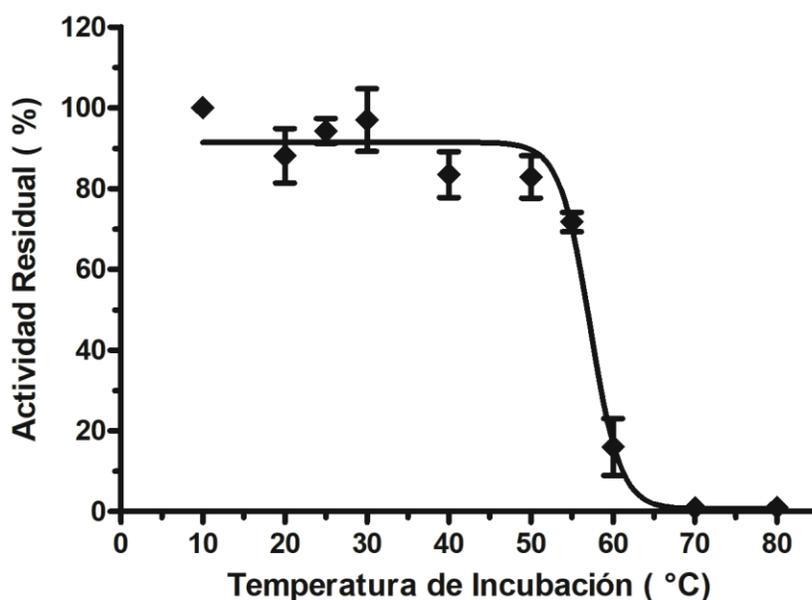


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de MiMDHAR. Representando un experimento con sus tres replicas expresado en porcentaje de actividad residual contra la temperatura de incubación.

Se observó que la MiMDHAR se mantiene estable a las temperaturas que van en un rango de 10 hasta 50°C durante los 15 minutos de incubación. Posteriormente, se observa que la actividad residual decae a un 70 % a los 55°C. Este comportamiento se mantiene, ya que al aumentar la temperatura a 60°C la enzima pierde un 85% de su actividad. Así mismo, se realizó un ajuste conforme a la ecuación sigmoide de Boltzmann para obtener la temperatura media de desnaturalización (T_m), resultando de 57.19°C y considerándose que a esta temperatura la proteína se encuentra parcialmente inactiva. Adicionalmente se

realizó un ensayo de estabilidad a la temperatura del tratamiento hidrotérmico (46.1 °C) durante 2 horas, mostrado en anexos. Por otro lado, Huang y col. (2010) siguieron el efecto térmico sobre IbMDHAR a una temperatura de 70 °C durante 2, 4, 8 y 16 minutos, reportando su temperatura media de desnaturalización a los 12.4 minutos. Sin embargo, después de los 15 minutos ésta se inactiva, mostrando resultados similares a los obtenidos en este estudio.

La estabilidad a la temperatura en la MiMDHAR se puede deber a diversos factores como es la hidrofobicidad (Kumar *et al.*, 2000), ésta constituye la fuerza primordial para el plegamiento de las proteínas. En el caso de las cavidades de unión al FAD y NAD, cuando estos se encuentran interactuando con la proteína hay una alta cantidad de interacciones hidrofóbicas, las cuales pueden ayudar en mantener la interacción entre los cofactores, así como la presencia de puentes de hidrógeno que contribuyen a la rigidez estructural (Pucci *et al.*, 2017).

También, Kumar y col. (2000) mencionan posibles roles de los residuos Arg, Tyr y Ser, específicamente Arg y Tyr debido a sus cadenas laterales las cuales sirven para interacciones de largo y corto alcance. Estos mismos residuos se han observado en sitios de interacción, por lo que se les ha atribuido un rol en el plegamiento y unión a altas temperaturas, así como una contribución a la estabilidad de proteínas. En el caso de la MiMDHAR, conforme al modelo homólogo predicho, se espera que la Tyr348 realice la catálisis de monodehidroascorbato a ácido ascórbico y la Arg319 intervenga en su acomodo en la cavidad catalítica.

A su vez, se ha visto que la estabilidad también se encuentra relacionada con la presencia de α hélices (Petukhov *et al.*, 1997), esta razón podría también explicar que la MiMDHAR se mantenga estable a las temperaturas de 55 °C, ya que las cavidades de unión de FAD y NAD se encuentran rodeadas por 4 y 3 hélices respectivamente.

Por otra parte, el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la MiMDHAR, se muestra en la figura 25.

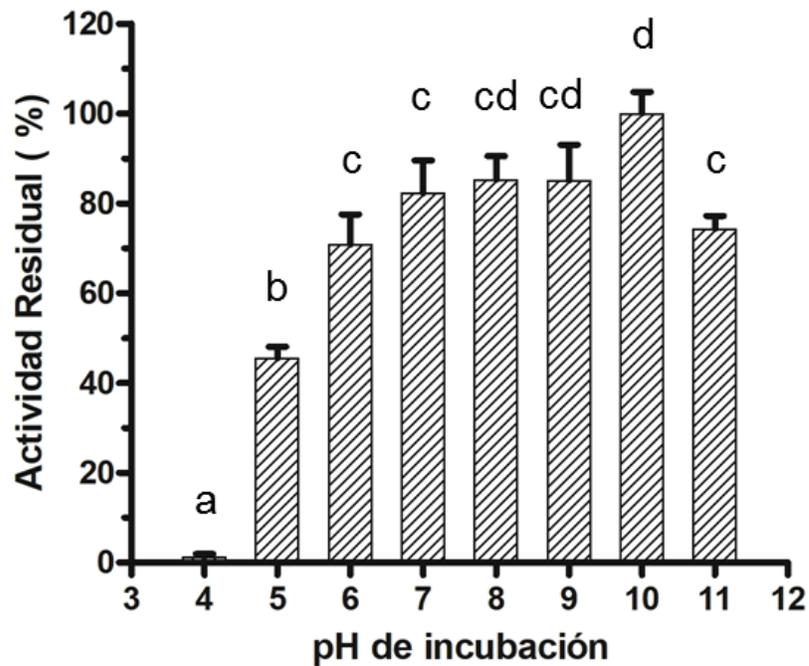


Figura 25. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de MiMDHAR. Representando la media \pm desviación estándar de un experimento con sus tres replicas expresado en porcentaje de actividad residual contra el pH de incubación. Literales diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer.

Como se puede observar, la MiMDHAR se mantuvo estable en un amplio rango que va desde el pH 5.0 a 11.0, siendo el pH 10.0 donde presentó el máximo de su actividad residual (100%), sin embargo, este pH no presenta una diferencia significativa entre el pH 8.0 y 9.0. Por otro lado, los pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 11.0, no presentaron diferencias significativas entre su actividad residual, lo cual reafirma su estabilidad en ese rango de pH. A pH 5.0 la enzima pierde aproximadamente un 55% de su actividad, presentando una diferencia significativa ante todos los pH probados, no obstante, aún mantiene su actividad, mientras que pH 4.0 la enzima se encontró completamente inactiva, siendo diferente a todos los pH probados. Resultados similares se han reportado conforme al rango de estabilidad, no obstante, estos abarcan el rango de 6.0 a 10.0 como el que reporta Huang y col. (2010). Sin embargo, en el caso la IbMDHAR el pH 4.0 aún se mantuvo activa mientras que en la MiMDHAR no, pero, a pH 11.0 la MiMDHAR conserva un 70% de actividad cuando la IbMDHAR se encuentra inactiva. Por otro lado, Dalton y col.

(1992) reportan que la MDHAR de nódulos de soya su mayor actividad se encuentra en un rango de pH de 8.0 a 9.0.

7. CONCLUSIONES

La monodehidroascorbato reductasa de mango (MiMDHAR) mostró ser estable a altas temperaturas (55°C) cuando fue incubada por 15 min, manteniendo un 70% de su actividad comparado con el máximo de actividad obtenido a los 10 °C. Así mismo, la MiMDHAR es estable en un rango pH de 5.0 - 11.0, mostrando la mayor actividad a pH 10.0 y a pH 11.0 manteniendo una actividad residual de 70% demostrando cierta resistencia a pH alcalino.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda obtener cristales de la MiMDHAR para determinar la estructura y poder determinar lo que se expone en los resultados del modelo homólogo.
- Para tener aproximaciones para la determinación de las concentraciones del NADH se recomienda modificar la concentración de AA disminuyéndolo, ya que es la variable que no se modificó, con esto se espera lograr ver un comportamiento del tipo Michaelis-Menten.

9. ANEXO

Ensayo de Estabilidad a la Temperatura del Tratamiento Cuarentenario (Hidrotérmico) (46.1 °C)

La proteína MiMDHAR se incubó a 46.1 °C durante un intervalo de 2 h. Se realizó la medición de actividad enzimática en intervalos de 10 min conforme al ensayo estándar descrito en materiales y métodos.

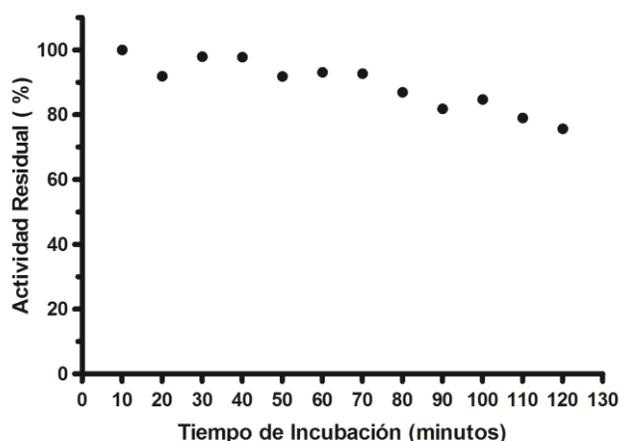


Figura 26. Efecto de la temperatura del tratamiento hidrotérmico sobre la actividad de la MiMDHAR.

Se puede observar en la gráfica como la actividad de la MiMDHAR aún después de 2 h a temperatura de 46.1 °C, mantiene un 80% de su actividad, lo cual confirma su estabilidad a altas temperaturas. Lo anterior sugiere que podría mantenerse en su forma activa durante el periodo en que se sumerge el fruto de mango para la eliminación de la mosca de la fruta durante el tratamiento hidrotérmico.

10. REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arrigoni, O., De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1569(1-3): 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00235-5)
- Arrigoni, O., Dipierro, S., Borraccino, G. (1981). Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters* 125(2): 242-244. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80729-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80729-6)
- Bath, R., Singh, K., Kumari, S., Mustafiz, A. (2017). Transcript Profiling Reveals the Presence of Abiotic Stress and Developmental Stage Specific Ascorbate Oxidase Genes in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00198>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. New Jersey, USA. Wiley Blackwell. 2nd edition.
- Conklin, P. L. (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24(4): 383-394. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00686.x>
- Dalton, D. A., Langeberg, L., Robbins, M. (1992). Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(1): 281-286. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90080-G](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90080-G)
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Muhlia-Almazán, A., Rivera-Domínguez, M., Casas-Flores, S., ... Islas-Osuna, M. A. (2018). Mesocarp RNA-Seq analysis of mango (*Mangifera indica* L.) identify quarantine postharvest treatment effects on gene expression. *Scientia Horticulturae* 227: 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.031>
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Pacheco-Sanchez, M. A., Casas-Flores, S., Sanchez-Flores, A., ... Islas-Osuna, M. A. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00062>
- Davey, M. W., Montagu, M. Van, Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., ... Fletcher, J. (2000). Review Plant L -ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(7): 825-860. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6)

- Do, H., Kim, I.-S., Kim, Y.-S., Shin, S.-Y., Kim, J.-J., Mok, J.-E., Kim, H.-W. (2014). Purification, characterization and preliminary X-ray crystallographic studies of monodehydroascorbate reductase from *Oryza sativa* L. *japonica*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 70(9): 1244-1248. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14015908>
- Drew, D. P., Lunde, C., Lahnstein, J., Fincher, G. B. (2007). Heterologous expression of cDNAs encoding monodehydroascorbate reductases from the moss, *Physcomitrella patens* and characterization of the expressed enzymes. *Planta* 225(4): 945-954. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0394-x>
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Tanaka, K. (2007). Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225(5): 1255-1264. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0417-7>
- Eltelib, H. A., Badejo, A. A., Fujikawa, Y., Esaka, M. (2011). Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology* 168(6): 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.09.003>
- [FAO.][Food and Agriculture Organization of the United Nations][Trade] [Crops and livestock products] [Latest update: 11/May/2016.] [(Accessed [05/February/2018].] [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>].
- Feng, H., Wang, X., Zhang, Q., Fu, Y., Feng, C., Wang, B., Kang, Z. (2014). Monodehydroascorbate reductase gene, regulated by the wheat PN-2013 miRNA, contributes to adult wheat plant resistance to stripe rust through ROS metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.11.001>
- Fimbres García, D. (2016). Caracterización bioquímica y estructural de la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) de mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Gallie, D. R. (2013). L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica* 2013: 1-24. <https://doi.org/10.1155/2013/795964>
- Gallie, D. R. (2013); The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany* 64(2): 433-443, <https://doi.org/10.1093/jxb/ers330>
- Green, M.R. y Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 4^{ta} edición, New York, USA.
- Harb, J., Khraiweh, B., Streif, J., Reski, R., Frank, W. (2010). Characterization of blueberry monodehydroascorbate reductase gene and changes in levels of ascorbic acid and the antioxidative capacity of water soluble antioxidants upon storage of

- fruits under various conditions. *Scientia Horticulturae* 125(3): 390-395. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.031>
- Hossain, M. A., Asada, K. (1985). Monodehydroascorbate Reductase from Cucumber Is a Flavin Adenine Dinucleotide Enzyme*. *Journal of Biological Chemistry* 260(24): 12920-12926.
- Hossain, M. A., Nakano, Y., Asada, K. (1984). Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant and Cell Physiology* 25(3): 385–395. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076726>
- Huang, C. Y., Wen, L., Juang, R. H., Sheu, D. C., Lin, C. T. (2010). Monodehydroascorbate reductase cDNA from sweet potato: Expression and kinetic studies. *Botanical Studies* 51(1): 37-44.
- Jacobi, K. K., MacRae, E. A., Hetherington, S. E. (2001). Postharvest heat disinfestation treatments of mango fruit. *Scientia Horticulturae* 89(3): 171-193. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00240-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00240-5)
- Kavitha, K., George, S., Venkataraman, G., Parida, A. (2010). Biochimie A salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte *Avicennia marina* confers salt stress tolerance on transgenic plants. *Biochimie* 92(10): 1321-1329. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.009>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10(6): 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kumar, S., Tsai, C.-J., Nussinov, R. (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering Design and Selection* 13(3): 179-191. <https://doi.org/10.1093/protein/13.3.179>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laskowski, R. A., Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* 51(10): 2778-2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Li, F., Wu, Q. Y., Duan, M., Dong, X. C., Li, B., Meng, Q. W. (2012). Transgenic tomato plants overexpressing chloroplastic monodehydroascorbate reductase are resistant to salt- and PEG-induced osmotic stress. *Photosynthetica* 50(1): 120-128. <https://doi.org/10.1007/s11099-012-0021-y>
- Liu, F.-X., Fu, S.-F., Bi, X.-F., Chen, F., Liao, X.-J., Hu, X.-S., Wu, J.-H. (2013). Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in China. *Food Chemistry* 138(1): 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.111>
- Lunde, C., Baumann, U., Shirley, N. J., Drew, D. P., Fincher, G. B. (2006). Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (Mdhar)

- genes in *Physcomitrella patens*: Implications for the evolution of the MDHAR family in plants. *Plant Molecular Biology* 60(2): 259-275. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S., Noble, M. E. M. (2011). Presenting your structures: The CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 67(4): 386-394. <https://doi.org/10.1107/S0907444911007281>
- Moreno Bojorquez, D. N. (2017). Estudio de la estabilidad térmica de la dehidroascorbato reductasa (DHAR) de mango. Tesis de Maestría en Ciencias. CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Murthy, S. S., Zilinaskas, B. A. (1994). Molecular Cloning and Characterization of a cDNA Encoding Pea Monodehydroascorbate Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 269(49): 31129-31133.
- Noshi, M., Hatanaka, R., Tanabe, N., Terai, Y., Maruta, T., Shigeoka, S. (2016). Redox regulation of ascorbate and glutathione by a chloroplastic dehydroascorbate reductase is required for high-light stress tolerance in *Arabidopsis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 80(5): 870-877. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1135042>
- Palma, J. M., Jiménez, A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Lundqvist, M., Gómez, M., ... Del Río, L. A. (2006). Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* 57(8): 1747-1758. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj191>
- Park, A. K., Kim, I. S., Do, H., Jeon, B. W., Lee, C. W., Roh, S. J., ... Kim, H. W. (2016). Structure and catalytic mechanism of monodehydroascorbate reductase, MDHAR, from *Oryza sativa* L. *japonica*. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep33903>
- Perrin, C. L. (2017). Linear or Nonlinear Least-Squares Analysis of Kinetic Data? *Journal of Chemical Education*, 94(6): 669-672.
- Petukhov, M., Kil, Y., Kuramitsu, S., Lanzov, V. (1997). Insights into thermal resistance of proteins from the intrinsic stability of their α -helices. *Proteins Structure Function and Genetics* 29(3): 309-320.
- Pucci, F., Rooman, M. (2017). Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Current Opinion in Structural Biology* 42: 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.007>
- Sano, S., Miyake, C., Mikami, B., Asada, K. (1995). Molecular Characterization of Monodehydroascorbate Radical Reductase from Cucumber Highly Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 270(36): 21354-21361.
- Sano, S., Tao, S., Endo, Y., Inaba, T., Hossain, M. A., Miyake, C., Saito, K. (2005). Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* 69(4): 762-772. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.762>

- Segel, I. H. (1993). Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. In *John Wiley Sons* New York (Vol. 2, p. 957). [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(76\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0307-4412(76)90018-2)
- Shin, S. Y., Kim, Y. S., Kim, I. S., Kim, Y. H., Park, H. M., Yoon, H. S. (2014). The expression of BrMDHAR gene in chloroplasts and mitochondria enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 58(3): 456-468. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0416-7>
- Shin, S. Y., Kim, M. H., Kim, Y. H., Park, H. M., Yoon, H. S. (2013). Co-expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase from *Brassica rapa* effectively confers tolerance to freezing-induced oxidative stress. *Molecules and Cells* 36(4): 304-315. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0071-4>
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017.
- Smirnoff, N., Wheeler, G. L. (2015). Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35(4): 291-314. <https://doi.org/10.1080/10409230008984166>
- Stevens, R., Page, D., Gouble, B., Garchery, C., Zamir, D., Causse, M. (2008). Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell and Environment* 31(8): 1086-1096. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01824.x>
- Truffault, V., Gest, N., Garchery, C., Florian, A., Fernie, A. R., Gautier, H., Stevens, R. G. (2016). Reduction of MDHAR activity in cherry tomato suppresses growth and yield and MDHAR activity is correlated with sugar levels under high light. *Plant Cell and Environment* 39(6): 1279-1292. <https://doi.org/10.1111/pce.12663>
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., Foyer, C. H. (2001). Low Ascorbic Acid in the vtc-1 Mutant of *Arabidopsis* Is Associated with Decreased Growth and Intracellular Redistribution of the Antioxidant System. *Plant Physiology* 127(2): 426-435. <https://doi.org/10.1104/pp.010141>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Zhang, Y. (2013). Ascorbic Acid in Plants - Biosynthesis, Regulation and Enhancement. *Springer Briefs in Plant Science*. Cap. 2 Biological role of Ascorbate in Plants 7-33. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4127-4>