



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A FOSFATO EN LAS PIROFOSFATASAS DE  
CHILE SERRANO Y ARABIDOPSIS EMPLEANDO UN ENSAYO NOVEDOSO CON  
NANOPARTICULAS DE ORO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Ximena Carranza Trinidad**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES  
**VOCAL:** DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS  
**SECRETARIO:** DRA. LAURA CARMONA SALAZAR  
**1er. SUPLENTE:** M. EN I. CAROLINA FLORES ÁVILA  
**2° SUPLENTE:** DR. HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 115, Conjunto E, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

M. EN C. LILIAN GABRIELA VALENCIA TURCOTTE

**SUSTENTANTE (S):**

---

XIMENA CARRANZA TRINIDAD

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la DGAPA, proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN216815 por la beca que se me otorgó y por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación. También a CONACyT INFR-2015-01 252123, y CONACyT-México INFRA-2015-252001; por el financiamiento para el equipamiento del departamento en el cual se desarrolló este trabajo.

## **I. ÍNDICE**

<b>I.</b>	<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
	<b>A. La importancia de las pirofosfatasas en el metabolismo vegetal.</b>	<b>13</b>
	<b>B. Propiedades moleculares y cinéticas de las pirofosfatasa inorgánicas solubles de origen vegetal.</b>	<b>17</b>
	<b>C. Relación de las pirofosfatasas con la generación de metabolitos secundarios en el chile.</b>	<b>20</b>
	<b>D. Ensayo clásico de la actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble.</b>	<b>21</b>
	<b>E. Propiedades de las nanopartículas relacionadas con su empleo en ensayos colorimétricos.</b>	<b>24</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACION</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>34</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>36</b>

<b>A.</b> Síntesis de las nanopartículas de oro (d = 13 nm).	<b>36</b>
<b>B.</b> Ensayos de actividad de PPIasa utilizando $\text{Cu}^{2+}$ o $\text{Mg}^{2+}$ como agente agregaste.	<b>36</b>
<b>C.</b> Obtención de Proteína Recombínate AtPPa1	<b>37</b>
<b>D.</b> Obtención de pirofosfatasa en placenta de <i>C. annuum</i> .	<b>40</b>
<b>E.</b> Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.	<b>42</b>
<b>F.</b> Medición de la actividad pirofosfatasa – Ensayo de verde de Malaquita.	<b>43</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>A.</b> Montaje del método utilizando Au-NPs para medir la actividad pirofosfatasa en tiempo real.	<b>45</b>
<b>B.</b> Obtención de proteína recombinante AtPPa1-GST	<b>58</b>
<b>C.</b> Obtención de pirofosfatasa en placenta de <i>Capsicum annuum</i> “serrano”	<b>59</b>
<b>D.</b> Medición de la actividad pirofosfatasa de la enzima AtPPa1	<b>61</b>
<b>E.</b> Medición de la actividad de la pirofosfatasa de <i>Capsicum annuum</i>	<b>63</b>
<b>F.</b> Sensibilidad a fosfato y a exceso de sustrato de la enzima AtPPa1	<b>64</b>
<b>G.</b> Sensibilidad a fosfato y a exceso de sustrato de la pirofosfatasa de <i>Capsicum annuum</i>	<b>68</b>
<b>H.</b> Medición de la actividad pirofosfatasa con el método de verde de Malaquita de la enzima AtPPa1	<b>69</b>

I. Medición de la actividad pirofosfatasa con el método de verde de Malaquita de <i>Capsicum annuum</i>	71
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	73
9. CONCLUSIONES	79
IV. REFERENCIAS	80

## II. ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín bifosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AtPPa1	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 1
AtPPa2	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 2
AtPPa3	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 3
AtPPa4	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 4
AtPPa5	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 5
AtPPa6	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> isoforma 6
Au-NPs	Nanopartículas de oro
BSA	Albumina sérica bovina
Cys	Cisteína
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GST	Glutación S-transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IPP	Isopentenil pirofosfato

IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
NMP	Nucleósido monofosfatado
NDP	Nucleósido difosfatado
NTP	Nucleósido trifosfatado
PPi	Pirofosfato inorgánico
Pi	Fosfato inorgánico
PPiase	Pirofosfatasa
PVA	Alcohol polivinilo
RNA	Ácido ribonucleico
RVM	Reactivo verde de Malaquita
SDS	Dodecilsulfato sódico
siPPiase	Pirofosfatasa inorgánica soluble
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VM	Verde de Malaquita

### III. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura A.</b> Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por una pirofosfatasa inorgánica soluble dependiente de $Mg^{2+}$ .	<b>17</b>
<b>Figura B.</b> Fundamento químico del método de medición de Pi con verde de Malaquita.	<b>23</b>
<b>Figura C.</b> Variación de coloración de las Au-NPs dependiendo de su tamaño (diámetro).	<b>25</b>
<b>Figura D.</b> Esquema del proceso de nucleación de los átomos de oro en solución después de adicionar un agente reductor.	<b>26</b>
<b>Figura E.</b> Esquema de la estabilización de las Au-NPs mediante la adsorción del ión citrato a su superficie.	<b>27</b>
<b>Figura F.</b> Esquema de la interacción entre la superficie de las Au-NPs y el grupo tiol de la cisteína.	<b>28</b>
<b>Figura G.</b> Fundamento del ensayo a estudiar. Las Au-NPs se estabilizan con una solución 25 $\mu M$ de Cys por 30 min a 25°C antes de realizar los ensayos. El $Cu^{2+}$ induce la agregación de las AuNPs-Cys, por coordinación con la Cys que recubre las Au-NPs. La presencia previa de PPI en la disolución previene la agregación de las Au-NPs debido a la mayor afinidad que tiene por $Cu^{2+}$ . La siPPiase hidroliza al PPI y libera al $Cu^{2+}$ que induce la agregación, lo cual puede seguirse espectrofotométricamente.	<b>29</b>
<b>Figura H.</b> A) Disolución de Au-NPs en estado disperso, B) Disolución de Au-NPs en estado agregado.	<b>29</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición de los geles de poliacrilamida utilizados para la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (1 gel).	<b>42</b>
<b>Tabla 2.</b> Composición del reactivo verde de Malaquita para la cuantificación de ortofosfato generado por la hidrólisis del PPI catalizada por la pirofosfatasa.	<b>44</b>
<b>Figura 1.</b> Efecto de la adición de $Mg^{2+}$ 0 $\mu M$ (—◆—), 80 $\mu M$ (—■—) y 200 $\mu M$ (—▲—) al variar la concentración de PPI (0 – 400 $\mu M$ ) en un medio con 400 $\mu M$ de $Cu^{2+}$ en la disolución de AuNPs-Cys.	<b>46</b>
<b>Figura 2.</b> Espectro de absorción (400-800nm) de la disolución de AuNPs-Cys (3.96 nm), en ausencia de cationes (—), con 160 $\mu M$ de $Mg^{2+}$ (—) o con 320 $\mu M$ de $Cu^{2+}$ (—).	<b>47</b>

**Figura 3.** Ensayo propuesto utilizando  $Mg^{2+}$  como único agente agregante. El  $Mg^{2+}$  induce la agregación de las AuNPs-Cys, por coordinación con la Cys que recubre las Au-NPs. La presencia previa de PPI en la disolución previene la agregación de las Au-NPs debido a la mayor afinidad que tiene por  $Mg^{2+}$ . La siPPIasa hidroliza al PPI y libera al  $Mg^{2+}$  que induce la agregación, lo cual puede seguirse espectrofotométricamente. 48

**Figura 4.** Efecto de la variación de la concentración PPI (0-400  $\mu M$ ) a tres diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  80  $\mu M$  ( $\blacklozenge$ ), 160  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ) y 320  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ) en la disolución de AuNPs-Cys. 49

**Figura 5.** Curso temporal de la estabilidad de la disolución AuNPs-Cys con  $Mg^{2+}$  320  $\mu M$  y en ausencia ( $\blacklozenge$ ) o presencia de 40  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), 80  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ), 120  $\mu M$  ( $\times$ ), 200  $\mu M$  ( $\text{ж}$ ), 280  $\mu M$  ( $\bullet$ ) y 400  $\mu M$  ( $\text{I}$ ) de PPI. Las líneas trazadas son resultado de un ajuste de datos a un decaimiento exponencial simple, acompañado de una caída lineal lenta. 50

**Figura 6.** Estabilidad de la solución AuNPs-Cys a través del tiempo, en ausencia ( $\text{I}$ ) o en presencia de diferentes concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$ : 40  $\mu M$  ( $\blacklozenge$ ), 80  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), 120  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ), 200  $\mu M$  ( $\times$ ), 280  $\mu M$  ( $\bullet$ ) y 400  $\mu M$  ( $\text{ж}$ ). 51

**Figura 7.** Especies formadas en el medio de reacción entre el  $Mg^{2+}$  y el tetranion PPI. 52

**Figura 8.** Efecto del pH en la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en ausencia ( $\text{I}$ ), o en presencia de concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  de 40  $\mu M$  ( $\bullet$ ), 80  $\mu M$  ( $\text{ж}$ ), 120  $\mu M$  ( $\times$ ), 200  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ), 280  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), y 400  $\mu M$  ( $\blacklozenge$ ), y en presencia de amortiguador Tris-HCl 10  $\mu M$  a pH 7.5 (izquierda) y 8.5 (derecha). 52

**Figura 9.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys, en presencia de amortiguador Tris-HCl, pH 7.5 10  $\mu M$  y EDTA 1  $\mu M$  y en ausencia ( $\text{I}$ ) o en presencia de concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  de 40  $\mu M$  ( $\blacklozenge$ ), 80  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), 120  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ), 200  $\mu M$  ( $\times$ ), 280  $\mu M$  ( $\text{ж}$ ) y 400  $\mu M$  ( $\bullet$ ). 53

**Figura 10.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en presencia de  $Mg^{2+}$  200  $\mu M$  y amortiguador Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu M$  y con las concentraciones de PPI 200  $\mu M$  ( $\blacklozenge$ ), PPI 175  $\mu M$  + Pi 50  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), PPI 150  $\mu M$  + Pi 100  $\mu M$  ( $\blacktriangle$ ), PPI 125  $\mu M$  + Pi 150  $\mu M$  ( $\times$ ), PPI 100  $\mu M$  + Pi 200  $\mu M$  ( $\text{ж}$ ). 54

**Figura 11.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en presencia de  $Mg^{2+}$  200  $\mu M$  y amortiguador Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu M$  y con las concentraciones de PPI 400  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), PPI 375  $\mu M$  + Pi 50  $\mu M$  ( $\blacksquare$ ), PPI 350 55

$\mu\text{M} + \text{Pi } 100 \mu\text{M}$  ( $-\blacktriangle-$ ),  $\text{PPi } 325 \mu\text{M} + \text{Pi } 150 \mu\text{M}$  ( $-x-$ ),  $\text{PPi } 200 \mu\text{M} + \text{Pi } 200 \mu\text{M}$  ( $-\times-$ ).

**Figura 12.** Curva patrón  $\text{Mg}^{2+}$   $200 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi } 0 - 200 \mu\text{M}$ ,  $\text{Pi } 400 - 0 \mu\text{M}$  y  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$ . **56**

**Figura 13.** Curva patrón  $\text{Mg}^{2+}$   $400 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi}$  de  $0$  a  $200 \mu\text{M}$  (escala inferior de la abscisas) y  $\text{Pi } 400$  a  $0 \mu\text{M}$  (escala superior de la abscisas), en presencia de  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$ . **57**

**Figura 14.** Curva patrón  $\text{Mg}^{2+}$   $300 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi}$  de  $0$  a  $200 \mu\text{M}$  (escala inferior de la abscisas) y  $\text{Pi } 400$  a  $0 \mu\text{M}$  (escala superior de la abscisas), en presencia de  $\text{Tris-HCl}$   $10 \mu\text{M}$ . La línea representa el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente de  $0.0043$ , e intercepción con la ordenada  $0.87$ . **58**

**Figura 15.** Gel de electroforesis SDS-PAGE para las muestras de proteína de *C. Annuum* y para las proteínas de fusión  $\text{AtPPa1-GST}$  y la  $\text{AtPPa1}$  digerida. Los cuadros rojos indican la posición esperada para la proteína de interés. Se aplicaron  $10 \mu\text{g}$  de proteína total en cada carril. **60**

**Figura 16.** Curso temporal de la señal de hidrólisis de  $\text{PPi}$  en la disolución  $\text{AuNPs-Cys}$  con  $300 \mu\text{M}$  de  $\text{PPi}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$ , y  $\text{AtPPa1}$ , a una concentración final de  $8.065 \mu\text{g/mL}$ . **61**

**Figura 17.** Curva patrón en la disolución de  $\text{AuNPs-Cys}$  con  $\text{PPi}$  variable de  $0 - 300 \mu\text{M}$  y  $\text{Pi}$  variable en forma paralela de  $600 - 0 \mu\text{M}$  y en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$   $300 \mu\text{M}$  y  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$  (específica para el ensayo mostrado en la figura 18). La línea indica el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente  $0.0043 (\mu\text{M}^{-1})$  y corte a la ordenada  $0.87$ . **62**

**Figura 18.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa  $\text{AtPPa1}$ , a una concentración final de  $8.065 \mu\text{g/mL}$ , en la disolución de  $\text{AuNPs-Cys}$  con  $\text{Mg}^{2+}$   $300 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi } 300 \mu\text{M}$  y  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$ . **63**

**Figura 19.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (de *C. annuum* a una concentración final de  $57.2 \mu\text{g/mL}$ ) en la solución  $\text{AuNPs-Cys}$  con  $\text{Mg}^{2+}$   $300 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi } 300 \mu\text{M}$  y  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$ . **64**

**Figura 20.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa ( $\text{AtPPa1}$  a una concentración final de  $8.065 \mu\text{g/mL}$ ) en la solución de  $\text{AuNPs-Cys}$  con  $\text{Mg}^{2+}$   $300 \mu\text{M}$ ,  $\text{PPi } 300 \mu\text{M}$  y  $\text{Tris-HCl}$   $\text{pH } 7.5$   $10 \mu\text{M}$ . La línea recta muestra el ajuste de los datos iniciales para el cálculo de la actividad. Los valores obtenidos fueron  $R^2 = 0.87$ , pendiente  $-0.36 \mu\text{M/s}$ , intersección con la ordenada  $249.4 \mu\text{M}$ . **65**

**Figura 21.** Curva de inhibición de la actividad pirofosfatasa ( $\text{AtPPa1}$ ) por  $\text{Pi}$  ( $0 - 1.2 \text{ mM}$ ), en la disolución  $\text{AuNPs-Cys}$  a una concentración inicial de  $\text{PPi}$  y  $\text{Mg}^{2+}$

de 300  $\mu\text{M}$ , en Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ . La línea es el resultado del ajuste a la ecuación:  $A_{\alpha} - (A_0 - A_{\alpha}) \times I_{50} / (I_{50} + [I])$ , en donde  $A_0$  es la actividad en ausencia de inhibidor,  $A_{\alpha}$  es la actividad a concentración infinita de inhibidor (que se fijó a cero, en consistencia con un preajuste)  $I_{50}$  es la concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición en las condiciones medidas e  $[I]$  es la concentración de inhibidor. Para este ajuste los valores fueron:  $\xi^2/\text{GL} = 0.06867$ ,  $R^2 = 0.98$ ,  $A_0 = 4.93 \pm 0.25 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg prote\u00edna}^{-1}$  e  $I_{50} = 275 \pm 45$ ; en donde,  $\xi$  es la sumatoria estad\u00edstica (valor observado -valor esperado); GL son los grados de libertad, es decir, n\u00famero de datos- n\u00famero de par\u00e1metros (2) menos uno y R es el coeficiente de correlaci\u00f3n. 66

**Figura 22.** Curva de la actividad pirofosfatasa (AtPPa1) con PPI y  $\text{Mg}^{2+}$  equimolares (200 - 400  $\mu\text{M}$ ), en la soluci\u00f3n AuNPs-Cys con Tris-HCl pH 7.5, 10  $\mu\text{M}$ . 67

**Figura 23.** Actividad pirofosfatasa (de *C. annuum*) frente a las variaciones en la concentraci\u00f3n de Pi (0 - 1.2 mM), en la disoluci\u00f3n AuNPs-Cys a una concentraci\u00f3n constante de PPI y  $\text{Mg}^{2+}$  de 300  $\mu\text{M}$ , en Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ . 68

**Figura 24.** Actividad pirofosfatasa (de *C. annuum*) a concentraciones equimolares de PPI y  $\text{Mg}^{2+}$  de 200 a 400  $\mu\text{M}$ , en la disoluci\u00f3n AuNPs-Cys con Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ . 69

**Figura 25.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (AtPPa1) utilizando el ensayo de verde de Malaquita con  $\text{Mg}^{2+}$  y PPI a concentraciones equimolares de 200  $\mu\text{M}$  (- $\blacktriangle$ -), 300  $\mu\text{M}$  (- $\blacksquare$ -) y 400  $\mu\text{M}$  (- $\blacklozenge$ -); y Tris-HCl pH 7.5 0.1 M. 70

**Figura 26.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (de *C. annuum*) utilizando el ensayo de verde de Malaquita con  $\text{Mg}^{2+}$  y PPI a concentraciones equimolares de 200  $\mu\text{M}$  (- $\blacktriangle$ -), 300  $\mu\text{M}$  (- $\blacksquare$ -) y 400  $\mu\text{M}$  (- $\blacklozenge$ -); y Tris-HCl pH 7.5 0.1 M. 71

## 1. RESUMEN

La actividad biosintética de macromoléculas, el crecimiento y la proliferación celular se asocian a la generación de cantidades substanciales de pirofosfato (PPi). En contraste con las células animales, las células vegetales acumulan PPi en el citoplasma en cantidades importantes [12], a pesar de que el genoma vegetal codifica para varias isoformas de las enzimas que lo degradan, llamadas pirofosfatasas inorgánicas (siPPiase) [1] y más de una con localización citoplasmática [20]. Adicionalmente, diversas evidencias indican que existe una fuerte relación entre la imposición de un estrés a la planta y el metabolismo del pirofosfato [7,21].

No existen, sin embargo, estudios suficientes acerca del comportamiento cinético de estas isoformas en vegetales, aunque se ha propuesto que el Calcio podría ser un regulador importante de su actividad. Además, dadas las elevadas concentraciones de fosfato (Pi) en el citoplasma, la acumulación de Pi podría inhibir de igual manera a las pirofosfatasas citoplasmáticas contribuyendo así a regular su actividad. Desafortunadamente, los métodos de cuantificación de la actividad de las Pirofosfatasas se basan en la cuantificación del fosfato liberado [7,20] y eso ha impedido un estudio detallado de la inhibición por fosfato en estas enzimas.

Recientemente, se publicó un ensayo colorimétrico basado en nanopartículas de oro monodispersas y funcionalizadas con cisteína, para la cuantificación indirecta de pirofosfato [23] a través de su unión a  $\text{Cu}^{2+}$ . Se buscará en este proyecto el adaptar este método para permitir la cuantificación del pirofosfato, en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , ya que este último catión es el activador esencial de las pirofosfatasas vegetales solubles [1]. A través de este ensayo, se buscará el determinar la inhibición por fosfato de una pirofosfatasa inorgánica soluble.

Esto se investigará en una pirofosfatasa de chile serrano (*Capsicum annuum* L. 'serrano'), planta de gran valor nutrimental y farmacológico y la respuesta se comparará con la de una pirofosfatasa de *Arabidopsis thaliana*, un planta silvestre

muy usada como modelo de investigación básica. Los resultados se analizarán en el contexto de la posible importancia del PPI en la producción de metabolitos secundarios en Chile serrano.

Las pirofosfatasas inorgánicas solubles (siPPiasa) son enzimas esenciales en todos los organismos. Su función es reciclar el pirofosfato que se genera como subproducto de reacciones de biosíntesis, generando además un impulso termodinámico para el anabolismo. Estas enzimas catalizan la reacción de hidrólisis de pirofosfato dando como producto ortofosfato, teniendo al  $Mg^{2+}$  como activador esencial para su actividad catalítica [10].

Los métodos más utilizados para medir la actividad enzimática de las pirofosfatasas son mediante la cuantificación del producto ortofosfato. Estos métodos se basan en la reacción del Pi con molibdato en un medio ácido para formar fosfomolibdato (amarillo). En presencia de ácido ascórbico (*Burchell reagent*) el fosfomolibdato se reduce a un complejo azul, lo que mejora su sensibilidad [11]. Pero también, se puede acomplejar con colorantes catiónicos, como el verde de Malaquita para formar una sal que presenta un pico de absorción a 595 nm y que acentúa la detección y mejora la sensibilidad. El método puede mejorarse mediante la adición de un detergente, lo que mejora la estabilidad del complejo formado [61,62].

El método de verde de Malaquita es compatible con la presencia de cantidades moderadas de cationes divalentes y monovalentes, y dado que se añade una considerable cantidad de ácido para detener la reacción, puede aplicarse a la medición de actividad enzimática en diversos amortiguadores, permitiendo así estudios en rangos de pH amplios.

En el caso de las pirofosfatasas inorgánicas solubles (siPPiasa), la medición de la actividad puede realizarse a su pH óptimo, que es entre 7.5 y 8.5, y en presencia de un catión divalente, que debe estar presente para que manifiesten su actividad catalítica. En el caso de las siPPiasas de la familia I, el  $Mg^{2+}$  es el mejor activador, el  $Mn^{2+}$  es un activador más pobre y otros cationes son inhibidores.

El ensayo de verde de Malaquita es muy sensible, pero no es compatible con el monitoreo de la actividad enzimática en tiempo real, debido a las condiciones ácidas y la presencia de detergente que requiere el método. Además, la medición de actividad con verde de Malaquita se basa en la detección de fosfato, siendo el método capaz de detectar cantidades tan bajas como 1 nmol de fosfato liberado (en un volumen de ensayo de 250  $\mu$ L), pero siendo su límite superior de confiabilidad de 20 nmol. Este ensayo permite estudiar la actividad a concentraciones variables de sustrato y catión divalente, pero no es posible añadir fosfato como inhibidor de la reacción, ya que su presencia interferiría con la medición del fosfato producido por la enzima haciendo imposible la cuantificación de la actividad.

En este trabajo experimental realizado se buscó mejorar un ensayo publicado anteriormente [33], que se fundamenta en la agregación selectiva de nanopartículas de oro (Au-NPs) inicialmente estabilizadas en estado monodisperso por cisteína y cuyo espectro de absorción, entre 522 y 650 nm, cambia al agregarse. La agregación se da cuando el catión  $\text{Cu}^{2+}$  se compleja con la cisteína que recubre las Au-NPs. El ión PPI puede usarse para quelar el  $\text{Cu}^{2+}$  e impedir la agregación de las Au-NPs. La degradación del PPI por las siPPiasas puede seguirse entonces por la agregación de las Au-NPs.

Se buscar también evaluar las condiciones en las que es posible medir actividad enzimática y comparar la medición de actividad con el método tradicional de verde de Malaquita. El objetivo final de este trabajo fue determinar si el método es útil para analizar la cinética de saturación por producto y sustrato de la hidrólisis catalizada por las siPPiasas, siguiendo la absorbencia de las Au-NPs en forma continua durante los ensayos de actividad, para pirofosfatasas provenientes de *Arabidopsis thaliana* y de *Capsicum annuum*.

## 2. ANTECEDENTES

### *A. La importancia de las pirofosfatasas en el metabolismo vegetal.*

#### *- El PPi en el metabolismo vegetal*

El PPi en las células es el resultado de numerosas reacciones metabólicas. La síntesis de polímeros como DNA, RNA, proteínas y polisacáridos generan moléculas de PPi cada vez que un monómero es insertado a estas moléculas. Además, varias reacciones necesarias para la síntesis de estos monómeros también generan la liberación de PPi [3]. Se han reportado casi 190 reacciones donde se involucra el PPi, siendo en su mayoría reacciones de síntesis de macromoléculas [20].

En muchos organismos el PPi sirve como intermediario en diversas rutas metabólicas tales como la degradación de sacarosa y almidón, además de que puede tener un rol como regulador en procesos biosintéticos, aunque los mecanismos que median su papel en la regulación están poco entendidos. En algunos casos, el PPi puede actuar como donador de energía sustituyendo al ATP [16,5].

La hidrólisis en dos moléculas de Pi se lleva a cabo por la presencia de pirofosfatasas inorgánicas, enzimas ubicuas en los organismos vivos. La reacción de hidrólisis es una reacción altamente exergónica, lo que compensa los valores de  $\Delta G^\circ$  cercanos a cero de muchas reacciones biosintéticas de pirofosforólisis y que proporciona la fuerza termodinámica impulsora para muchos procesos anabólicos [4,5,6].

La comprensión del significado termodinámico de la producción de PPi durante la biosíntesis, requiere entender la termodinámica detrás de estos procesos biosintéticos. La constante de equilibrio  $K'$  de cualquier reacción química, depende del cambio de energía libre entre los productos y los reactivos:

Aunado a la ley de Hess, la cual indica que a la suma de dos reacciones químicas le corresponde un  $\Delta G^\circ$  igual a la suma de todas las  $\Delta G^\circ$  de cada una de las

reacciones, es posible entender por qué muchas reacciones biosintéticas que tienen un  $\Delta G^\circ$  desfavorable (positivo) al acoplarse a la hidrólisis de nucleótidos trifosfatados (NTP) se hacen favorables ( $\Delta G^\circ$  negativo) [4,5].

En la mayoría de los casos los nucleótidos trifosfatados son hidrolizados en nucleótidos difosfatados (NDP y ortofosfato (Pi), con un  $\Delta G^\circ = -32.6 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Sin embargo, en ocasiones también se observa la producción de nucleótidos monofosfatados (NMP) y pirofosfato inorgánico (PPi), con un  $\Delta G^\circ = -45.6 \text{ KJ mol}^{-1}$  [5,6]. La energía de disociación del enlace fosfoanhídrido hidrolizado durante la síntesis de PPi, aumenta el carácter exergónico de este proceso en comparación de la reacción de producción de ortofosfato, debido a la sobreestabilización del PPi por uno o dos cationes de  $\text{Mg}^{2+}$  que interactúan de manera eficiente con el PPi [5], formando complejos 1:1 y 1:2, respectivamente.

En células vegetales se estima que la hidrólisis de PPi tiene un  $\Delta G^\circ = -23.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  [12]. La hidrólisis de PPi proporciona entonces un impulso termodinámico adicional a la biosíntesis. La acumulación de PPi, al revertir la hidrólisis de NTPs, arrestaría el crecimiento, puesto que las DNA polimerasas, por ejemplo; podrían funcionar en el sentido despolimerizante, usando PPi como aceptor de los nucleótidos escindidos del polímero (pirofosforolisis). De hecho, la edición pirofosforolítica ha sido documentada en la RNA polimerasas como mecanismo de corrección de errores en la síntesis de RNA [12].

La visión convencional ha considerado al pirofosfato como un subproducto del metabolismo biosintético [10], pero diversas evidencias recientes indican que en las plantas, su papel va más allá de ser un simple desecho del metabolismo [16,19], ya que puede servir como sustituto del ATP para la fosforilación de la fructosa-6-fosfato [2], durante la glucólisis en el citoplasma de las plantas; puede soportar la acidificación de la vacuola a través de la pirofosfatasa membranal del tonoplasto [2] y puede permitir la degradación de la sacarosa en tejidos demanda, en una reacción inversa a la de la síntesis de sacarosa fosfato, catalizada por la sacarosa fosfato sintetasa, pero en la que produciría fructosa, en lugar de fructosa-6-fosfato [2].

Todo lo mencionado en el párrafo anterior resulta de gran interés y plantea numerosas interrogantes relativas al metabolismo del pirofosfato en plantas y, consecuentemente, sobre la regulación de la actividad de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, que de estar activas y sin regulación alguna, degradarían el pirofosfato impidiendo su aprovechamiento como sustituto del ATP en los procesos mencionados.

Si bien, la concentración de PPI en células animales tiende a ser baja, la concentración de PPI en citoplasmas vegetales, bacterianas y de levaduras está en el rango de 0.2 a 0.3 mM [16].

Se ha reportado que en la mitocondria es donde mayor contenido de PPI hay (0.2 mM), en vacuola (2.2  $\mu$ M) y en cloroplastos menos de 1  $\mu$ M [2,91].

Las concentraciones citoplasmática de pirofosfato se mantienen estables, incluso en condiciones de deficiencia de fosfato, cuando la concentración de compuestos como ATP y otros nucleótidos disminuye significativamente [16]. Como ya se comentó, el mantener alta la concentración de PPI cuando se reducen los niveles de carga energética de la célula ( $[ATP]+1/2[ADP]/([AMP]+[ADP]+[ATP])$ ), debería dificultar la síntesis de moléculas como DNA, RNA y proteínas, debido a la reversibilidad termodinámica de algunas reacciones y concentraciones incluso más altas de PPI resultarían tóxicas [75].

Debido a la elevada tasa en que se produce pirofosfato en la célula, es necesario que esta sea balanceada por un sistema catabólico, que de manera eficiente permita la reutilización de fósforo. Esta conversión de PPI en Pi depende de la actividad de las pirofosfatasas inorgánicas y en todas las células estudiadas se ha encontrado al menos una actividad pirofosfatasa [6].

Las siPPiasas han sido bien estudiadas en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) [17] y en bacterias, particularmente *Escherichia coli* [18]. Sin embargo, en plantas el mecanismo de acción de dichas enzimas no está tan bien estudiado [1] y se desconoce la forma en que son reguladas, a fin de controlar la homeostasis de PPI en el metabolismo celular.

### - **Las pirofosfatasas inorgánicas en el metabolismo**

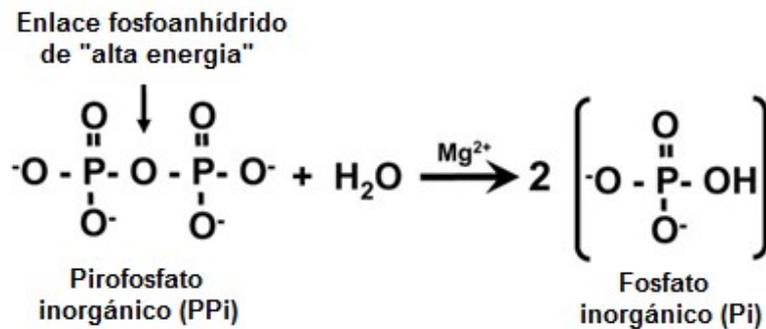
La pirofosfatasa inorgánica (siPPiase) es una enzima que cataliza de manera específica la hidrólisis de este pirofosfato (PPi) en ortofosfato (Pi), la cual es termodinámicamente irreversible y permite la reutilización metabólica del fósforo inorgánico para la fosforilación oxidativa y a nivel de sustrato (síntesis de ATP). A su vez, el ATP provee el impulso termodinámico necesario para realizar otras reacciones metabólicas esenciales [8,13], lo cual vuelve a generar pirofosfato en un círculo virtuoso de crecimiento celular.

Las pirofosfatasas inorgánicas solubles (siPPiase, E.C. 3.6.1.1) catalizan de manera irreversible la hidrólisis del pirofosfato en ortofosfato y agua en presencia de cationes divalentes (**figura A**). En las levaduras, bacterias y plantas se han caracterizado siPPiases que se han agrupado, en base a su secuencia de aminoácidos, dentro de una misma familia (llamada Familia I).

Estas proteínas presentan un pH óptimo de entre 7.5 y 9.0 y tienen un requerimiento absoluto por  $Mg^{2+}$  como catión activador. Sin embargo, su masa molecular nativa, la composición de subunidades en la forma activa, la especificidad por iones metálicos y la especificidad a su sustrato presentan variaciones significativas [5-7].

Actualmente, se conoce también una familia de proteínas solubles con actividad de pirofosfatasa que no son homólogas a las de la Familia I y que emplean como cofactor fisiológico al  $Mn^{2+}$ . Estas han sido clasificadas con base a su similitud en su secuencia como Familia II [77,78]. Las Familias I y II difieren entre sí principalmente en términos funcionales, ya que la Familia I de siPPiases emplea como activador fisiológico el catión divalente  $Mg^{2+}$  (**figura A**) [80], mientras que la Familia II preferentemente emplea  $Mn^{2+}$  para alcanzar su máxima actividad catalítica [1,79].

Con base en su secuencia y la forma oligomérica activa, las pirofosfatasa de la Familia I han sido, a su vez subdivididas en de tipo Eucarionte (semejantes en secuencia a la de la Levadura) y de tipo procarionte (semejantes en secuencia a las de bacterias como *Escherichia coli*).



**Figura A. Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por una pirofosfatasa inorgánica soluble dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  [82].**

Pese a la diferencia en estructura primaria y tridimensional entre ambas familias, existe una gran conservación de residuos en su sitio activo y la arquitectura del mismo. Se sabe que en el caso específico de las siPPiasas de la Familia I el  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes divalentes tienen un efecto de inhibición, por lo que se ha propuesto que la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor relevante para el control de su actividad, aunque esto en sistemas vegetales no está bien dilucidado [4].

Una de las limitaciones en el estudio de pirofosfatasa inorgánicas solubles es su purificación, debido a que su concentración en los tejidos de plantas es baja, además de que existen múltiples isoformas que se expresan constitutivamente [1]. Debido a esto, los ensayos de actividad siPPiasa en extractos crudos o parcialmente purificados resultan complicados por la diversidad de isoformas y la presencia de algunas fosfatasa capaces de hidrolizar el PPi [7,16].

**B. Propiedades moleculares y cinéticas de las pirofosfatasa inorgánicas solubles de origen vegetal.**

Particularmente, se sabe que *Arabidopsis thaliana* posee seis isoformas de siPPiasas (AtPPa1, AtPPa2, AtPPa3, AtPPa4, AtPPa5 y AtPPa6) de las cuales, las cinco primeras tienen una semejanza de secuencia igual o superior a 69% entre sí, mientras que la sexta, presenta más divergencia y tiene una secuencia más larga de aminoácidos, que incluye un péptido de tránsito al cloroplasto; es decir, la proteína madura es ligeramente más pequeña. Esta última proteína solo cuenta con una semejanza del 22% respecto a las demás [4,22], y su secuencia de aminoácidos es más similar a las pirofosfatasa de levaduras, mientras que las restantes tienen secuencias emparentadas con la pirofosfatasa de *E. coli*.

En el laboratorio del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres se caracterizaron cinética y molecularmente a las AtPPa1 y AtPPa4, encontrando que ambas proteínas tienen una alta especificidad por el  $Mg^{2+}$  [24]. La isoforma 6 también depende de  $Mg^{2+}$  y su pH óptimo es de 7.5 [2].

Se han estudiado de igual forma la localización de estas isoformas dentro los diferentes organelos celulares mediante la ligación de proteínas fluorescentes al gen de la AtPPiasa [1,24].

Se determinó que la AtPPa1 se localiza preferentemente en regiones citosólicas aunque también se encontró en el núcleo de algunas células o cerca de este [24,25]. Las AtPPa2 y AtPPa3 se localizaron exclusivamente en el citosol. La AtPPa4 se localizó en el citoplasma y en el espacio extracelular, mientras que la AtPPa5 se localizó en el citosol y en regiones circundantes del cloroplasto. La AtPPa6, al menos en experimentos de importación in vitro, se localiza principalmente en cloroplastos y recientemente se demostró su importación al cloroplasto in vivo y su localización parece ser exclusivamente cloroplástica [7,22,33].

Se sabe que al menos las AtPPa1 y AtPPa4 son proteínas monoméricas y que su mecanismo cinético difiere del que presentan las pirofosfatasa de levadura y *E. coli*, puesto que la unión del complejo  $Mg-PPi^{2-}$  debe de estar precedida en forma ordenada por la unión de al menos un átomo de  $Mg^{2+}$  libre para dar lugar a la

forma activa. Este mecanismo cinético propuesto no es inequívoco, porque la unión de  $\text{Mg-PPi}^{2-}$  podría preceder a la de  $\text{Mg}^{2+}$  libre, siempre que la adición sea en una secuencia ordenada [5]. Estas proteínas son también sensibles a la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  [4].

Las pirofosfatasas vegetales son también sensibles a la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$ , pero dicha inhibición no ha sido estudiada aun con suficiente detalle y solo se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  no inhibe de manera competitiva con el  $\text{Mg}^{2+}$  como se esperaría, sino que existe un importante componente acompetitivo, lo que sugiere que el complejo  $\text{Ca-PPi}^{2-}$  es un inhibidor más efectivo que los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  libres [4].

De igual forma, se han estudiado los cambios asociados a la deficiencia de alguna de estas isoformas, generando cambios fenotípicos sutiles, pero que se asocian a una mejor adaptación a diferentes condiciones de estrés [23]. Sin embargo, este estudio no se ha realizado con todas las mutantes nulas de cada isoforma posible y la caracterización del fenotipo de dichas plantas en condiciones normales de crecimiento o bajo estrés aun está incompleta.

Trabajos realizados en plantas como el frijol han demostrado que existen cambios en la expresión y la actividad de las pirofosfatasas en plantas bajo condiciones de falta de Pi, sugiriendo un posible papel del PPI durante la adaptación de la planta a esta condición [7].

Tales variaciones en la expresión en la actividad indican la existencia de mecanismos individuales de regulación para cada isoforma de las pirofosfatasas en la planta y, por lo tanto, la presencia de varias isoformas de pirofosfatasas en las plantas es poco probable que sea debido a la redundancia genética normal.

Estos cambios no son uniformes y dependen de los tejidos y órganos que se analicen, pero también de que posición guarda dicho órgano en la planta con respecto a otros semejantes [8], ya que durante el desarrollo los órganos van apareciendo gradualmente. Por ejemplo, las hojas de aparición tardía están más arriba y son más jóvenes que las hojas de aparición temprana.

### ***C. Relación de las pirofosfatasas con la generación de metabolitos secundarios en el Chile.***

El género *Capsicum* (*Solanaceae*) está conformado por aproximadamente 30 especies distintas y se encuentran distribuidas desde el sur de los Estados Unidos, hasta el norte de Argentina. De este género, han sido domesticadas *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens*. De las especies domesticadas, *C. annuum* es la de mayor importancia económica, además de que es la especie que se cultiva más ampliamente en todo el mundo y se considera que fue domesticada en México [9].

*C. annuum* es la especie que presenta la mayor variación en tamaño, color y forma en sus frutos. A ella pertenecen los chiles “anchos”, “serranos”, “jalapeños”, “Anaheim” y “morrón”, entre muchos otros [29].

Se tiene reportado que durante la maduración de *Capsicum sp* los cloroplastos del fruto se convierten en cromoplastos, lo que coincide con un incremento en la síntesis de carotenoides. El fitoeno, el primer intermediario de tetraterpenos precursores de carotenoides, es sintetizado en el cloroplasto o estroma cloroplástico, a partir del isopentenil pirofosfato (IPP). Por cada mol de IPP incorporado a la ruta de síntesis de carotenoides, un mol de pirofosfato (PPi) es liberado [27]. Durante la transformación de cloroplastos en cromoplastos, la acumulación de almidón se mantiene, lo que también genera PPi en el estroma. De acuerdo con lo anterior, es de esperarse que durante este proceso exista algún mecanismo de degradación o utilización del PPi en los frutos de *Capsicum sp*.

Las vías de síntesis de terpenoides y almidón están bien estudiadas, aunque la liberación de PPi generada durante la síntesis de carotenoides liberado hacia el estroma no se encuentra igualmente bien estudiada, sobretodo, no se ha determinado que tan rápida es su degradación dentro del cromoplasto, o bien si este puede ser exportado al citoplasma. Se ha reportado que a concentraciones cercanas a 1 mM de PPi se inhibe la actividad de la fitoeno sintasa, la cual se

encuentra localizada principalmente en el estroma cloroplástico y que interviene en el proceso de maduración. Por otro lado, se sugiere además que una concentración de apenas 10  $\mu\text{M}$  de PPI inhibiría a otras enzimas participantes del proceso de maduración del cromoplasto [76].

En base a lo anterior, nuestro grupo ha planteado que existe un mecanismo de consumo de pirofosfato durante la maduración de los frutos. Dos de las posibilidades que se han considerado son: (i) la expulsión del pirofosfato del cromoplasto, o (ii) su hidrólisis en dos moléculas de fosfato. Debido a que se ha reportado la presencia de pirofosfatasas en cromoplastos, la segunda propuesta está más favorecida, sin embargo, se ha reportado la existencia de un intercambiador Pi-malato en leucoplastos de semillas inmaduras de maíz y no se ha determinado si tal transporte existe en los cloroplastos del fruto de Chile [28].

Hasta el día de hoy, no se han realizado estudios suficientes sobre las pirofosfatasas presentes en *Capsicum annuum* "serrano", pero se sabe que son dependientes de  $\text{Mg}^{2+}$  y que catalizan de manera específica la hidrólisis de PPI a Pi [29]. Por otro lado, el genoma de *Capsicum annuum* 'Zunla' ha sido recientemente secuenciado [30], y en él es posible identificar al menos 10 secuencias de bases que putativamente codifican para proteínas con posible actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble. De entre ellas, 6 secuencias corresponden a secuencias homólogas de las siPPiases de la Familia I [31].

#### **D. Ensayo de la actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble.**

La mayoría de los métodos empleados para la cuantificación del ion ortofosfato (Pi) en solución se fundamentan en la reacción de ortofosfato con molibdato, en presencia de vanadato o antimonio y en presencia de un medio ácido. Posteriormente, el fosfomolibdeno generado, el cual presenta un color amarillo, es reducido por agentes reductores como pueden ser el cloruro de estaño, ácido ascórbico, o la hidracina, generándose así fosfomolibdeno ahora de color azul [65]. Este procedimiento fue desarrollado por primera vez en 1887 por Osmond

[32], pero no fue hasta más tarde, con la introducción de catalizadores como el antimonio, que dicho ensayo se popularizó, al hacerlo más sensible, rápido y cuantitativo.

Las absorptividades molares de estos productos amarillo o azul del molibdeno presentan valores del orden de  $2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [61,67].

La asociación de iones de fosfomolibdato con un colorante catiónico como el verde de Malaquita aportan una mayor sensibilidad al método, aumentando de esta manera los valores de absorptividad molar al orden de  $1.0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [66-70] (*figura B*). Sin embargo, aun hay varias deficiencias en el actual método de verde de Malaquita, como la utilización de concentraciones más altas de ácido (de 0.38 a 1.65 M de  $\text{H}^+$ ) y molibdato (de 17 a 93 mM de Mo) [66] comparadas con las utilizadas en el método de azul de molibdeno (de 0.1 a 0.3 M de  $\text{H}^+$  y de 1.4 a 5.6 mM de Mo respectivamente) [71]. Además, el complejo 1:1 de verde de Malaquita con el fosfomolibdato azul se forma lentamente y su estabilidad es limitada, por lo que se ha requerido mejorar su estabilidad mediante la adición de detergentes [61].

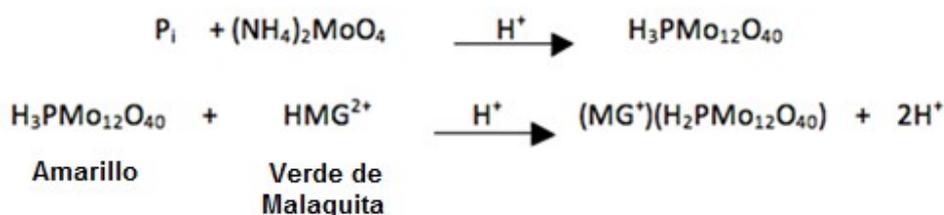
Existen evidencias de que los compuestos de fósforo orgánicos pueden llegar a sufrir hidrólisis liberando ortofosfato debido a la prolongada exposición al medio ácido. Esta liberación de fosfato a partir de fósforo orgánico durante la medición de ortofosfato no solo es el resultado del medio ácido, sino también de los efectos catalíticos del molibdato o vanadio sobre la hidrólisis del enlace éster fosfato [61,72].

Se ha sugerido también que la alta concentración de molibdato en el medio de reacción representa el principal contribuyente a la liberación de ortofosfato del fósforo orgánico [73]. De igual forma, se ha sugerido que los iones de metales de transición también pueden facilitar tanto dicha hidrólisis, como la de los compuestos orgánicos de fósforo [74,61].

No existen mediciones directas del grado de hidrólisis de los compuestos orgánicos de fósforo con el método de verde de Malaquita, pero es probable que

las altas concentraciones tanto de ácido y molibdato utilizado en este método puedan inducir la hidrólisis de compuestos orgánicos lábiles en el medio ácido, como lo son azúcares simples fosforilados y ésteres monofosfatados de diversos alcoholes de importancia natural, tales como péptidos, aminoácidos, lípidos, nucleótidos, etc.

La asociación de los iones de fosfomolibdato con el verde de Malaquita es un proceso lento que puede tardar horas en completarse [67]. A fin de obtener una absorbencia estable, se han adicionado detergentes, tensoactivos o en algunos casos alcohol de polivinilo (PVA) con el fin de inhibir reacciones secundarias [61].



**Figura B. Fundamento químico del método de medición de Pi con Verde de Malaquita [62].**

Desafortunadamente, se ha estudiado que la adición de PVA causa un enlentecimiento o reducción en el desarrollo del color, particularmente en disoluciones con concentraciones de ortofosfato bajas, restando así sensibilidad al método. Se ha observado que las señales de absorbencia a concentraciones de ortofosfato menores de 200 nM se desarrollan muy lentamente y la respuesta lineal de ortofosfato, en dicho rango de concentración, solo se puede lograr después de días de incubación [61].

Una mejora en la sensibilidad del método de verde de Malaquita se logra con la estabilización del complejo fosfomolibdato-verde de Malaquita en micelas de tensoactivo. Los tensoactivos catiónicos o no iónicos se utilizan a menudo para sensibilizar a los indicadores metalocrómicos [61]. Particularmente en el laboratorio, se ha empleado este método para la medición de la actividad

pirofosfatasa, de manera rutinaria, utilizando como agente tensoactivo Brij-35 para estabilizar el colorante [1].

Como se mencionó, debido a las condiciones ácidas requeridas en el método de verde de Malaquita, no permiten el monitoreo de la reacción en tiempo real, las curvas de progreso de la actividad de siPPiasa deben hacerse con mediciones independientes detenidas a diferentes intervalos de tiempo. Aunque el ensayo de actividad de pirofosfatasa con verde de Malaquita ha permitido el estudio de diversas propiedades de las pirofosfatasas inorgánicas solubles de plantas, un aspecto que ha quedado relegado es el estudio de la inhibición por fosfato, ya que su adición al medio de reacción interfiere fuertemente con la medición de actividad. De hecho, un procedimiento rutinario en el laboratorio es el lavado exhaustivo de todo el material, para eliminar aun las trazas de fosfato que están presentes en los depósitos de sales que quedan sobre el vidrio luego de lavar el material con agua de la llave y detergentes comunes, ya que aun estas pequeñas cantidades de fosfato interfieren con la reproducibilidad de la medición de actividad de siPPiasa (*ver métodos apartado f*).

### ***E. Propiedades de las nanopartículas relacionadas con su empleo en ensayos colorimétricos.***

Se sabe que las propiedades superficiales y electrónicas de los materiales cambian en la llamada nanoescala, muchas de las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas de metales, incluyendo luminiscencia, conductividad y actividad catalítica, están dadas en función del tamaño de estas, así como la cercanía con sus partículas vecinas [45].

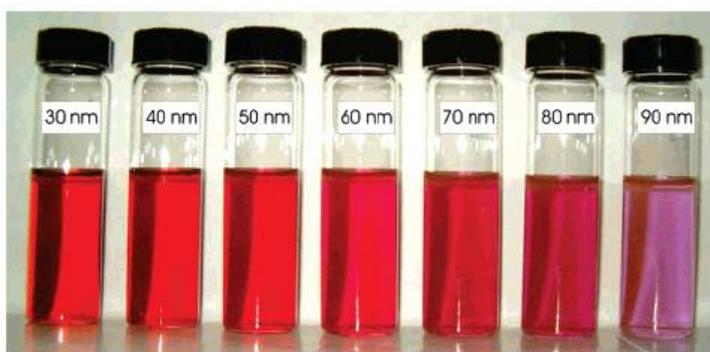
Las nanopartículas de diferentes metales poseen además capacidades significativas de adsorción debido a su relativamente amplia superficie que les permite enlazar y/o acarrear otras sustancias y compuestos químicos, tales como medicamentos o macromoléculas biológicas que se pueden unir a su superficie mediante enlaces covalentes o adsorción.

Estas propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas como su carga e hidrofobicidad pueden ser alteradas mediante la unión a su superficie de compuestos específicos como péptidos o proteínas, lo que permite manipular sus características y emplearlas en la cuantificación de analitos específicos [36,40].

Debido a que poseen además coeficientes de extinción altos en la región visible, las nanopartículas de oro han sido utilizadas como un indicador colorimétrico para la señalización de eventos de reconocimiento molecular [43].

En la actualidad se han desarrollado ensayos colorimétricos para la detección *in vivo* de diversas moléculas de importancia biológica como ácidos nucleicos, proteínas, azúcares y iones metálicos. Estos ensayos colorimétricos se fundamentan en su mayoría en el uso de los estados de agregación/dispersión inducidos de manera específica de nanopartículas de oro (Au-NPs) [47,48].

Los objetos macroscópicos de oro puro son dorados pues reflejan casi toda la luz, pero absorben parte del azul. A nanoescala las suspensiones de nanopartículas de oro varían de color desde el blanco, al azul y al rojo, dependiendo de su tamaño y estado de agregación (**figura C**). La síntesis de nanopartículas de oro en suspensión coloidal puede, por tanto, seguirse a través de su cambio de color [33,85,86].



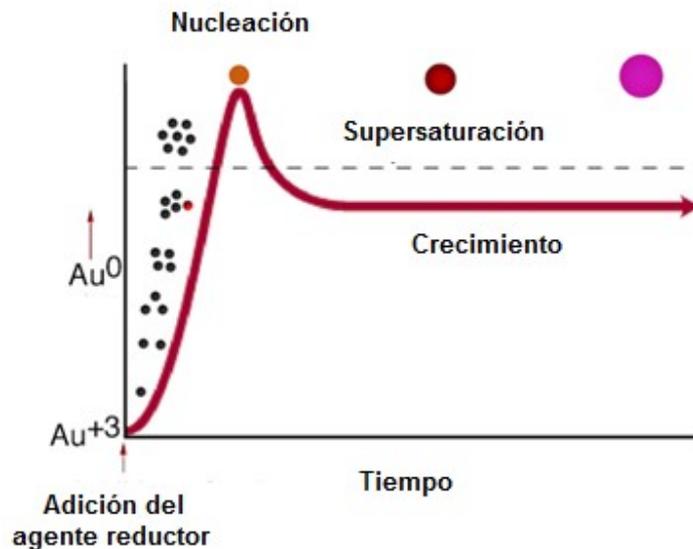
**Figura C. Variación de coloración de las Au-NPs dependiendo de su tamaño (diámetro) [34].**

Pese a que muchas estrategias han sido desarrolladas para la síntesis de nanopartículas de oro en solventes orgánicos o acuosos, el método que se basa

en el uso de citrato como agente reductor es el más ampliamente usado en las áreas biológica y de la salud debido a su bajo costo, baja toxicidad y porque es posible generar nanopartículas con un tamaño relativamente uniforme [36,41,42].

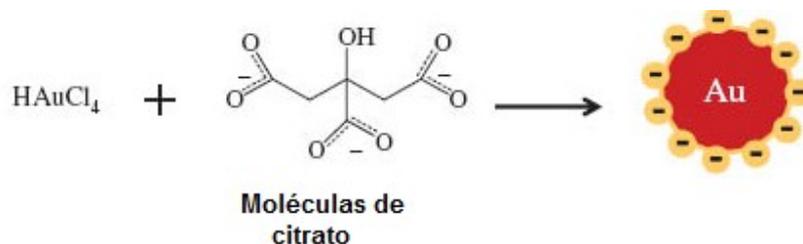
Su síntesis consiste en la reducción de los iones  $\text{Au}^{3+}$  en una disolución acuosa diluida de  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$  (1 mM) en caliente (ebullición), usando citrato trisódico (38.8 mM). Cuando se añade el agente reductor, los átomos de  $\text{Au}^0$  solvatados se forman en la solución, y su concentración se eleva rápidamente hasta que alcanza la saturación, dado su baja solubilidad en agua [37,42].

Las nanopartículas de oro se forman por un proceso llamado nucleación. Los restantes átomos de oro disueltos se unen a los núcleos coloidales y se produce el crecimiento de las partículas (**figura D**). Se genera así a una suspensión coloidal rojiza de nanopartículas de oro con un diámetro promedio relativamente uniforme, en este caso, de 13.5 nm y que además presenta un pico de absorción, en este caso a una longitud de onda de 522 nm [37]. Los iones de citrato neutralizan la acidez de la disolución y quedan posteriormente adsorbidos en la superficie de las nanopartículas de oro.



**Figura D.** Proceso de nucleación de los átomos de oro en solución después de adicionar un agente reductor [83].

Además generalmente, las nanopartículas son generalmente inestables debido a su alta energía superficial y requieren ser estabilizadas contra la agregación por medio de modificaciones en su superficie (**figura E**), en este caso la repulsión de la carga negativa de los iones de citrato estabiliza las partículas individuales de Au<sup>0</sup> previniendo que las nanopartículas de oro se agreguen [36].



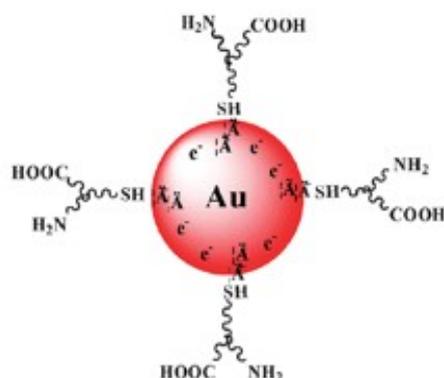
**Figura E. Esquema de la estabilización de las Au-NPs mediante la adsorción del ión citrato a su superficie [84].**

Es importante considerar que las dimensiones y características de las nanopartículas producidas depende de varios factores como son: la concentración de la disolución de ácido cloroaúrico, la concentración del citrato, la temperatura de calentamiento, el pH del medio y el tiempo de reacción [44].

Entender el modo en que biomoléculas como aminoácidos, bases de DNA, y péptidos simples interaccionan con las nanopartículas de oro es crítico para el diseño de dispositivos de detección [28]. Se sabe que grupos funcionales como los ciano (-CN), mercapto (-SH), y amino (-NH<sub>2</sub>) presentan una alta afinidad por el oro.

En particular, la interacción de las nanopartículas de oro con cisteína (Cys) y sus derivados es la base de un número de bionanotecnologías. El proceso más importante es la agregación (o dispersión), que permite una gran variedad de métodos de detección colorimétricos.

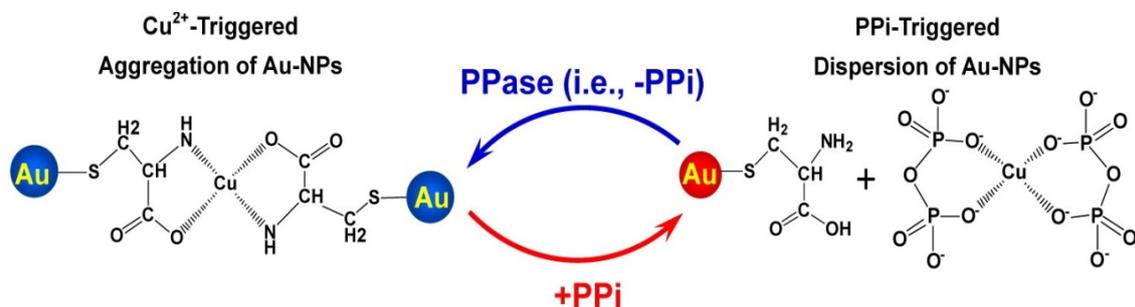
La cisteína tiene una afinidad particularmente elevada para el oro debido al grupo sulfhidrilo (tiol) en su cadena lateral, que permite su anclaje a superficies metálicas mediante enlaces covalentes (**figura F**) [38,39]. La cisteína es capaz de unirse a su vez mediante sus grupos amino y carbonilo libres a metales divalentes como el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc.



**Figura F.** Esquema de la interacción entre la superficie de las Au-NPs y el grupo tiol de la cisteína [33].

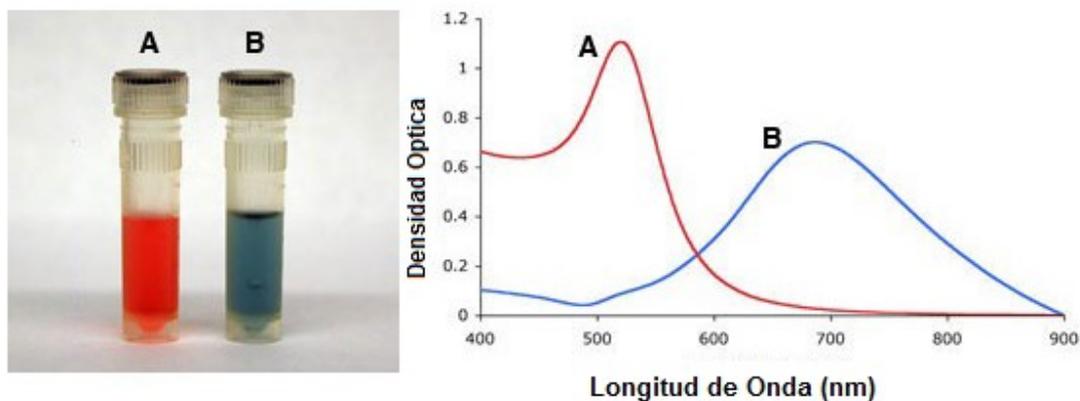
#### - **Medición de actividad PPiase en tiempo real propuesta**

Este proyecto se basa en un trabajo publicado recientemente [33] que propone el uso de nanopartículas de oro estabilizadas con cisteína, las cuales en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  entran en un proceso de agregación aparentemente irreversible. Dicha agregación puede prevenirse con la presencia de PPI que reduce la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  libre, debido a la mayor afinidad que presenta el  $\text{Cu}^{2+}$  por el PPI, en comparación con los grupos libres de la cisteína que estabiliza las nanopartículas de oro. La subsecuente adición de siPPiase a la suspensión de nanopartículas en presencia de PPI y  $\text{Cu}^{2+}$  hidroliza el PPI, libera iones  $\text{Cu}^{2+}$  y permite la agregación de las nanopartículas (**figura G**).



**Figura G. Fundamento del ensayo a estudiar.** Las Au-NPs se estabilizan con una solución 25  $\mu\text{M}$  de Cys por 30 min a 25°C antes de realizar los ensayos. El  $\text{Cu}^{2+}$  induce la agregación de las AuNPs-Cys, por coordinación con la Cys que recubre las Au-NPs. La presencia previa de PPi en la disolución previene la agregación de las Au-NPs debido a la mayor afinidad que tiene por  $\text{Cu}^{2+}$ . La siPPiase hidroliza al PPi y libera al  $\text{Cu}^{2+}$  que induce la agregación, lo cual puede seguirse espectrofotométricamente [33].

El  $\text{Cu}^{2+}$  libre en la solución media la agregación de las nanopartículas de oro, cuyo color cambia de rojo a azul-violeta, con un nuevo pico de absorción a 650 nm (**figura H**).



**Figura H. A) Disolución de Au-NPs en estado disperso, B) Disolución de Au-NPs en estado agregado [86].**

Se propone utilizar este cambio colorimétrico entre los estados de agregación/dispersión de las nanopartículas de oro para monitorear en tiempo real

la actividad siPPiase midiendo continuamente la relación de absorbencia a la longitud de onda de 650 nm y 522 nm en un espectro dependiente del tiempo UV-vis en dispersiones de nanopartículas de oro que contienen siPPiase.

Para calcular la cinética de la hidrólisis catalizada por siPPiase de PPI, los valores de  $A_{650}/A_{522}$  requieren ser convertidos a concentraciones de PPI para obtener los cambios dependientes del tiempo de las concentraciones de PPI en preparaciones que contienen PPIase **[33]**. Esto debe hacerse mediante una curva patrón detallada, ya que la relación entre la tasa de agregación de las nanopartículas, la concentración de catión divalente y la concentración remanente de PPI no es lineal, estando gobernada por los equilibrios químicos múltiples en disolución, además de que el proceso de agregación es un fenómeno que involucra fenómenos de transferencia de masa entre el bulto de la disolución y la superficie de las nanopartículas en suspensión coloidal.

### 3. JUSTIFICACION

En la actualidad se tienen estudios cinéticos y estructurales de las pirofosfatasas inorgánicas solubles provenientes de *Arabidopsis thaliana*. Se sabe que existen seis isoformas [22], su estructura [89], la secuencia que codifica para cada una [88], su localización aproximada dentro de la célula [24], que utilizan  $Mg^{2+}$  como activador esencial [1,77,22] se ha determinado la especificidad por su sustrato para al menos dos de ellas [1] y se sabe que su actividad se ve inhibida por otros metales divalentes, incluido  $Ca^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  [1].

En contraste con el caso de *A. thaliana*, de las pirofosfatasas que expresa *Capsicum annuum* “serrano” no se tiene mucha información. Trabajos realizados anteriormente determinaron que hay una elevada actividad pirofosfatasa en cromoplastos, y que dicha actividad corresponde al menos a una proteína que requiere  $Mg^{2+}$  como activador esencial, la cual reconoce de manera específica al PPI como sustrato [29].

En trabajos recientes realizados en laboratorio del Dr. Rogelio Rodríguez, se han podido separar de diversos tejidos de la planta de *Capsicum annuum* “serrano” extractos que contienen actividad de siPPiase, mediante cromatografía de intercambio hidrofóbico, obteniéndose los perfiles de elución en los diferentes tejidos de la planta y fruto en columnas de Phenyl-Sepharose® [31]. Se determinó que el perfil de actividad de pirofosfatasa varía en cada tejido de la planta, siendo la placenta del fruto el tejido con mayor actividad pirofosfatasa.

Las concentraciones de PPI en las células vegetales no se ven modificadas aun bajo condiciones de estrés, como las de bajo fosfato [15,16]. Sin embargo, bajo éstas u otras condiciones, la forma en la que se regula la actividad pirofosfatasa en las células es desconocida. En particular, se ha sugerido que el  $Ca^{2+}$  podría regular su actividad, pero esto no está bien demostrado para sistemas vegetales [4].

La mayoría de los métodos para medir esta actividad pirofosfatasa se basan en la cuantificación de su producto, el ortofosfato, en específico, como se ha comentado antes, el que se emplea en el laboratorio donde se realizó este proyecto es un método basado en la formación de fosfomolibdato en un medio muy ácido para hacerlo reaccionar con el cromóforo verde de Malaquita, con la adición de un detergente (Brij-35) como estabilizante, para formar un compuesto colorido, el cual puede ser monitoreado espectrofotométricamente.

El ensayo de verde de Malaquita es muy sensible, pero no es compatible con el monitoreo de la actividad enzimática en tiempo real. Además, no es compatible con experimentos en los que se añada el producto fosfato, como posible inhibidor de la actividad, ya que la elevada sensibilidad del reactivo de verde de Malaquita al fosfato se traduce en la saturación del método, haciendo imposible obtener un valor confiable para la diferencia entre el fosfato añadido desde el inicio y el fosfato producido por la hidrólisis enzimática de fosfato.

El ensayo desarrollado en este trabajo permite, a diferencia de los métodos clásicos, monitorear la actividad en tiempo real de las pirofosfatasas, tanto aquellas obtenidas de forma recombinante como las extraídas directamente de los tejidos vegetales. Este método se fundamenta en la agregación selectiva de nanopartículas de oro (Au-NPs) ( $d = 13$  nm) inicialmente estabilizadas en estado monodisperso por cisteína y cuyo espectro de absorción, entre 522 y 650 nm, cambia al agregarse. A diferencia del método reportado, la agregación se da cuando el catión  $Mg^{2+}$  se compleja con la cisteína que recubre las Au-NPs. El ion PPI puede usarse para quelar el  $Mg^{2+}$  e impedir la agregación de las Au-NPs, lo que permite una estimación de la concentración de PPI remanente en tiempo real. La degradación del PPI por las siPPiases puede seguirse entonces por la agregación de las Au-NPs.

Este monitoreo en tiempo real es posible debido a que el medio donde se realiza la reacción de hidrólisis catalizada por la pirofosfatasa presenta un pH cercano a la neutralidad, además de que la concentración de nanopartículas de oro utilizadas es muy baja y su superficie está recubierta por cisteína, por lo que no interfieren

con la actividad de la fosfohidrolasa. Otra gran diferencia es que en este caso el método se basa en la cuantificación de P<sub>PPi</sub> y no de P<sub>Pi</sub>, como en los métodos tradicionales, lo que permitiría estudiar la actividad en concentraciones moderadas de fosfato, como las que existen en condiciones fisiológicas en la célula vegetal siempre que se establezca el rango de concentraciones en las que este compuesto puede usarse sin interferir con el método.

No se tienen reportes hasta el día de hoy del efecto que puede causar concentraciones elevadas de fosfato inorgánico en la actividad pirofosfatasa, por lo que estos estudios resultan de gran valor para entender la regulación de estas proteínas *in vivo*.

En este trabajo se busca determinar si es posible que el P<sub>Pi</sub> generado como producto de la hidrólisis de P<sub>PPi</sub> catalizada por las pirofosfatasas pueda, de alguna manera, contribuir a modular la actividad de dichas enzimas *in vivo*.

## **4. HIPOTESIS**

La agregación de nanopartículas de oro es mediada por  $Mg^{2+}$  y esto permite monitorear en tiempo real la disminución en la concentración de pirofosfato en una disolución en la que la pirofosfatasa inorgánica soluble está hidrolizando este sustrato. Aplicando este método se observará que el fosfato inhibe de manera diferente a dos pirofosfatasas de diferente origen.

## 5. OBJETIVOS

### **A. Objetivo General**

- Montar un ensayo de actividad en tiempo real para pirofosfatasas inorgánicas solubles basado en la agregación de Au-NPs mediada por  $Mg^{2+}$  y emplearlo para determinar la inhibición de esta enzima por fosfato, en sistemas vegetales.

### **B. Objetivos Particulares**

- Demostrar que las variaciones de concentración de  $Mg^{2+}$  modifican la agregación de las Au-NPs.
- Demostrar que existe una relación predecible y reproducible entre la tasa de agregación de Au-NPs y las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y PPI.
- Demostrar que la agregación de Au-NPs mediada por  $Mg^{2+}$  en el ensayo tiene la sensibilidad suficiente para servir para monitorear la concentración de PPI en rangos compatibles con la medición de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble.
- Explorar las condiciones adecuadas para ensayar la actividad de pirofosfatasa inorgánicas solubles en tiempo real.
- Medir la actividad PPIasa a diferentes concentraciones de PPI con el ensayo de Au-NPs y comparar el resultado con el ensayo de punto final de verde de Malaquita.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de fosfato inicial en la sensibilidad del ensayo de Au-NPs.
- De ser positivo el ensayo anterior, medir la inhibición de la pirofosfatasa inorgánica soluble recombinante (AtPPa1) por fosfato inorgánico con el ensayo de Au-NPs
- Comparar la relevancia de dicha inhibición empleando una proteína purificada directamente del tejido placentario del fruto de *Capsicum annum* L. 'serrano'.

## 6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### A. Síntesis de las nanopartículas de oro ( $d = 13 \text{ nm}$ )

- 1) Se prepararon 100 mL de una disolución 1 mM de ácido cloroaúrico ( $\text{HAuCl}_4$ ), que se calentó hasta alcanzar su punto de ebullición, con agitación constante.
- 2) A la disolución anterior se le adicionaron 10 mL de una disolución 38.8 mM de citrato trisódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y se mantuvo en ebullición con agitación constante por 30 minutos más hasta tener una disolución de color rojo-vino uniforme.
- 3) Se dejó enfriar la solución coloidal y se pasó por un filtro con un tamaño de poro  $0.65 \mu\text{m}$  de la marca Milipore<sup>®</sup> para remover el agregados no coloidales.
- 4) Se almacenó la solución a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.
- 5) Se realizó un barrido de absorción desde 200 nm hasta 800 nm. La suspensión coloidal obtenida debe presentar un pico de absorción a 522 nm.
- 6) Antes de usar dicha suspensión de nanopartículas de oro se ajustó a una absorbancia de 0.6 a 522 nm. Esto equivale a una suspensión 5 nM de Au-NPs, aproximadamente. Para las mediciones de absorbancia de esta disolución se empleó un espectrofotómetro UV-Vis OPTIZEN POP<sup>™</sup>.

### B. Ensayos de actividad de PPiasea utilizando $\text{Cu}^{2+}$ o $\text{Mg}^{2+}$ como agente agregante.

- 1) *Estabilización de las Au-NPs con cisteína:*

- La disolución AuNPs-Cys se preparó agregando por cada 1 mL de suspensión de Au-NPs 5 nM 0.260 mL de una disolución 25  $\mu$ M de cisteína.
- La suspensión anterior se dejó incubar por 30 min a 25 °C en un baño Lab Companion RW-0525G.

## **2) Ensayos de agregación de las nanopartículas de oro con $\text{Cu}^{2+}$ y $\text{Mg}^{2+}$**

- Todos los ensayos utilizando Au-NPs se realizaron en placas multipozos *Elisa*, en un volumen final de 250  $\mu$ L y empleando 146  $\mu$ L de la solución de AuNPs-Cys. Se variaron las concentraciones finales del PPI, Pi,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , EDTA y Tris-HCl. La absorbencia a 522 nm y 650 nm se registró a los tiempos indicados en cada pozo usando un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek™.
- y/o enzima siPPiase AtPPa1 recombinante purificada o la extraída de *Capsicum annuum*, según se indican en cada caso.

## **3) Medición de la actividad pirofosfatasa**

- Todos los ensayos de actividad utilizando Au-NPs se realizaron de igual forma en placas multipozos *Elisa*, en un volumen final de 250  $\mu$ L y empleando 146  $\mu$ L de la solución de AuNPs-Cys. Se adiciono PPI, Pi,  $\text{Mg}^{2+}$ , Tris-HCl a las concentraciones finales que indica cada ensayo y la cantidad de enzima siPPiase AtPPa1 recombinante purificada o la extraída de *Capsicum annuum*, según se indican en cada caso. La absorbencia a 522 nm y 650 nm se registró a los tiempos indicados en cada pozo usando un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek™.

## **C. Obtención de Proteína Recombínate AtPPa1**

### **1) Inducción de la expresión de la proteína**

- Con el fin de obtener suficiente proteína, se cultivó un inóculo de células *E.coli*-BL21 (DE3) transformadas con el plásmido portador de la secuencia codificante para la proteína de fusión AtPPa1-GST en 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL a 37 °C, con agitación constante durante toda la noche.
- De este inóculo se tomó 1 mL y se le adicionó a un matraz Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de medio estéril adicionado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Se incubó a 37 °C, con agitación constante, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Se adicionó IPTG como inductor a una concentración final de 0.5 mM y se incubó a 25 °C en agitación constante por 12 horas.

## **2) Extracción de proteína soluble**

Una vez terminada la inducción del cultivo de bacterias transformadas, se procedió a extraer la proteína soluble como a continuación se describe:

- Se centrifugó el medio a 2500 g por 10 minutos.
- Se decantó el medio LB, se resuspendió el paquete bacteriano en 10 mL de amortiguador de lisis celular (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y EDTA 0.1 mM, adicionado con inhibidor de proteasas Complete<sup>TM</sup>) y sometió a sonicación en baño de hielo (15 repeticiones de 30 segundos, espaciadas por 30 segundos de enfriamiento).
- Se centrifugó a 17 000 g por 20 minutos y se colectó el sobrenadante.
- El sobrenadante con la proteína AtPPa1 se filtró por una membrana de 65 µM de la marca Milipore<sup>®</sup>.

## **3) Purificación con Glutathione Sepharose<sup>TM</sup>.**

- Se equilibró la columna de Glutathione-Sepharose™ con amortiguador de lisis (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y EDTA 1 mM).
- Se hizo pasar por la columna el extracto proteico obtenido a un flujo de 1 mL por minuto, con lo cual la proteína de fusión AtPPa1-GST quedó en la fase estacionaria.
- Se lavó la columna con amortiguador de lisis, posteriormente, con una solución de Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM y NaCl 10 mM y, finalmente, con una solución de Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM.
- Se eluyó con el buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, adicionado con de glutatión reducido a una concentración final de 15 mM.

#### **4) Cuantificación de Proteína.**

- La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica Bradford en placas Elisa, usando una curva patrón de 0 a 3.6 µg de proteína en un volumen total de 50 µL. La muestra a cuantificar se diluyó en un volumen total de 50 µL tanto a la curva como a la muestra y posteriormente se les adicionaron 200 µL de reactivo de *Bio-Rad Quick Start™ Bradford Protein Assay*. Se procedió a leer la placa a una A<sub>595</sub> en un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek™.

#### **5) Digestión de la enzima con Trombina**

- Mediante diálisis se eliminó el glutatión de la proteína, colocando la bolsa de diálisis que contiene la proteína en 2 x 2 L de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM y se dejó en agitación constante por 2 horas.
- Se recuperó el dializado y, una vez cuantificado el contenido de proteína, se le adicionó al extracto proteico 10 U de trombina por cada miligramo de proteína de fusión (AtPPa1-GST). Se dejó incubando a 25 °C, por 12 horas.

- Se procedió a adicionar al extracto proteico NaCl a una concentración final de 0.5 M.
- Se adicionó 40  $\mu$ L de Benzamidine Sepharose™ y se incubó a 25 °C, por 1 hora, con agitación constante. Luego, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Este procedimiento se repitió con una segunda adición de 20  $\mu$ L de resina.
- Se adiciono benzamidina 1 mM para prevenir cualquier actividad proteasa.
- Se hizo pasar el extracto proteico digerido nuevamente por la columna de glutatión agarosa (previamente regenerada) una vez más a un flujo de 1 mL por minuto, con lo cual se retiene a la proteína de fusión AtPPa1-GST que no hubiera sido digerida y la etiqueta GST digerida, libre de la fusión con AtPPa1. La proteína AtPPa1 purificada eluye con la fase móvil en el lavado de la columna.
- Se lavó la columna con 5 mL de amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM.
- Se concentró la fracción eluída que contiene a la proteína colocándola en una bolsa de diálisis con un tamaño de poro 6-8 KDa y se colocó en una cama con hojuelas de polietilenglicol 20000 (PEG-20K), se cubrió la superficie de la bolsa con más hojuelas de PEG-20K y se recubrió con poliacrilato-polialcohol, (partículas de 100-850  $\mu$ m). La bolsa de diálisis se almacenó a 4°C y se dejó concentrando hasta quedar un volumen menor 3 mL.
- La proteína se filtró por una membrana de 65  $\mu$ M de la marca Milipore y se alicuotó en tubos Eppendorf estériles con 30  $\mu$ L de proteína concentrada en cada tubo y se almacenó a -72 °C sin ningún tipo de crioprotector, hasta su empleo.
- Se midió la cantidad de proteína con el método Bradford para posteriormente realizar una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, para comprobar la integridad y pureza de la proteína.

#### ***D. Obtención de pirofosfatasa en placenta de *C. annuum****

- 1) Se retiró con un bisturí el tejido placentario del fruto y se pesaron 2 g de tejido (sin semillas).
- 2) Una vez pesado el tejido este se molió con nitrógeno líquido.
- 3) Se le adicionaron al tejido molido 10 mL de buffer de columna (Tris-HCl pH 7.5 0.1 M, EDTA 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 3 mM) con inhibidor de proteasas (Complete™, Roche, 1 tableta por cada 50 mL). Se resuspendió perfectamente el tejido en el buffer con la ayuda de un vortex.
- 4) Se procedió a centrifugar a 6000 g por 15 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante con la ayuda de una pipeta evitando llevarse el precipitado.
- 5) A continuación, se ultracentrifugó el sobrenadante nuevamente a 45 000 g por 1 hora y 10 minutos a 4°C y con la ayuda de una pipeta se volvió a retirar el sobrenadante.
- 6) Se adicionó al sobrenadante obtenido sulfato de amonio a una concentración final de 0.5 M.
- 7) Este sobrenadante se filtró primero por una membrana con un tamaño de poro de 0.65 µm y luego, otra vez, por una de 0.22 µm, ambas de la marca Milipore.
- 8) Se debe medir el volumen de la muestra antes de inyectar a la columna de Phenyl-Sepharose™ (HPLC), que en este caso tiene 13 mL de resina y que por diseño del equipo admite 12 mL como máximo. El contenido total de proteína de la muestra, tampoco debe rebasar la capacidad total de la columna (50 mg).
- 9) La elución se realizó primero con amortiguador de columna conteniendo 0.5 M de sulfato de amonio. Luego se eluyó con un gradiente simultáneo de 0.5 a 0 M de sulfato de amonio y 0 a 50% (v/v) de etilén glicol, en 5 volúmenes de cama (65 mL) y, finalmente, un lavado con 65 mL de etilén glicol al 50% (v/v) en amortiguador de columna. Se colectaron fracciones de 3 mL y una

vez obtenidas las fracciones de proteína se midió su actividad PPIasa y su contenido de proteína.

- 10) Una vez determinadas las fracciones con mayor actividad PPIasa se colocaron dentro de una bolsa de diálisis con un tamaño de poro 6-8 KDa y se sumergió la bolsa en 2 x 2 L de buffer Tris-HCl pH 7.5 0.1 M y MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, dejándose dializar en agitación constante a 4 °C, por 2 horas.
- 11) Una vez dializada la proteína se concentró dentro de la misma bolsa de diálisis utilizando una cama con hojuelas de PEG-20K se cubrió la superficie de la bolsa con más hojuelas y se colocó encima de la bolsa poliacrilato-polialcohol (como antes, partículas 100-850 µm). La bolsa de diálisis se almacenó a 4°C y se dejó concentrando que su volumen se redujo hasta una quinta parte aproximadamente.
- 12) La proteína concentrada fue alicuotada en tubos Eppendorf con 10 µL de proteína en cada tubo y se almacenó a -72 °C sin ningún tipo de crioprotector, hasta su empleo. Se evitaron los ciclos repetidos de congelamiento-descongelamiento, ya que la actividad se pierde en los primeros ciclos.
- 13) Se midió la concentración de proteína con el método Bradford para posteriormente realizar una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, para comprobar la integridad y pureza de la proteína.

#### ***E. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.***

- 1) Para realizar la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se prepararon geles de poliacrilamida, cuya composición se describe en la **tabla 1**.

**Tabla 1. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados para la electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (1 gel).**

<b>Disolución</b>	<b>Gel Separador (mL)</b>	<b>Gel Concentrador (mL)</b>
Acrilamida 30%/ Bis-Acrilamida 8%	4	0.67
Amortiguador para gel separador (Tris-HCl 0.75M pH 8.8, SDS 0.2%, Urea 6M)	2.5	0
Amortiguador para gel concentrador (Tris-HCl 0.25M pH 8.8, SDS 0.2%, Urea 6M)	0	1.25
Agua destilada	3.35	3
SDS 10%	0.1	0.05
<i>Desgasificar la disolución con vacío durante 10 minutos</i>		
TEMED	0.1	0.0125
Persulfato de amonio 10%	0.004	0.00125

- 2) A 10 µg (en un volumen final de 10 µL) de la muestra a cargar en el gel se le adicionaron 10 µL de amortiguador de carga y se calentó a 70° C, por 5 minutos.
- 3) Se colocaron los 20 µL de cada muestra en cada carril del gel preparado y junto a ellas un marcador de peso molecular.

- 4) El gel se corrió a 90 mV (aproximadamente a 100 mA) por un periodo de aproximadamente 2 horas.
- 5) Se retiró el gel de entre los vidrios, se lavó con agua destilada y se dejó en solución de fijación (Ácido acético 10%, MetOH 30%) toda la noche.
- 6) Se retiró la solución de fijación y se realizaron 4 lavados con agua destilada de 15 minutos cada uno.
- 7) Se aplicó finalmente una disolución de reactivo *Silver Coomassie* [87] para teñir el gel y se dejó tiñéndose toda una noche en agitación constante.
- 8) Se utilizaron lavados con agua destilada para desteñir el gel.

#### ***F. Medición de la actividad pirofosfatasa – Ensayo de verde de Malaquita (VM)***

- 1) Antes de realizar el ensayo de VM es necesario que todo el material de vidrio empleado sea lavado con detergente libre de fosfatos (Extran™) y se enjuague con ácido nítrico al 10%, seguido de enjuague con agua desionizada abundante.
- 2) La medición de actividad se llevó a cabo determinando la cantidad de Pi liberado a partir de PPi por minuto, el ensayo se realizó en placas multipozo de 12x8. Se tomó un volumen conocido de la enzima purificada y se adicionó en un pozo con amortiguador a una concentración final Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, PPi 80  $\mu$ M con y sin MgCl<sub>2</sub> 3 mM y agua para tener un volumen total final de 50  $\mu$ L y se dejó incubar de 5 a 10 minutos, tras lo cual, se paró la reacción con 0.2 mL de reactivo de verde de Malaquita (RVM) preparado como se indica en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Composición del reactivo verde de Malaquita para la cuantificación de ortofosfato generado por la hidrólisis del PPi catalizada por la pirofosfatasa.**

<b>Disolución</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Verde de Malaquita con 2 N de HCl	2
Molibdato de amonio 6 N	1
Brij al 3 %	1
Agua destilada	9

- 3) Una vez que se adicionó el RVM se midió la absorbencia de cada pozo a una longitud de onda de 595 nm. Se empleó para esto un espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek™.
- 4) Para determinar la cantidad de fosfatos producida por la enzima se preparó una curva patrón con fosfato de sodio a concentraciones desde 0.1 a 10 nm por cada 50 mL en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, PPi 80  $\mu$ M y MgCl<sub>2</sub> 3 mM y se adicionaron 0.2 mL de RVM.

## 7. RESULTADOS

### ***A. Montaje del método utilizando Au-NPs para medir la actividad pirofosfatasa en tiempo real.***

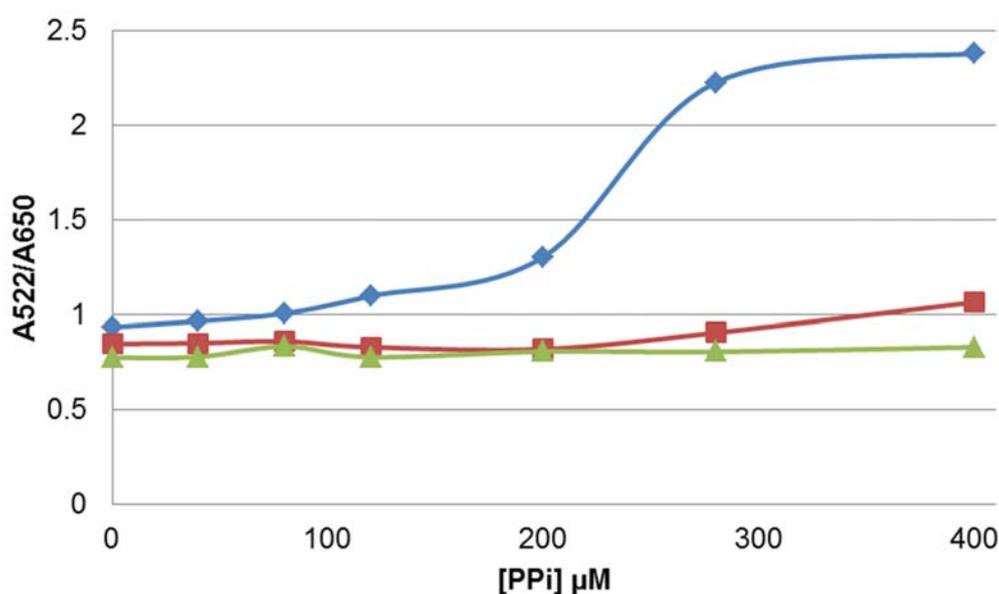
Deng *et al.* [33] propusieron un método para la cuantificación de pirofosfato (PPi) en disolución, basado en la competencia entre las nanopartículas de oro estabilizadas por cisteína y el PPi por los iones de  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos autores propusieron que dicho método podría ser empleado para monitorear la actividad de las pirofosfatasas inorgánicas solubles, en virtud de que es un método que resulta sensible, puede ser realizado en medio acuoso a pH neutro y a que las nanopartículas son compatibles con la proteína, ya que se encuentran recubiertas por la cisteína, evitando que atrapen proteína en su superficie.

Cada uno de los resultados mostrados en este trabajo fueron repetidos por lo menos tres veces y las figuras mostradas fueron las más representativas para cada caso.

Como prueba inicial evaluaron el cambio en la señal del sistema cuando a la mezcla de PPi,  $\text{Cu}^{2+}$  y Au-NPs se le añade pirofosfatasa inorgánica soluble (PPi<sub>asa</sub>) de levadura [33]. Desafortunadamente, el  $\text{Cu}^{2+}$  es un pobre activador de la PPi<sub>asa</sub> de levadura y, además, es un inhibidor de la PPi<sub>asa</sub> de otras fuentes, incluidas las de origen vegetal [1,2], las cuales usan  $\text{Mg}^{2+}$  como activador fisiológico.

En consecuencia, desde un inicio se tuvo claro que se debía evaluar el efecto de  $\text{Mg}^{2+}$  en el método reportado. Para esto se realizaron ensayos en los que se reprodujo el sistema reportado por Deng *et al.* [33], pero en los que se evaluó el cambio en el cociente de absorbencias  $A_{522}/A_{650}$  en disoluciones en las que se varió la concentración de PPi desde 0 a 400  $\mu\text{M}$ , en presencia de tres diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  (0, 80 y 160  $\mu\text{M}$ ) y manteniendo constante la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  de 400  $\mu\text{M}$ , en todos los casos (**figura 1**).

Una primera observación es que el orden de adición de los componentes es determinante, ya que cuando las Au-NPs y el  $\text{Cu}^{2+}$  se añadían antes que el PPI, la coloración de la Au-NPs cambiaba (de rojo a azul), indicando agregación, pero la adición posterior de PPI no revertía dicha agregación (datos no mostrados), al menos en un tiempo razonablemente corto ( $\sim 1$  h). Por esa razón, todos los experimentos se realizaron añadiendo primero las Au-NPs, luego el PPI, luego el o los cationes divalentes y cuando se indica, la proteína, siempre al final.

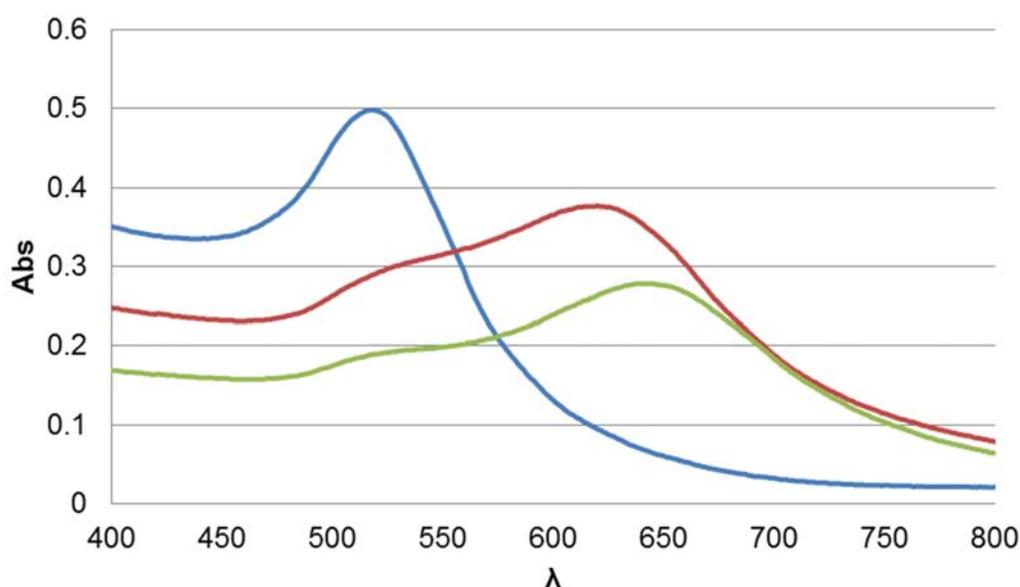


**Figura 1.** Efecto de la adición de  $\text{Mg}^{2+}$  0  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ ), 80  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ) y 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ) al variar la concentración de PPI (0 – 400  $\mu\text{M}$ ) en un medio con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  en la disolución de AuNPs-Cys.

En la **figura 1**, se muestra que en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , la señal de las Au-NPs responde a la presencia de PPI en un rango de concentración entre 200 y 300  $\mu\text{M}$  (**figura 1**,  $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ ). En contraste, los pozos con 80  $\mu\text{M}$  (**figura 1**,  $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ) o 200  $\mu\text{M}$  (**figura 1**,  $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ) de  $\text{Mg}^{2+}$  se observó el cambio de coloración de las Au-NPs semejante al que se observa en ausencia de PPI y en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ . Este resultado indica

que la presencia de  $Mg^{2+}$  en el medio también induce la agregación de las Au-NPs.

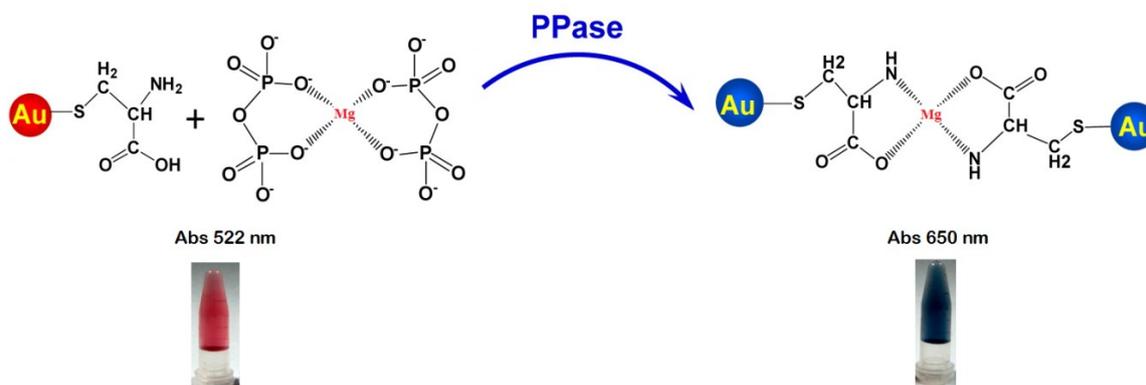
Para comprobar la agregación de las Au-NPs mediada por  $Mg^{2+}$ , se realizó un espectro de absorción de las Au-NPs en disolución con  $Mg^{2+}$  desde 400 nm hasta 800 nm. Este resultado (**figura 2**) confirmó que el  $Mg^{2+}$  es capaz de mediar la agregación de las Au-NPs, observándose el cambio en el pico de absorción de 650 nm, igual al observado en presencia de  $Cu^{2+}$ . Este resultado fue inesperado, porque no se observó mucha diferencia entre el tiempo requerido para la agregación de Au-NPs con  $Cu^{2+}$  que con  $Mg^{2+}$ , a pesar de que la afinidad de la cisteína y el PPI por el  $Cu^{2+}$  es mucho mayor que la afinidad del  $Mg^{2+}$ , en condiciones de equilibrio química acuoso.



**Figura 2.** Espectro de absorción (400-800nm) de la disolución de AuNPs-Cys (3.96 nm), en ausencia de cationes (—), con 160 μM de  $Mg^{2+}$  (—) o con 320 μM de  $Cu^{2+}$  (—).

Además de lo observado anteriormente, se determinó que a diferencia de lo reportado [33] la agregación inducida tanto por el  $Cu^{2+}$  como por el  $Mg^{2+}$  es

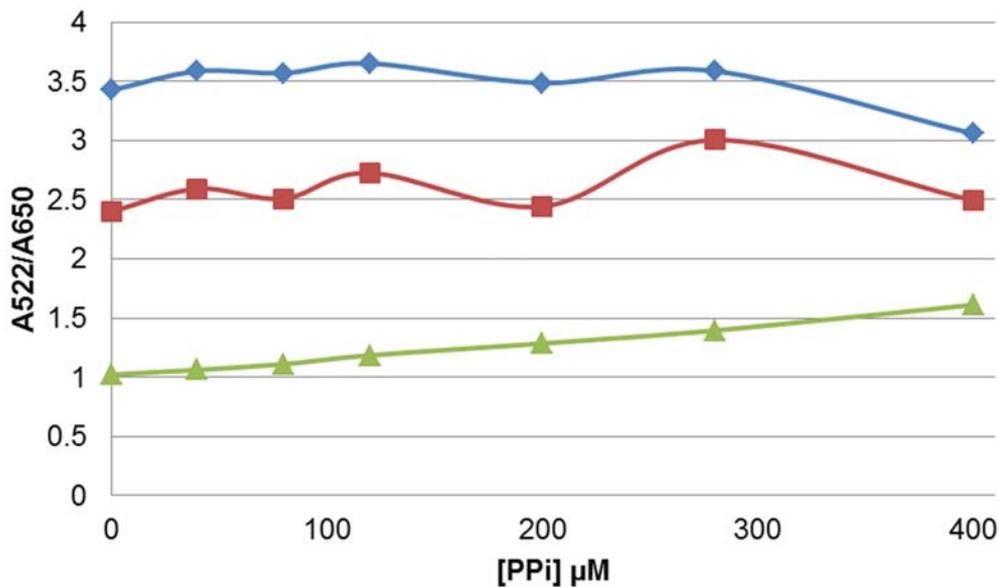
irreversible, al menos bajo las condiciones y tiempos en los cuales se llevó a cabo este trabajo.



**Figura 3. Ensayo propuesto utilizando  $Mg^{2+}$  como único agente agregante. El  $Mg^{2+}$  induce la agregación de las AuNPs-Cys, por coordinación con la Cys que recubre las Au-NPs. La presencia previa de PPI en la disolución previene la agregación de las Au-NPs debido a la mayor afinidad que tiene por  $Mg^{2+}$ . La siPPiase hidroliza al PPI y libera al  $Mg^{2+}$  que induce la agregación, lo cual puede seguirse espectrofotométricamente.**

Se sugiere entonces que el  $Mg^{2+}$  puede agregar a las Au-NPs, estabilizadas inicialmente con cisteína, uniéndose a los grupos carboxilo y amino del aminoácido. El  $Mg^{2+}$  tiene más afinidad por el ion pirofosfato que por la cisteína y al igual que en el ensayo con  $Cu^{2+}$ , este PPI reduce la concentración de  $Mg^{2+}$  libre (químicamente activo) disponible para agregar a las Au-NPs (**figura 3**).

Ya se ha mencionado que el  $Cu^{2+}$  está reportado como un inhibidor de varias siPPiases [1,5], así que se evaluó el comportamiento del sistema con  $Mg^{2+}$  como único inductor de agregación. El ensayo de agregación de las Au-NPs seguidas por cociente de absorbencias  $A_{522}/A_{650}$  en disoluciones que contenían PPI a concentraciones variables (0 - 400  $\mu M$ ) y a tres diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  (80, 160 y 320  $\mu M$ ) se muestra en la **figura 4**.



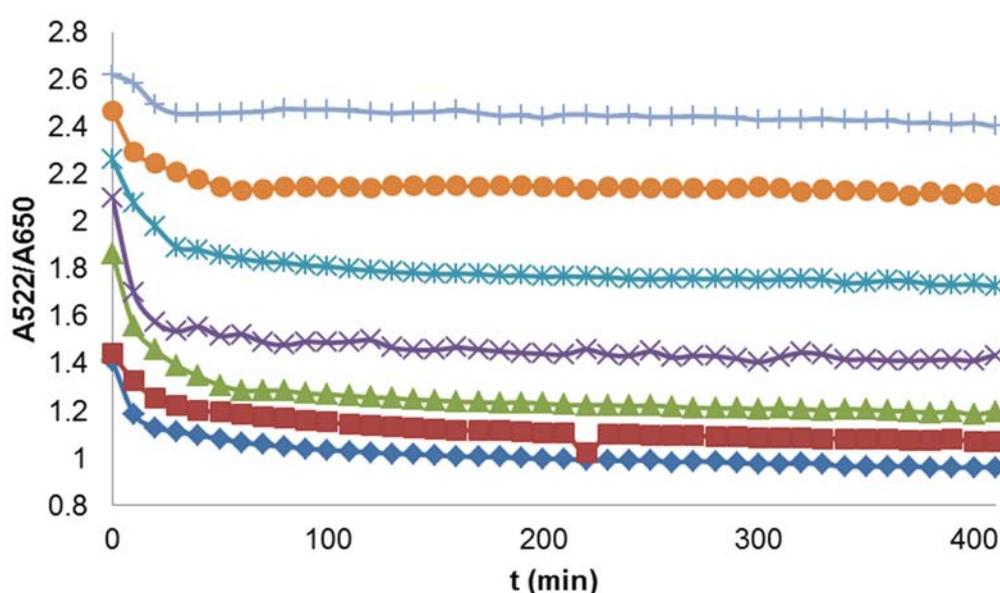
**Figura 4.** Efecto de la variación de la concentración PPI (0-400  $\mu\text{M}$ ) a tres diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  80  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ ), 160  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacksquare\text{---}$ ) y 320  $\mu\text{M}$  ( $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ ) en la disolución de AuNPs-Cys.

Los resultados mostraron un cambio lineal en la relación de absorbencias  $A_{522}/A_{650}$  frente a la concentración de PPI en presencia de 320  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ . Este ensayo fue repetido varias veces, pero los resultados mostraban variabilidad, pues se observó que el color de las disoluciones no permanecía estable en el tiempo, por lo que la pericia del operario y el número de muestras preparadas influía en el resultado final. Esto sugería que las variaciones se podían deber a la inestabilidad del sistema, ya sea porque no estaba en equilibrio, porque existía un proceso de agregación bifásico con una segunda fase lenta, o a la reacción de hidrólisis espontánea del PPI.

Para determinar si algún componente del sistema promovía hidrólisis no enzimática de PPI, se determinó la aparición de Pi en el medio de reacción, usando el método de verde de Malaquita, pero separando las Au-NPs, pues este podría interferir con el método de VM. Se realizó con este fin una microdiálisis, quedando retenidas las Au-NPs dentro de la bolsa de diálisis y permitiendo solo la salida del Pi. En dichas mediciones la aparición de Pi resultó indetectable, durante, al menos las primeras 6 horas, lo que indica que el PPI no está sufriendo una tasa

apreciable de hidrólisis en el sistema a temperatura ambiente, durante el tiempo de preparación de incubación del sistema de Au-NPs, en la presencia de  $Mg^{2+}$ .

Se analizó entonces la estabilidad del sistema monitoreando el cambio de absorbencias  $A_{522}/A_{650}$  a través del tiempo, en este caso 7 horas, en disoluciones de Au-NPs a una concentración constante de  $Mg^{2+}$  ( $320 \mu M$ ), a diferentes concentraciones de PPI ( $0-400 \mu M$ ; **figura 5**).



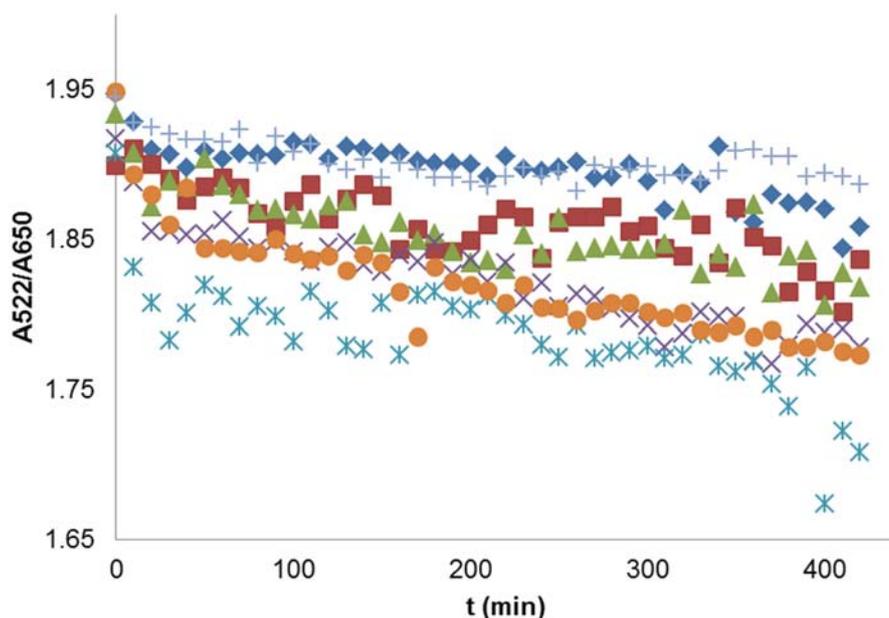
**Figura 5.** Curso temporal de la estabilidad de la disolución AuNPs-Cys con  $Mg^{2+}$   $320 \mu M$  y en ausencia (-♦-) o presencia de  $40 \mu M$  (-■-),  $80 \mu M$  (-▲-),  $120 \mu M$  (-X-),  $200 \mu M$  (-✱-),  $280 \mu M$  (-●-) y  $400 \mu M$  (-|-) de PPI. Las líneas trazadas son resultado de un ajuste de datos a un decaimiento exponencial simple, acompañado de una caída lineal lenta.

La **figura 5** muestra que la disolución presenta un comportamiento que pudo ajustarse a un decaimiento exponencial, con un componente de deriva quasi-lineal a tiempos largos. La caída inicial se establece en la primera hora para luego dar paso al componente lento. Se observa también que el sistema de Au-NPs es lo suficientemente sensible para responder ante los cambios en la concentración de PPI en el medio y, bajo las condiciones elegidas, la respuesta abarca un mayor rango de concentración, que cuando el catión divalente era  $Cu^{2+}$ .

Como se indica, fue necesario tener en cuenta este comportamiento para poder usar este método en mediciones de actividad enzimática posteriores. Finalmente, es posible observar que la fase rápida se acorta cuando la concentración de  $Mg^{2+}$  ( $320 \mu M$ ) es cercana a la de PPI (**figura 5, -|-**).

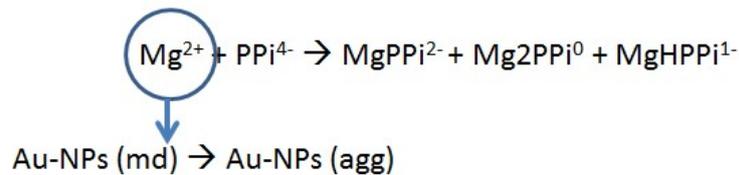
Por el momento, no tenemos una explicación para el comportamiento bifásico, pero es probable que la fase rápida consista en la formación de agregados de pocas nanopartículas, mientras que la fase lenta podría estar asociada a la asociación de agregados entre sí, para dar lugar a agregados de mayor tamaño.

Se procedió a analizar el cambio en el cociente  $A_{522}/A_{650}$  a través del tiempo en sistemas de Au-NPs que contenían concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  (**figura 6**). Se puede apreciar una diferencia significativa en las señales espectrofotométricas dosis-dependiente, que resulta cuantitativa.



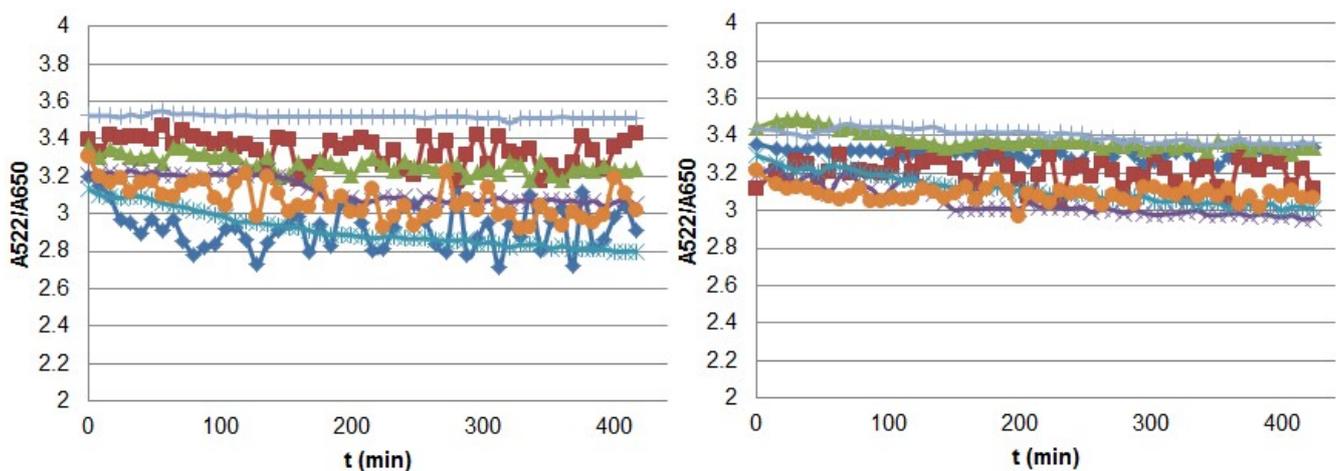
**Figura 6. Estabilidad de la solución AuNPs-Cys a través del tiempo, en ausencia (-|-) o en presencia de diferentes concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$ : 40  $\mu M$  (-♦-), 80  $\mu M$  (-■-), 120  $\mu M$  (-▲-), 200  $\mu M$  (-×-), 280  $\mu M$  (-●-) y 400  $\mu M$  (-✱-).**

El resultado es consistente con la propuesta de que el decaimiento inicial es dependiente de la concentración de  $Mg^{2+}$  libre (*i.e.* que no se encuentra formando parte de las diferentes especies complejadas con PPI), el cual se eleva de manera paralela a la concentración de  $Mg^{2+}$  total aplicada (*figura 7*).



**Figura 7. Especies formadas en el medio de reacción entre el  $Mg^{2+}$  y el tetranion PPI.**

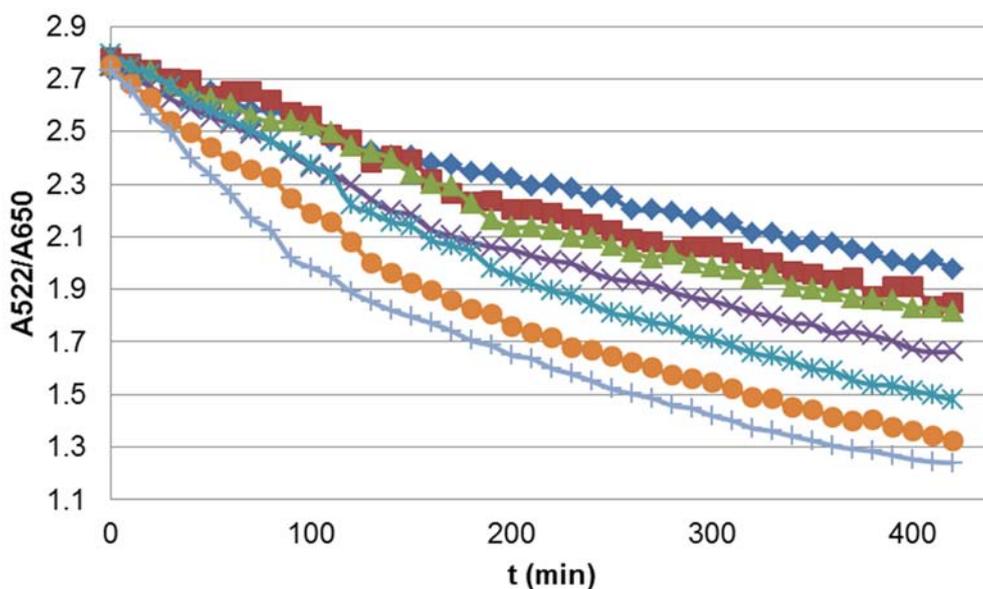
Con el fin de observar cómo se comportaba el sistema Au-NPs al adicionar el amortiguador de actividad utilizado para purificación y medición de la actividad siPPiasas para mantener el pH a 7.5 y evitar la interferencia con otros metales divalentes en el medio (Tris-HCl pH=7.5 0.1 M y EDTA 0.1 mM). Se evaluó por separado la influencia en el sistema de Au-NPs la adición de Tris-HCl y el efecto que el pH puede tener en el medio. Se monitoreó el cambio del cociente  $A_{522}/A_{650}$  a través del tiempo en sistemas de Au-NPs con diferentes concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  y dos pH diferentes (*figura 8*).



**Figura 8. Efecto del pH en la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en ausencia (—+—), o en presencia de concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  de 40  $\mu M$  (—●—), 80  $\mu M$  (—Ж—), 120  $\mu M$  (—x—), 200  $\mu M$  (—▲—), 280  $\mu M$  (—■—), y 400  $\mu M$  (—◆—), y en presencia de amortiguador Tris-HCl 10  $\mu M$  a pH 7.5 (izquierda) y 8.5 (derecha).**

Se observa que el pH tiene un efecto importante en la respuesta del sistema, ya que a pH 7.5 la respuesta a la concentración de PPI y  $Mg^{2+}$  es más clara que a pH 8.5, condición a la que las curvas están casi sobrepuestas. Se determinó también que a concentraciones de Tris-HCl por arriba de  $10 \mu M$  se genera la agregación de las Au-NPs, aunque se sabe que a concentraciones tan bajas de Tris-HCl como las empleadas en el experimento de la **figura 8**, su efecto amortiguador es muy cuestionable.

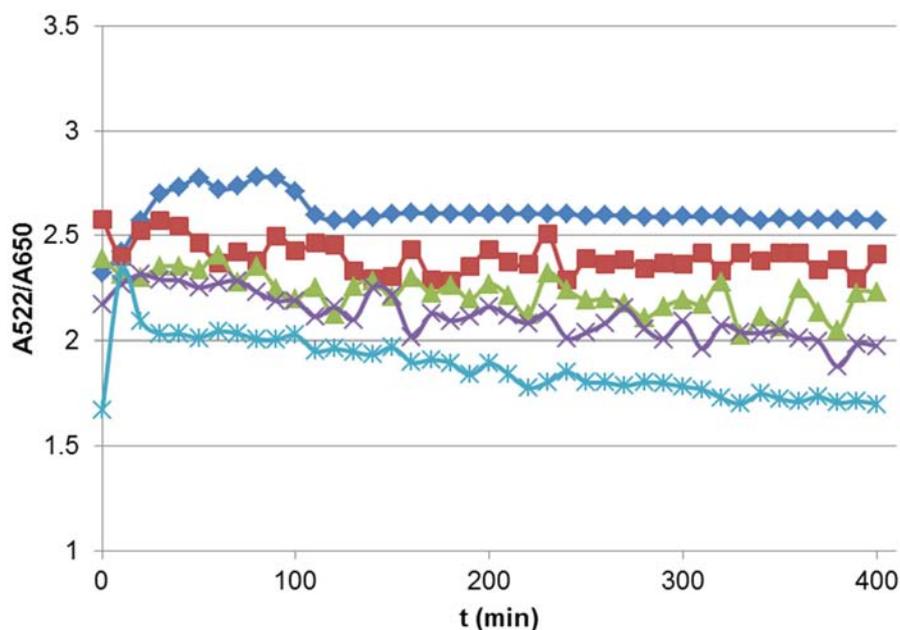
De igual forma, se realizó un ensayo donde se buscó observar el comportamiento del sistema de Au-NPs cuando se le adicionaba EDTA midiendo el cociente  $A_{522}/A_{650}$  a través del tiempo en soluciones de Au-NPs que contenían diferentes concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$ .



**Figura 9.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys, en presencia de amortiguador Tris-HCl, pH 7.5  $10 \mu M$  y EDTA  $1 \mu M$  y en ausencia ( $\diamond$ ) o en presencia de concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  de  $40 \mu M$  ( $\square$ ),  $80 \mu M$  ( $\triangle$ ),  $120 \mu M$  ( $\times$ ),  $200 \mu M$  ( $\ast$ ),  $280 \mu M$  ( $\circ$ ) y  $400 \mu M$  ( $\oplus$ ).

Se observó que la adición de EDTA al medio tiene un efecto notable sobre el comportamiento del sistema (**figura 9**), resultado que se esperaba, dado que el EDTA tiene un fuerte efecto quelante de sobre el  $Mg^{2+}$ , aunque el comportamiento no es como se esperaba, e indica que también puede tener un efecto sobre la agregación de las Au-NPs en forma directa. Sin embargo, aunque se detectó un cambio, esto no se observó como un viraje a coloración azul de la disolución.

Una vez que se observó que a una concentración de  $10 \mu M$  de Tris-HCl permitía al sistema responder a los cambios de concentración en PPI y  $Mg^{2+}$ , se evaluó la influencia que podría tener la presencia de Pi añadido al sistema.

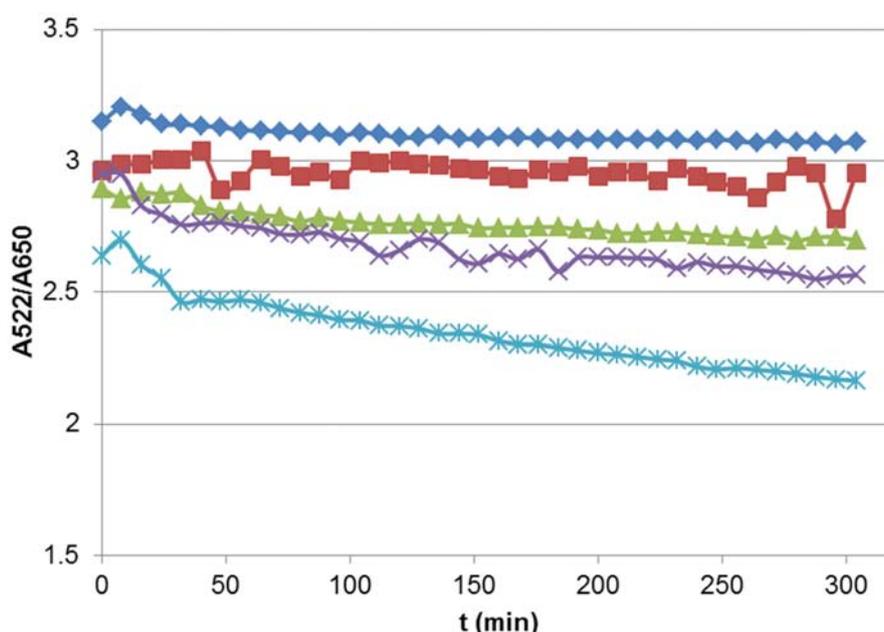


**Figura 10.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en presencia de  $Mg^{2+}$   $200 \mu M$  y amortiguador Tris-HCl pH 7.5  $10 \mu M$  y con las concentraciones de PPI  $200 \mu M$  (—♦—), PPI  $175 \mu M$  + Pi  $50 \mu M$  (—■—), PPI  $150 \mu M$  + Pi  $100 \mu M$  (—▲—), PPI  $125 \mu M$  + Pi  $150 \mu M$  (—x—), PPI  $100 \mu M$  + Pi  $200 \mu M$  (—\*—).

Para este caso se realizaron ensayos midiendo a través del tiempo los cambios en el cociente  $A_{522}/A_{650}$  en un sistema de Au-NPs simulando las consecuencias de una la hidrólisis del PPI a Pi y a una concentración constante de  $Mg^{2+}$  de  $400 \mu M$ ,

es decir se disminuyó la concentración de PPI de 200  $\mu\text{M}$  hasta 100  $\mu\text{M}$  y proporcionalmente se aumentó la concentración de Pi de 0 a 200  $\mu\text{M}$  (**figura 10**).

Se realizó otro ensayo bajo condiciones diferentes de PPI (de 400  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$ ) y de Pi (0  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$ ) manteniendo constante la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  (400  $\mu\text{M}$ ) (**figura 11**). En ambos caso se adicionó también amortiguador Tris-HCl pH 7.5 a una concentración 10  $\mu\text{M}$ .



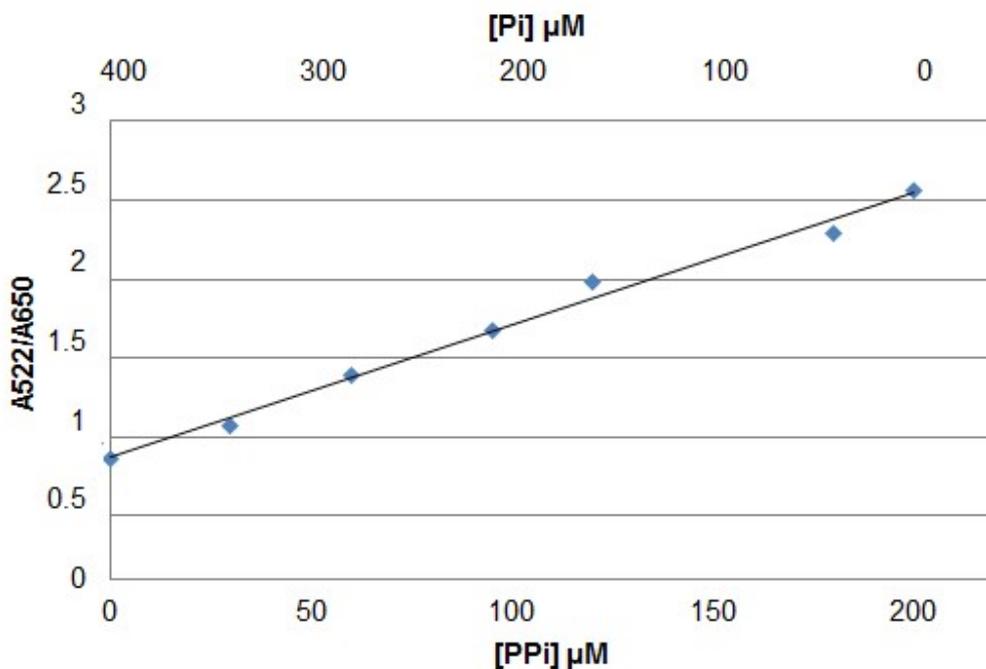
**Figura 11.** Curso temporal de la estabilidad de la solución AuNPs-Cys en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  y amortiguador Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$  y con las concentraciones de PPI 400  $\mu\text{M}$  (—■—), PPI 375  $\mu\text{M}$  + Pi 50  $\mu\text{M}$  (—■—), PPI 350  $\mu\text{M}$  + Pi 100  $\mu\text{M}$  (—▲—), PPI 325  $\mu\text{M}$  + Pi 150  $\mu\text{M}$  (—x—), PPI 200  $\mu\text{M}$  + Pi 200  $\mu\text{M}$  (—x—).

Se determinó que el sistema es capaz de detectar cambios en la concentración de PPI, aun si este cambio está asociado a la acumulación de Pi, que resultaría concomitante a la hidrólisis, al menos a concentraciones por debajo de Pi de 200  $\mu\text{M}$ .

Una vez evaluados todos los parámetros anteriores fue posible establecer condiciones de tiempo de preincubación y concentraciones de PPI,  $\text{Mg}^{2+}$ , Pi y

amortiguador, que permitieron elaborar una curva patrón para el monitoreo posterior de la actividad PPIasa con el fin de relacionar los cambios de  $A_{522}/A_{650}$  con concentraciones de PPI.

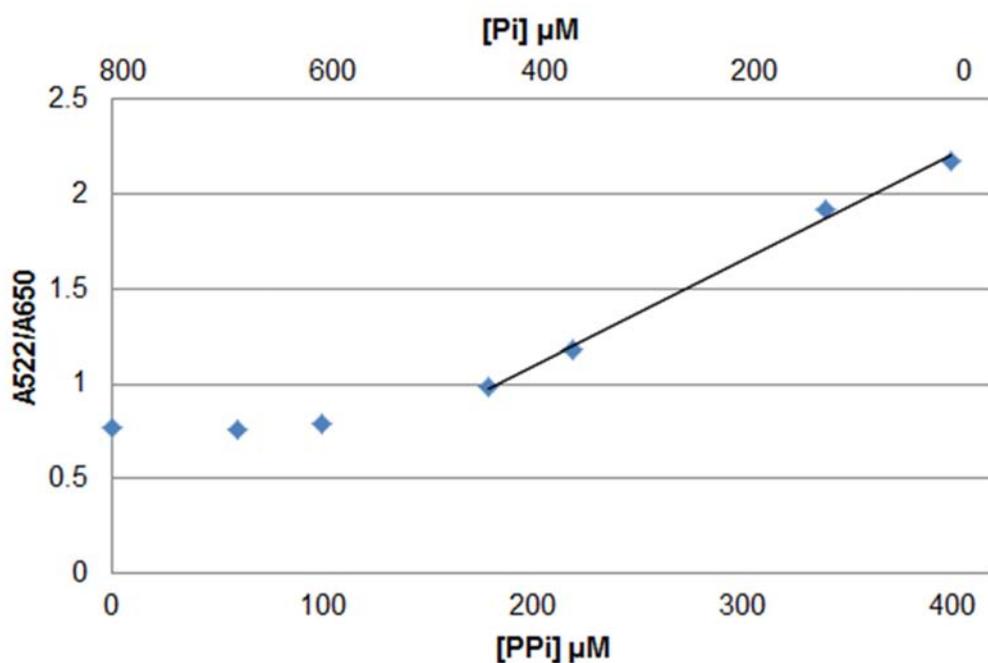
Se realizaron tres curvas patrón con tres diferentes concentraciones de PPI y  $Mg^{2+}$  (200, 300 y 400  $\mu M$ ) a concentraciones equimolares, con el fin de observar que tan capaz es el método de detectar cambios en la concentración de PPI a estas concentraciones.



**Figura 12.** Curva patrón con  $Mg^{2+}$  200  $\mu M$ , PPI de 0 a 200  $\mu M$  (escala inferior de la abscisas) y Pi 400 a 0  $\mu M$  (escala superior de la abscisas), en presencia de Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu M$ . La línea representa el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente de 0.0084, e intercepción con la ordenada 0.86.

En el caso de la curva patrón de PPI 200  $\mu M$  (**figura 12**) el sistema es capaz de detectar cambios en la concentración PPI y es posible asociar un respuesta prácticamente lineal a este cambio, aunque tras varias repeticiones se observó que los valores de las curvas no tenían suficiente reproducibilidad

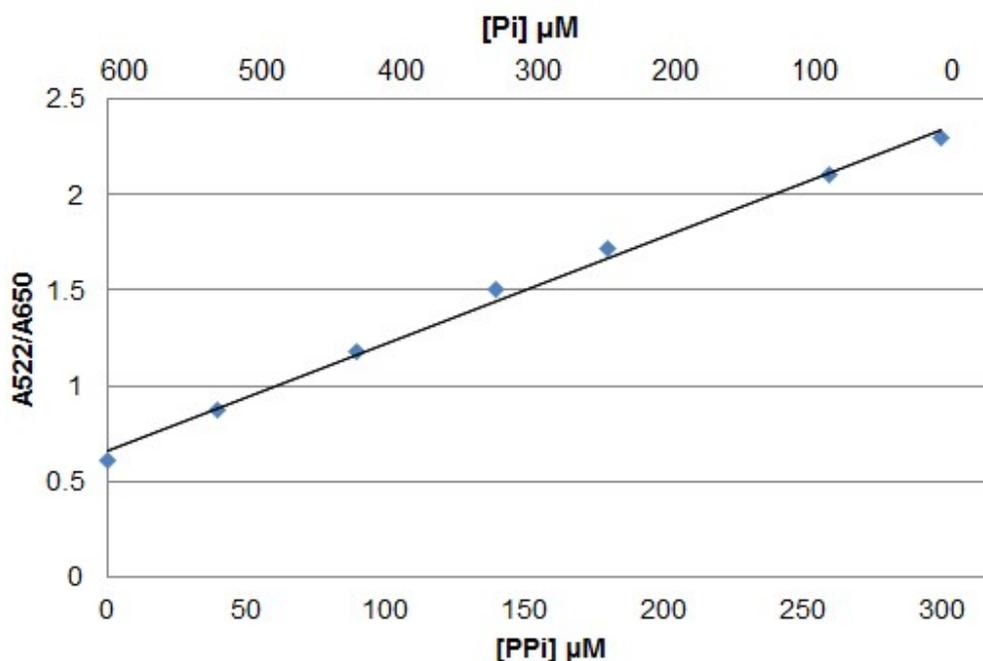
Para las curvas de 400  $\mu\text{M}$  (**figura 13**) se puede observar que la curva patrón pierde sensibilidad a bajas concentraciones de PPI, debido quizá a la elevada concentración de Pi, o también porque a esta concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  concentraciones bajas de PPI permiten que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre rebase un cierto umbral en el que la agregación de las nanopartículas ya depende poco de la concentración (saturación). A esta concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ , los ensayos de actividad únicamente permitirían seguir la hidrólisis hasta concentraciones de 150  $\mu\text{M}$  de PPI (con 500  $\mu\text{M}$  Pi).



**Figura 13.** Curva patrón  $\text{Mg}^{2+}$  400  $\mu\text{M}$ , PPI de 0 a 200  $\mu\text{M}$  (escala inferior de la abscisas) y Pi 400 a 0  $\mu\text{M}$  (escala superior de la abscisas), en presencia de Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ . La línea representa el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente de 0.0056, e intercepción con la ordenada - 0.0269.

Como se comentó, la linealidad de las curvas con 300  $\mu\text{M}$  (**figura 14**) de PPI fue buena y se obtuvieron curvas más reproducibles. Se decidió que los ensayos de actividad posteriores se realizarían bajo estas condiciones, excepto cuando se indica otra cosa.

Por debajo y por arriba de concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  analizadas anteriormente se determinó que la sensibilidad del método es muy baja, por lo que no se pueden realizar curvas patrón confiables bajo dichas condiciones.



**Figura 14.** Curva patrón  $Mg^{2+}$  300  $\mu M$ , PPI de 0 a 200  $\mu M$  (escala inferior de la abscisas) y Pi 400 a 0  $\mu M$  (escala superior de la abscisas), en presencia de Tris-HCl 10  $\mu M$ . La línea representa el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente de 0.0056, e intercepción con la ordenada 0.65.

### **B. Obtención de proteína recombinante AtPPa1-GST**

En la obtención de proteína recombinante se requirieron medidas especiales para la purificación, debido a que los amortiguadores que se emplean de manera tradicional contienen EDTA para quelar otros metales en el medio que pueden estar como contaminantes traza, pero que inhiben la actividad catalítica de las siPPiase [14] y que pueden conducir a la pérdida de actividad.

Se lavó primero la columna con un amortiguador de baja fuerza iónica, luego con un amortiguador con 0.5 M NaCl para lavar las proteínas unidas de manera inespecífica, seguido de un lavado más con un amortiguador sin EDTA para lavar

cualquier residuo del amortiguador de columna que si contiene EDTA. Finalmente, la elución se llevó acabo con un amortiguador sin EDTA que contenía glutatión reducido para obtener a la AtPPa1-GST sin EDTA en el medio, todo a las concentraciones que se indican en la metodología.

Una vez que se realizó el resto del procedimiento para obtener la proteína recombinante como se describe en la metodología, se procedió a realizar una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. En el gel se puede observar una banda a un peso molecular de 50 kDa, el cual es el peso que presenta la AtPPa1-GST y dos bandas intensas a aproximadamente 25 kDa las cual representa la proteína AtPPa1 sin la etiqueta de GST y a la GST (**figura 15**), aunque en ambos aun se observan algunos contaminantes.

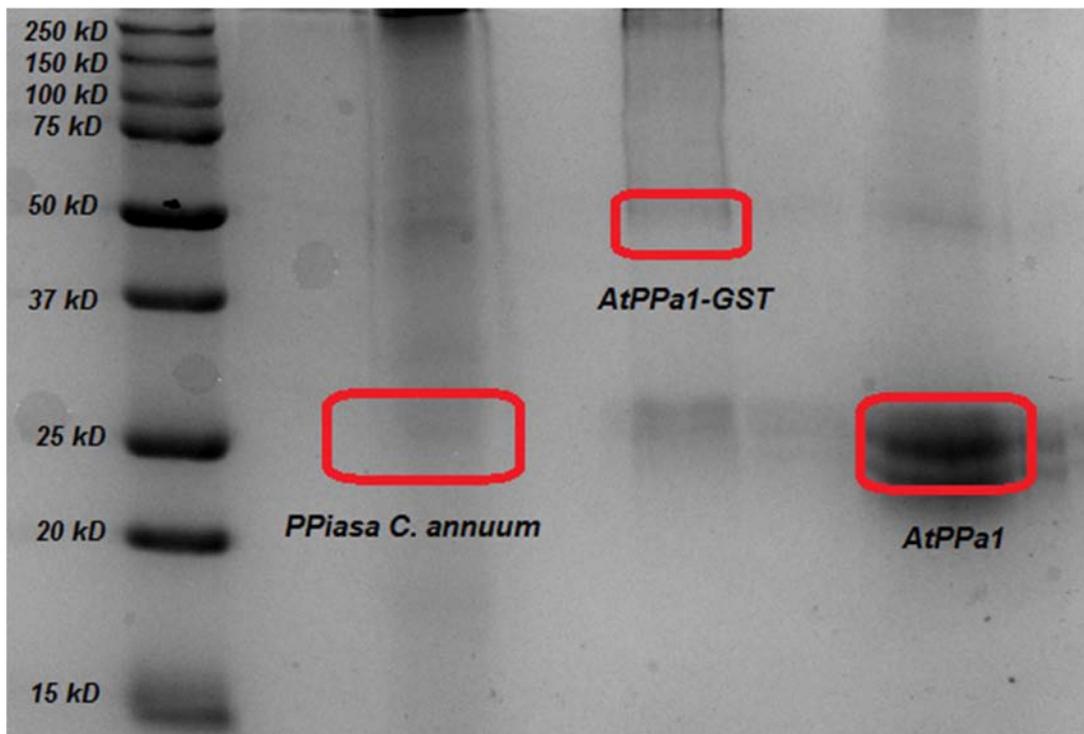
Finalmente, para comprobar que la proteína tuviera actividad específicamente pirofosfatasa también se realizaron ensayos con el método verde de Malaquita como se indica en la metodología en presencia de amortiguador con y sin  $Mg^{2+}$  (recordando que la actividad PPIasa únicamente se da en presencia del catión divalente  $Mg^{2+}$ ). La actividad en ausencia de  $Mg^{2+}$ , resultó casi indetectable, en tanto que en presencia de  $Mg^{2+}$  se obtuvo una actividad específica de  $0.0049 \mu\text{mol PPI hidrolizado min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ .

### **C. Obtención de pirofosfatasa en placenta de *Capsicum annuum* "serrano"**

Debido a que hasta el momento no se sabe cuántas pirofosfatasas contiene el chile serrano, ya que no se ha intentado clonar alguna secuencia que las codifique para su estudio en forma pura. En el laboratorio se ha estandarizado un método de extracción y purificación de diversos tejidos de la planta de chile [31]. Esta purificación es llevada a cabo mediante HPLC.

En específico se ha determinado que el tejido placentario del fruto del chile es aquel donde hay más actividad PPIasa, debido a esto se decidió en este trabajo obtener un pico de actividad, juntando todas las fracciones del pico para

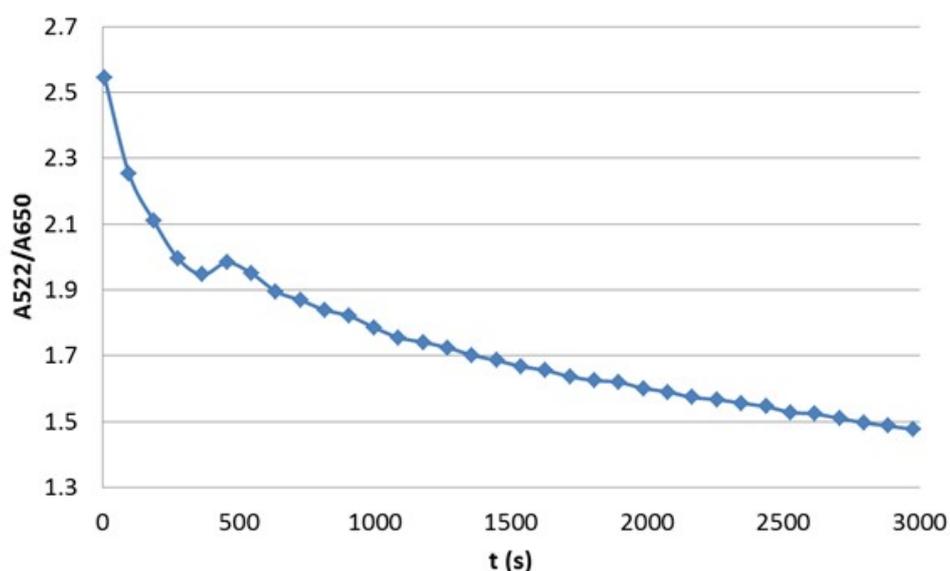
posteriormente dializarlo y concentrarlo. Para comprobar la pureza de la enzima se cargó en un gel de acrilamida SDS-PAGE aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de proteína (**figura 15**). Se observa que la preparación aun no es pura, ya que presenta algún fondo de alto peso molecular, posiblemente debido a agregados o de que la proteína se encontraba parcialmente desnaturalizada, y una banda en 50 kDa, que posteriormente se identificó como la subunidad pequeña de la RUBISCO [31]. La banda en 25 kDa representa un porcentaje muy bajo de la proteína total, sin embargo, la actividad de pirofosfatasa en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  fue despreciable y la actividad dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  fue de  $0.0000408 \mu\text{mol PPi hidrolizado min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ , porque se consideró que la preparación era adecuada para probar el método con una preparación de origen natural. Debe considerarse además, que en tejidos vegetales se sabe que las concentraciones de PPiasea son también muy bajas y que esta preparación solo fue fraccionada en una columna.



**Figura 15.** Gel de electroforesis SDS-PAGE para las muestras de proteína de *C. Annuum* y para las proteínas de fusión *AtPPa1-GST* y la *AtPPa1* digerida. Los cuadros rojos indican la posición esperada para la proteína de interés. Se aplicaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína total en cada carril.

#### **D. Medición de la actividad pirofosfatasa de la enzima AtPPa1**

Una vez obtenida la proteína AtPPa1 se observó su impacto en el medio de reacción, considerando que solo es posible seguir relación  $A_{522}/A_{650}$  para monitorear la concentración de PPI, luego de la estabilización del sistema inicial, que toma de 30 a 60 minutos. Por ellos, los siguientes experimentos se realizaron añadiendo la enzima al sistema estabilizado por 60 minutos.

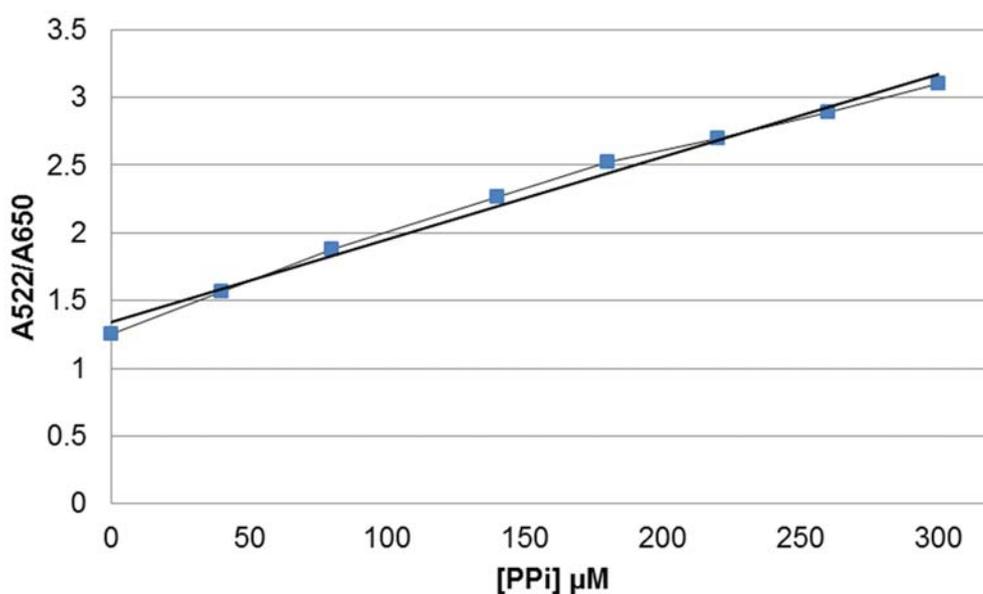


**Figura 16.** Curso temporal de la señal de hidrólisis de PPI en la disolución AuNPs-Cys con 300  $\mu\text{M}$  de PPI y  $\text{Mg}^{2+}$ , con 10  $\mu\text{M}$  de Tris-HCl pH 7.5, y AtPPa1, a una concentración final de 8.065  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se observa en la **figura 16**, que una vez que se adiciona la enzima al medio que contiene AuNPs-Cys, PPI,  $\text{Mg}^{2+}$  y Tris-HCl pH 7.5 (a las concentraciones indicadas) el cociente  $A_{522}/A_{650}$  decrece con el tiempo, como era de esperar. La disminución del cociente de absorbancias indica la agregación de las Au-NPs mediada por el  $\text{Mg}^{2+}$  libre, el cual queda disponible debido a la hidrólisis del PPI, mediado por la siPPiase.

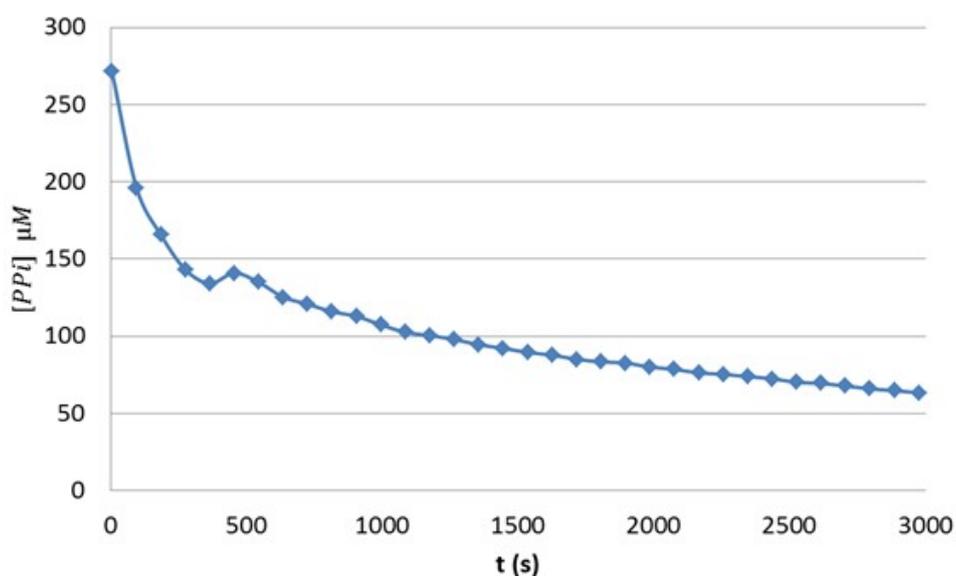
El resultado muestra que la enzima puede hidrolizar PPI a las condiciones propuestas y en las condiciones del ensayo. Además, de este cambio en el cociente  $A_{522}/A_{650}$  es posible observar el cambio colorimétrico en el medio de reacción generado por la hidrólisis del PPI y la liberación de  $Mg^{2+}$  que lleva a la agregación de las Au-NPs y genera una coloración azul en el medio.

Es necesario convertir estos cambios en cociente de absorbencias  $A_{522}/A_{650}$  a través del tiempo en concentraciones de PPI utilizando una curva patrón (a las mismas concentraciones de AuNPs-Cys, PPI,  $Mg^{2+}$  y Tris-HCl pH 7.5 en las cuales fue llevado el experimento anterior), como se observa en la **figura 17**.



**Figura 17.** Curva patrón en la disolución de AuNPs-Cys con y PPI variable de 0 – 300  $\mu\text{M}$  y Pi variable en forma paralela de 600 – 0  $\mu\text{M}$  y en presencia de  $Mg^{2+}$  300  $\mu\text{M}$  y Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$  (específica para el ensayo mostrado en la figura 18). La línea indica el ajuste por regresión lineal, con los parámetros:  $R^2 = 0.99$ , pendiente 0.0061 ( $\mu\text{M}^{-1}$ ) y corte a la ordenada 1.34.

Empleando la ecuación de la recta de la curva patrón fue posible relacionar los cambios a través del tiempo del cociente  $A_{522}/A_{650}$  con valores de concentración de PPI (**figura 18**).

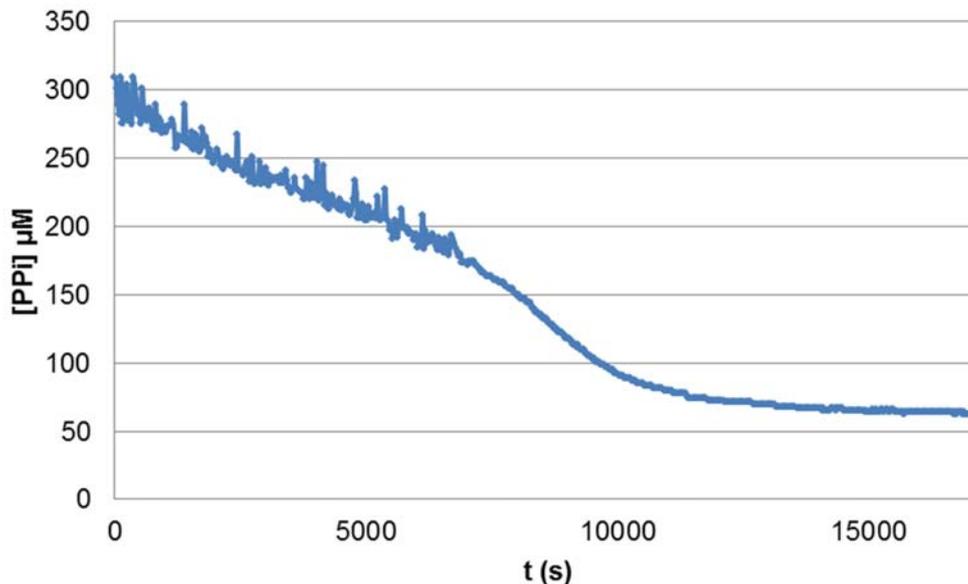


**Figura 18.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa AtPPa1, a una concentración final de 8.065  $\mu\text{g/mL}$ , en la disolución de AuNPs-Cys con  $\text{Mg}^{2+}$  300  $\mu\text{M}$ , PPI 300  $\mu\text{M}$  y Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ .

### **E. Medición de la actividad de la pirofosfatasa de *Capsicum annuum*.**

De igual manera se realizaron ensayos de actividad para la pirofosfatasa proveniente de *Capsicum annuum*, purificada según se ha indicado en métodos. Se relacionaron los cambios en el cociente  $A_{522}/A_{650}$  con concentraciones de PPI mediante el uso de una curva patrón, justo como se realizó en el caso de la AtPPa1 (**figura 19**).

Es necesario que cada vez que se realice un ensayo de actividad se realice una nueva curva patrón, con el fin de crear las mismas condiciones que en el ensayo de actividad, ya que como se mencionó anteriormente el sistema no se comporta exactamente igual en todos los casos.



**Figura 19.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (de *C. annuum* a una concentración final de 57.2  $\mu\text{g/mL}$ ) en la solución AuNPs-Cys con  $\text{Mg}^{2+}$  300  $\mu\text{M}$ , PPI 300  $\mu\text{M}$  y Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu\text{M}$ .

Como se observa en la **figura 19** la actividad pirofosfatasa en la enzima extraída y purificada de *C. annuum* es muy baja, por lo que fue necesario dejar que la enzima en el medio de reacción durante un tiempo prolongado para medir el progreso de la reacción de manera clara.

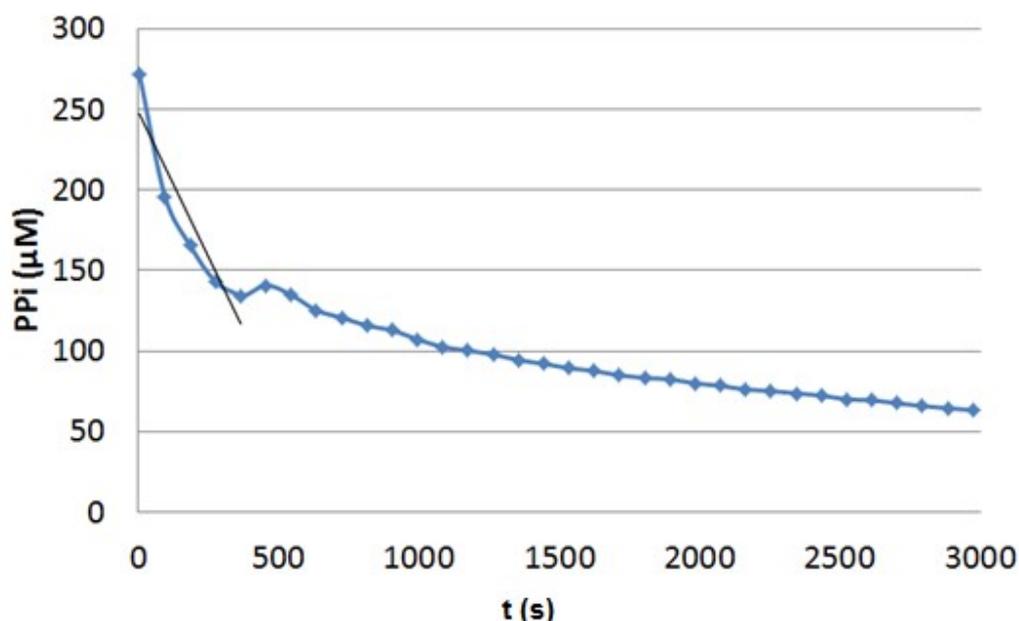
Se debe considerar que aunque la enzima fue purificada, la pirofosfatasa, se encuentra en una concentración muy baja y aun en el pico de actividad su concentración es apenas un 10% de la proteína de la fracción. Esto se corroboró en el gel de electroforesis que se realizó, en el que se puede ver que a un peso molecular de 25 KDa la banda obtenida es muy tenue (**figura 15**), de ahí la baja actividad observada si se compara con la obtenida con las proteína recombinante de *A. thaliana*.

#### **F. Sensibilidad a fosfato y a exceso de sustrato de la enzima AtPPa1**

Como sabemos los métodos clásicos usados como el de VM para determinar la actividad PPIasa, no permiten evaluar el efecto que tiene el Pi sobre la enzima, además que al ser capaz de detectar concentraciones bajas de Pi es un sistema que se satura rápidamente. Por ello, destaca la importancia de este método desarrollado que permite analizar este efecto.

Se realizaron ensayos de actividad adicionados con diferentes concentraciones de Pi (de 0 a 1.2 mM) inicial y se obtuvo para cada condición la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis de PPI catalizada por la enzima. Esta actividad inicial corresponde, como se ilustra en la **figura 20**, a la pendiente de la recta que se genera los primeros 4 o 5 minutos

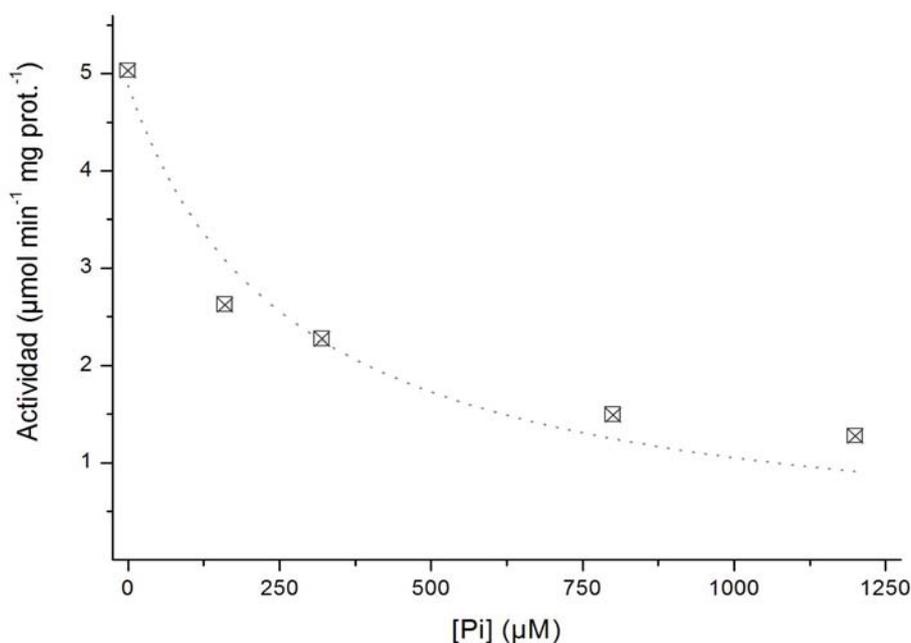
Se determinó que únicamente es posible realizar mediciones de actividad bajo concentraciones iniciales de Pi menores a 1.2 mM, debido a que a concentraciones mayores a esta interfiere con la sensibilidad a los cambios en las concentraciones de PPI.



**Figura 20.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (AtPPa1 a una concentración final de 8.065 µg/mL) en la solución de AuNPs-Cys con  $Mg^{2+}$  300 µM, PPI 300 µM y Tris-HCl pH 7.5 10 µM. La línea recta muestra el ajuste de los datos iniciales para el cálculo de la actividad. Los valores obtenidos fueron  $R^2 = 0.87$ , pendiente  $-0.36 \mu\text{M/s}$ , intersección con la ordenada  $249.4 \mu\text{M}$ .

A partir de las velocidades iniciales para cada condición de Pi inicial se obtuvieron los valores de actividad ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) para cada condición (**figura 21**).

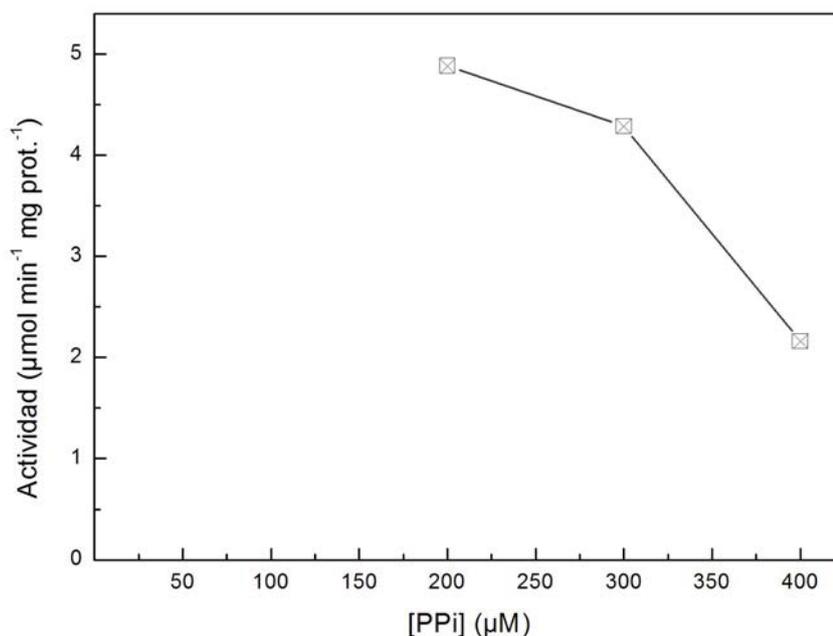
Se puede comprobar entonces que la presencia de Pi en el medio de reacción genera una clara inhibición en la actividad pirofosfatasa. Se obtuvo también un valor de  $I_{50}$  igual a  $275 \pm 45$  para esta enzima.



**Figura 21.** Curva de inhibición de la actividad pirofosfatasa (AtPPa1) por Pi (0 – 1.2 mM), en la disolución AuNPs-Cys a una concentración inicial de PPI y  $\text{Mg}^{2+}$  de  $300 \mu\text{M}$ , en Tris-HCl pH 7.5  $10 \mu\text{M}$ . La línea es el resultado del ajuste a la ecuación:  $A_{\alpha} - (A_0 - A_{\alpha}) \times I_{50} / (I_{50} + [I])$ , en donde  $A_0$  es la actividad en ausencia de inhibidor,  $A_{\alpha}$  es la actividad a concentración infinita de inhibidor (que se fijó a cero, en consistencia con un preajuste)  $I_{50}$  es la concentración de inhibidor que produce 50% de inhibición en las condiciones medidas e  $[I]$  es la concentración de inhibidor. Para este ajuste los valores fueron:  $\xi^2/\text{GL} = 0.06867$ ,  $R^2 = 0.98$ ,  $A_0 = 4.93 \pm 0.25 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$  e  $I_{50} = 275 \pm 45$ ; en donde,  $\xi$  es la sumatoria estadística (valor observado -valor esperado); GL son los grados de libertad, es decir, número de datos- número de parámetros (2) menos uno y R es el coeficiente de correlación.

De igual forma se evaluó el efecto a la actividad de la enzima frente a concentraciones elevadas de su sustrato PPI. Como se mencionó durante nuestro proyecto solo posible realizar ensayos de actividad a concentraciones equimolares de  $Mg^{2+}$  y PPI de 200 a 400  $\mu M$ , debido que únicamente bajo estas condiciones es posible generar curvas patrón que responden de manera lineal a los cambios en la concentración de PPI.

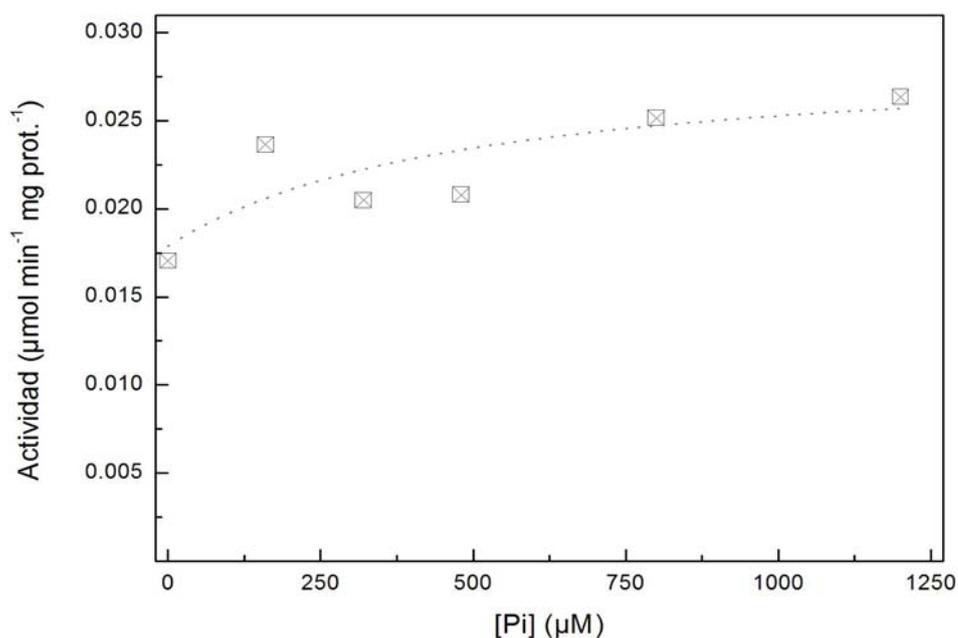
Se observa en la **figura 22** que la actividad inicial pirofosfatasa de la AtPPa1 disminuye ligeramente cuando se aumenta la concentración de PPI, aunque no de manera tan evidente como en el caso del Pi. Aunque PPI es el sustrato y se esperaría un ligero incremento de actividad, ya se ha demostrado que la actividad de estas enzimas responde con una inhibición aparente por exceso de sustrato, cuando se elevan las concentraciones de pirofosfato, debido a que la concentración de  $Mg^{2+}$  libre disponible para activar a la enzima, se reduce por la formación de los complejos entre el pirofosfato y el  $Mg^{2+}$  [1,2].



**Figura 22.** Curva de la actividad pirofosfatasa (AtPPa1) con PPI y  $Mg^{2+}$  equimolares (200 - 400  $\mu M$ ), en la solución AuNPs-Cys con Tris-HCl pH 7.5, 10  $\mu M$ .

### **G. Sensibilidad a fosfato y a exceso de sustrato de la pirofosfatasa de *Capsicum annuum***

En el caso de la PPiase purificada del tejido placentario del chile serrano, no se observó una respuesta marcada de la velocidad inicial frente a las elevadas concentraciones de Pi en el medio (**figura 23**).

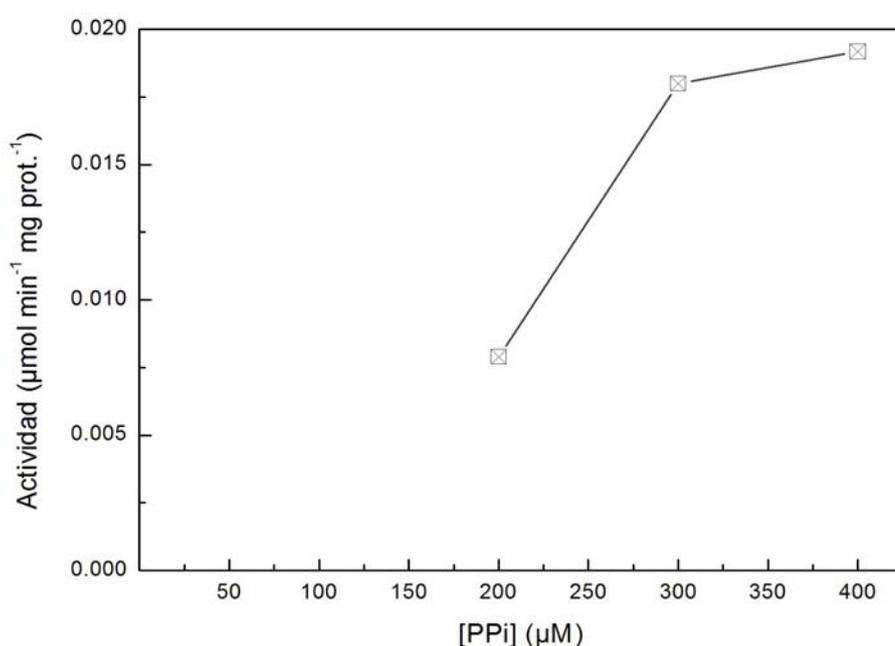


**Figura 23.** Actividad pirofosfatasa (de *C. annuum*) frente a las variaciones en la concentración de Pi (0 – 1.2 mM), en la disolución AuNPs-Cys a una concentración constante de PPi y Mg<sup>2+</sup> de 300 μM, en Tris-HCl pH 7.5 10 μM.

De hecho, se observa (**figura 23**) que incluso hay un ligero aumento en la actividad inicial, que podría explicarse por un efecto alostérico del fosfato sobre la actividad, o quizá por un ligero ajuste de las concentraciones de las especies complejadas de Mg<sup>2+</sup> y PPi, causado por la presencia de fosfato y que pueda favorecer a la enzima. En este caso, al no tener una proteína pura, en contraste con la preparación de AtPPiase1, es difícil determinar el porqué de este

comportamiento, ya que alguna de las proteínas contaminantes podría influir en el resultado.

Se evaluó también el efecto a la actividad inicial de la enzima frente a concentraciones elevadas de su sustrato (**figura 24**). A las mismas concentraciones equimolares de  $Mg^{2+}$  y PPI que en el caso de la AtPPiase1. Se observa que a diferencia de los resultados obtenidos para la AtPPiase, el aumento de sustrato y  $Mg^{2+}$  en el medio de reacción genera un aumento en la actividad inicial.



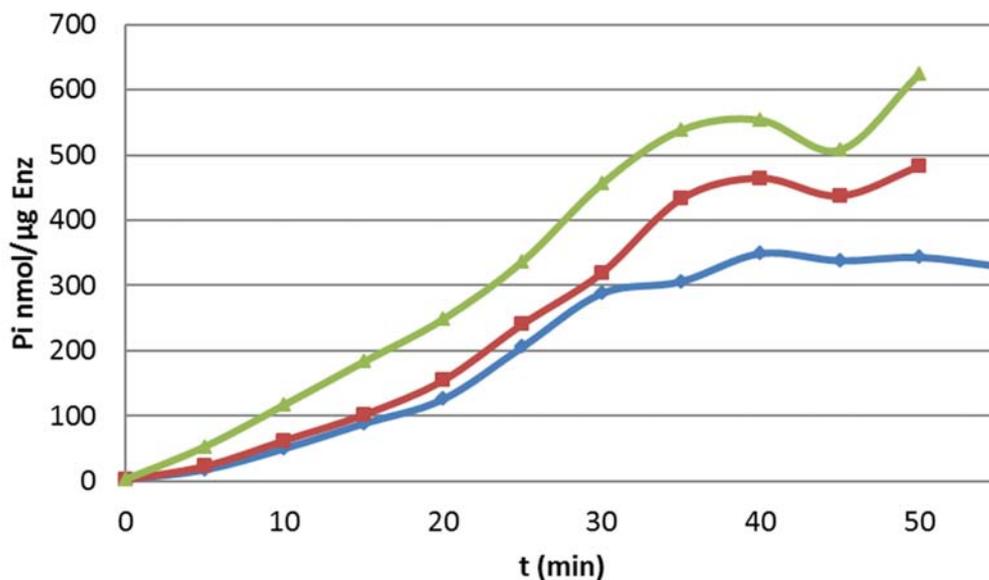
**Figura 24. Actividad pirofosfatasa (de *C. annuum*) a concentraciones equimolares de PPI y  $Mg^{2+}$  de 200 a 400  $\mu M$ , en la disolución AuNPs-Cys con Tris-HCl pH 7.5 10  $\mu M$ .**

#### **H. Medición de la actividad pirofosfatasa con el método de verde de Malaquita de la enzima AtPPa1**

En un inicio cuando evaluó la actividad pirofosfatasa para la enzima AtPPa1 utilizando el ensayo de verde de Malaquita se obtuvieron valores de absorbencia a 592 nm muy similares a los 5, 10 y 15 minutos en presencia de amortiguador con  $Mg^{2+}$  (adicionando al medio de reacción la enzima AtPPa1 a una concentración final de 8.065  $\mu g/mL$ ), lo cual indicaba que la enzima perdía actividad durante el

ensayo, que el producto acumulado interfería con su actividad, o que el sustrato se agotaba.

Se observó también que la hidrólisis enzimática del PPi añadido total en la disolución de reacción no era completa, ya que los valores de absorbencia evaluados con la curva patrón, no explicaban el completo agotamiento del sustrato. Por lo que se decidió reducir la cantidad de enzima, con el fin de poder observar la fase lineal de la actividad y asegurarnos de que la enzima no estaba siendo inactivada en la disolución del ensayo. Los ensayos siguientes se realizaron bajo las mismas condiciones equimolares de  $Mg^{2+}$  y de PPi (200, 300 y 400  $\mu M$ ) que en los ensayos de Au-NPs, con el fin de poder comparar ambos ensayos.



**Figura 25.** Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (AtPPa1) utilizando el ensayo de verde de Malaquita con  $Mg^{2+}$  y PPi a concentraciones equimolares de 200  $\mu M$  (-▲-), 300  $\mu M$  (-■-) y 400  $\mu M$  (-◆-); y Tris-HCl pH 7.5 0.1 M.

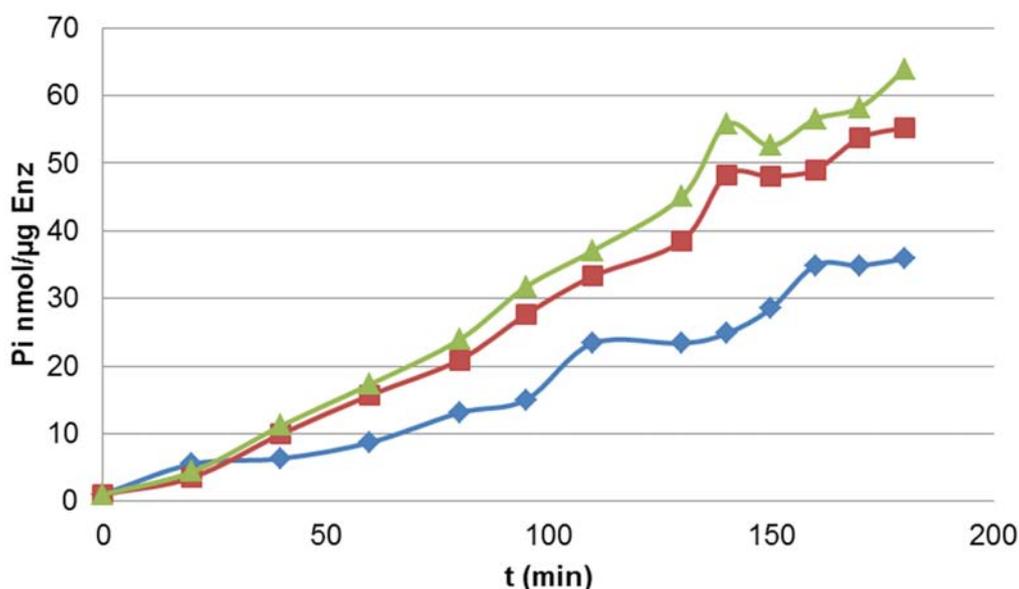
En la **figura 25** se puede observar la curva de progreso de actividad para la enzima AtPPia1 medida con VM, en concentración de enzima diluida y observándose un comportamiento muy similar al que se observó utilizando el

ensayo de Au-NPs. La enzima presenta una actividad PPIasa inicial lineal para dar paso a una disminución apreciable en la actividad, conforme la concentración de sustrato se reduce.

Este comportamiento se generó en las tres concentraciones equimolares de  $Mg^{2+}$  y PPI analizadas. Es posible también observar que la actividad PPIasa es mayor cuando hay mayor cantidad de  $Mg^{2+}$  y PPI equimolar en el medio de reacción. Se puede observar también una ligera fase de retardo, para la cual no tenemos una explicación por el momento, pero que sugeriría que una fracción de la enzima está inactiva.

### ***I. Medición de la actividad pirofosfatasa con el método de verde de Malaquita de *C. annum*.***

Los mismos ensayos de verde de Malaquita realizados con la AtPPiA1 fueron realizados para la pirofosfatasa purificada de *C. annum*.



**Figura 26. Curva de progreso de actividad pirofosfatasa (de *C. annum*) utilizando el ensayo de verde de Malaquita con  $Mg^{2+}$  y PPI a concentraciones equimolares de 200  $\mu M$  (- $\blacktriangle$ -), 300  $\mu M$  (- $\blacksquare$ -) y 400  $\mu M$  (- $\blacklozenge$ -); y Tris-HCl pH 7.5 0.1 M.**

En la **figura 26** se puede observar la curva de progreso de actividad para la PPiase de *C. annuum*, observándose un comportamiento similar al observado en el ensayo de la enzima AtPPiase1 y al observado en ensayo de Au-NPs. Se observa una actividad PPiase inicial (con un ligero retardo) para que después se reduce ligeramente. Sin embargo, en contraste con lo observado con el ensayo de Au-NPs no se detectó la disminución en la actividad frente a las altas concentraciones de pirofosfato para la enzima AtPPa1 (**figura 22**).

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se observa en los resultados anteriores, fue posible modificar el método reportado donde emplean  $\text{Cu}^{2+}$  para generar la agregación de nanopartículas de oro unidas a cisteína [33], utilizándose en este caso  $\text{Mg}^{2+}$ , que como ya se mencionó también es el cofactor esencial para que las pirofosfatasa presenten su actividad catalítica [1,7,8]. Esta agregación puede evitarse con la adición de iones pirofosfato, los cuales se unen al  $\text{Mg}^{2+}$ , previniendo su interacción con las nanopartículas de oro estabilizadas por cisteína.

Se sabe además que las nanopartículas de oro en estado disperso presentan un color rojo y un pico de absorción a 522 nm y color azul con un pico de absorción de 650 nm cuando estas están agregadas. La actividad pirofosfatasa puede observarse entonces en el cambio de coloración del medio de reacción debido a que el hidrolizarse el pirofosfato, el cual es mas a fin al  $\text{Mg}^{2+}$  que la cisteína; el  $\text{Mg}^{2+}$  queda libre para unirse a la cisteína pegada a las nanopartículas de oro, además es posible monitorear en tiempo real este cambio midiendo de manera constante las absorbencias a 522 nm y 650 nm en un espectro dependiente del tiempo. Para calcular la cinética de la hidrólisis de PPI catalizada por siPPasa, los valores de  $A_{522}/A_{650}$  requirieron ser convertidos a concentraciones de PPI, que es lo que se desea poder cuantificar, con el fin de emplear este ensayo como ensayo de actividad de la enzima pirofosfatasa [33].

Como se sabe las pirofosfatasa inorgánicas solubles de la Familia 1 requieren  $\text{Mg}^{2+}$  como activador esencial para que estas presenten su actividad catalítica. La presencia de otros metales divalentes como es el caso del  $\text{Cu}^{2+}$  entre otros metales divalentes inhibe la actividad pirofosfatasa [1], de ahí que la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio de reacción es esencial para su actividad catalítica, además de que genera la agregación de las nanopartículas de oro.

Estos resultados nos permiten afirmar que la hipótesis planteada al inicio del proyecto es correcta, el  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de mediar la agregación de las

nanopartículas de oro unidas a cisteína, lo cual fue la base del ensayo montado en este trabajo.

Bajo las condiciones analizadas en este proyecto se determinó que la agregación de las nanopartículas de oro generada por el  $Mg^{2+}$  es irreversible, por lo tanto, se debe de adicionar primero el PPI al sistema AuNPs-Cys y posteriormente el  $Mg^{2+}$ . La adición inicial del PPI, al ser este ion más afín al  $Mg^{2+}$  que a la cisteína, previene la interacción rápida del  $Mg^{2+}$  libre con las AuNPs-Cys [33,47].

El análisis de estabilidad a través del tiempo a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  y PPI en el medio AuNPs-Cys, permitieron determinar que el sistema no es completamente estable, debido a que se observó el cociente  $A_{522}/A_{650}$  decrece a través del tiempo, es decir el sistema de AuNPs-Cys tiende a la agregación. El sistema tiende a presentar un decaimiento inicial en el cociente  $A_{522}/A_{650}$  muy evidente durante los primeros 50-60 minutos después de la adición del  $Mg^{2+}$  para dar paso a un comportamiento donde este decaimiento es muy lento. En los ensayos de actividad, una vez adicionado el PPI y posteriormente el  $Mg^{2+}$  al medio AuNPs-Cys se requiere que este se deje “incubando” un mínimo de 50 min antes de poder adicionar la pirofosfatasa al medio.

Es posible plantear que dicho comportamiento se debe a una fase inicial de establecimiento de equilibrios químicos, entre las Au-NPs, los complejos de PPI y el  $Mg^{2+}$ , que parece ser relativamente lento, casi con seguridad porque implica fenómenos de transferencia de masa entre la disolución y la superficie de la Au-NPs. La fase lenta correspondería a la agregación de la Au-NPs mediada por el catión divalente, que al ser irreversible no puede ser completamente prevenida por la presencia del quelante (PPI). Pero que, afortunadamente es lo suficientemente lenta como para permitir la medición.

Se evaluó el empleo del amortiguador de Tris, pero se observó que interfiere con el ensayo, a menos que su concentración se reduzca a 10  $\mu$ M, sin embargo, a una concentración de 10  $\mu$ M de Tris el poder amortiguador que puede llegar a ejercer en una solución es muy cuestionable. En el caso de nuestro sistema fue posible

emplea esta concentración de Tris, debido a que la preparación ensayada fue muy limpia (las preparaciones enzimáticas fueron dializadas exhaustivamente en un amortiguador sin  $Mg^{2+}$ , sin EDTA y con amortiguador diluido), aunque es posible que la utilidad del ensayo en otras condiciones más rutinarias no sea suficientemente versátil.

En general, el Tris es un catión y posee un grupo amino, por lo que su interacción directa con las Au-NPs es factible y podría mediar directamente la agregación de las Au-NPs. Se requieren más experimentos para determinar este efecto, pero estaría fuera de los objetivos del presente trabajo.

Se sabe que amortiguadores empleados en la purificación de pirofosfatasa dentro del laboratorio contienen Tris-HCl a pH 7.5 y EDTA para evitar la interferencia de otros metales en los ensayos de actividad [1,4,5]. El uso de EDTA en el método de Au-NPs no es posible, ya que además de ser un agente quelante más afín al  $Mg^{2+}$  que el PPI, genera un decaimiento directo en el cociente  $A_{522}/A_{650}$ . Este decaimiento no es observado como un cambio en la coloración del medio de reacción de rojo a azul a diferencia del  $Mg^{2+}$  o un exceso de Tris-HCl. Sin embargo, cualquiera que sea el mecanismo de acción del EDTA sobre la disolución de Au-NPs, su presencia interfiere seriamente con el ensayo, aun a concentraciones bajas. Por ello, fue necesario obtener las preparaciones enzimáticas en medios libres de EDTA.

Finalmente, el método de nanopartículas de oro permite medir la actividad PPIasa y generar curvas patrón lineales a concentraciones equimolares de entre 200  $\mu M$  y 400  $\mu M$  de  $Mg^{2+}$  y PPI; las cuales son bastantes similares a las encontradas in vivo en las células vegetales [7]. Por abajo y por arriba de estas concentraciones el método no es lo suficientemente sensible. De nuevo, esto establece serias limitaciones para el ensayo de estas enzimas, ya que el ensayo estándar tiene apenas 80  $\mu M$  de PPI, dada la elevada afinidad de la enzima por su sustrato. Sin embargo, fue una coincidencia afortunada que este rango de concentraciones es justo el valor determinado para la concentración intracelular de pirofosfato y de  $Mg^{2+}$  libre en el citoplasma de las células vegetales [7,16].

El producto de la reacción catalizada por las pirofosfatasa es el Pi, el cual se va acumulando conforme la enzima va consumiendo el sustrato PPI. En el sistema de nanopartículas de oro se determinó que a concentraciones menores de 1.8 mM no representa un compuesto que impida los ensayos de actividad. Nuestros resultados indican que el ensayo de Au-NPs, si bien es limitado en su espectro de condiciones de aplicabilidad, permite estudiar la sensibilidad a fosfato de las proteínas en un rango fisiológico de concentraciones de sustrato.

Para este trabajo se analizaron dos pirofosfatasa de dos organismos vegetales diferentes y obtenidos de manera diferente. Primero fue purificada la enzima recombinante AtPPa1, expresada en *Escherichia coli* y, por otro lado, se obtuvo una pirofosfatasa extraída del tejido placentario de *Capsicum annuum* purificada mediante HPLC. Ambas enzimas ya habían sido purificadas mediante protocolos bien establecidos anteriormente, por lo que se sabía de antemano que era posible obtener cantidades suficientes de estas enzimas y con suficiente actividad pirofosfatasa para su posterior uso en ensayos de actividad [31].

Como se ha comentado, en la purificación de las dos enzimas, como se describe en las metodologías, fue necesario mantener las enzimas en amortiguadores sin EDTA antes de su uso en ensayos de actividad con Au-NPs debido a que no es compatible con este sistema como ya se explicó anteriormente

Bajo las condiciones mencionadas anteriormente, es posible seguir la actividad pirofosfatasa para ambas enzimas, midiendo de manera constante en un espectro UV-Vis el cambio en el cociente  $A_{522}/A_{650}$ .

El interés de evaluar dos diferentes preparaciones de enzimas fue de validar el método con una preparación muy pura y con una preparación en la que existieran otras proteínas contaminantes, pero que además tuviera la proteína natural, tal como se recupera de la planta. Una vez estandarizado este método se buscó observar el efecto del Pi en la actividad pirofosfatasa en ambas enzimas.

Se determinó que la enzima AtPPa1 ve disminuida su actividad inicial conforme las concentraciones de Pi en el medio de reacción aumentan, determinándose que

a una concentración de  $274.7 \pm 44.5 \mu\text{M}$  de Pi su actividad inicial disminuye a la mitad. Este resultado es de mucho interés para los interesados en la regulación del metabolismo de pirofosfato, porque puede contribuir a explicar la permanencia del pirofosfato en el citoplasma de las células vegetales, aun cuando la proteína AtPPa1 es justamente una pirofosfatasa vegetal localizada en citoplasma [90] y cuya expresión parece ser constitutiva [1].

En el caso del efecto que genera un exceso de PPi, se observó que la velocidad inicial en la actividad pirofosfatasa decrece ligeramente cuando es mayor su concentración, resultados que fueron similares a los obtenidos en ensayos de actividad realizados anteriormente con el método de verde de Malaquita en el laboratorio [1].

La reducción en la actividad por exceso de PPi, también puede contribuir a explicar la constancia de la concentración de PPi en el citoplasma de la célula vegetal, aun en presencia de la AtPPa1, cuya expresión parece ser constitutiva. Como se discutió en la introducción, aun bajo condiciones de bajo fosfato en la planta, los niveles de PPi se mantienen constantes en la célula [1].

Para el caso de la pirofosfatasa extraída de la placenta de *C. annuum*, el análisis por electroforesis SDS-PAGE reveló que la banda al PM que corresponde a las pirofosfatasas (25 kDa) es tenue y se observan bandas mucho más intensas arriba de este PM, por lo que la actividad en la preparación es baja. Sin embargo, la pirofosfatasa purificada de *C. annuum* tiene propiedades diferentes a la obtenida como proteína recombinante y sugiere que las distintas proteínas pueden comportarse de modo distinto. En este momento, no sabemos con exactitud que localización subcelular o patrón de expresión tiene la enzima de *C. annuum*, pero será interesante que estudios futuros aborden un análisis más detallado de las diferencias en la sensibilidad a fosfato de las pirofosfatasas vegetales.

Este ensayo permite por primera vez evaluar el efecto del Pi sobre las pirofosfatasas, debido que hasta ahora los métodos para la medición de actividad pirofosfatasa se basaban principalmente en la cuantificación de este Pi; a

diferencia del ensayo de Au-NPs, el cual se basa en el cambio en el espectro de absorción entre los estados agregado y disperso de las Au-NPs generados por el  $Mg^{2+}$ , que puede estar libre o no dependiendo de la cantidad de PPI unido a él.

Finalmente se realizó una comparación entre el ensayo de Au-NPs y el de verde de Malaquita para ambas pirofosfatasa analizadas a tres diferentes concentraciones equimolares de  $Mg^{2+}$  y PPI.

Los ensayos realizados para la AtPPa1 muestran comportamientos diferentes a los obtenidos en el ensayo de Au-NPs, debido a que se observó que aun aumento en la concentración equimolar de PPI y  $Mg^{2+}$  no generan algún tipo de inhibición en la actividad pirofosfatasa, por el contrario existe mayor actividad pirofosfatasa en los ensayos con mayor concentración equimolar de PPI y  $Mg^{2+}$ .

Para el caso de la proteína obtenida de *Capsicum annuum* se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para AtPPa1, observándose una mayor actividad pirofosfatasa a concentraciones equimolares mayores de PPI y  $Mg^{2+}$ . Claramente se requerirá estudios posteriores para resolver este punto y explicar la falta de concordancia en los resultados observados.

## 9. CONCLUSIONES

- La pirofosfatasa 1 de *Arabidopsis thaliana* reduce su actividad a 50% por efecto de la presencia de Pi a concentraciones fisiológicas, lo que podría regular su actividad in vivo. Este hallazgo es de sumo interés para entender el metabolismo de pirofosfato y su relación en el control del metabolismo biosintético, en los vegetales superiores. Sin embargo este comportamiento no es general para todas las pirofosfatasas, ya que en el caso de la pirofosfatasa extraída de *C. annuum* no se observó dicha inhibición.
- Los resultados en este trabajo demuestran que la agregación de AuNPs-Cys es dependiente de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y PPI y que puede aplicarse en a un ensayo continuo de actividad, pero solo bajo un rango restringido de concentraciones de sustrato y catión divalente, lo que limita su utilidad.
- La presencia de EDTA no es compatible con el sistema AuNPs-Cys, por lo que debe trabajarse con preparaciones muy limpias en las que la presencia de cationes metálicos contaminantes como  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , etc., que interfieren con la actividad y con el ensayo de Au-NPs, se evite.
- La concentración de amortiguador tolerada es muy baja (10  $\mu M$ ), por lo que realmente no estaría ejerciendo un amortiguamiento efectivo del pH, por lo que se tendrá que explorar otro posible amortiguador que resulte compatible con este sistema, pero que tenga la capacidad de amortiguamiento requerida.

#### IV. REFERENCIAS

- [1] Navarro-De la Sancha E., Coello-Coutiño M. P., Valencia-Turcotte L. G., Hernández-Domínguez E. E., Trejo-Yepes G., Rodríguez-Sotres R. Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. 2007. Plant Science, Volumen 172, p. 796–807.
- [2] Navarro-De la Sancha E. Identificación y caracterización de genes de pirofosfatasa posiblemente implicados en respuesta a la deficiencia de fosfato. 2005. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- [3] Chen J., Brevet A., Fromant M., Lévêque F., Schmitter J. M., Blanquet S., Plateau P.. Pyrophosphatase Is Essential for Growth of *Escherichia coli*. 1990. Journal of Bacteriology, Volumen 172, p. 5686-5689.
- [4] Basilio-Velázquez J. Mecanismo de inhibición por calcio de la isoforma uno de pirofosfatasa de *Arabidopsis Thaliana*. 2013. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- [5] Gaytán-Mondragón S. La pirofosfatasa inorgánica soluble de cloroplastos de plantas superiores: estudio cinético y modelado de su estructura. 2013. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- [6] De Villafanca-Casas M. J. Alteraciones en la expresión génica de mutantes de *Arabidopsis thaliana* como resultado de la deficiencia en una pirofosfatasa soluble. 2011. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- [7] Hernández-Domínguez E. Caracterización de pirofosfatasas en relación a la deficiencia de fosforo en plantas. 2012. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- [8] Hernández-Domínguez E. E., Valencia-Turcotte L. G., Rodríguez-Sotres R. Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation. 2012. Plant Science, Volumen 187, p. 39–48.

**[9]** Hernández-Verdugo S. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 1999. Volumen 64, p. 65-84.

**[10]** Korngberg A. On the metabolic significance of phosphorylic and pyrophosphorylic reactions. 1962. IN: Horizons in Biochemistry. p. 251-264.

**[11]** Kanno S., Cuyas L., Javot H., Bligny R., Gout E., Darteville T., Hanchi M., Nakanishi T. M., Thibaud M., Nussaume L. Performance And Limitations Of Phosphate Quantification: Guidelines For Plant Biologists. 2016. Plant and Cell Physiology, Volumen 57, p. 690-706.

**[12]** Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology. 2000. 4th edition New York: W. H. Freeman. ISBN-10: 0-7167-3136-3.

**[13]** Svetlana M. Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. 1989. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. Volumen 977, p. 237–247.

**[14]** Van Veldhoven P. P., Mannaerts G. P. Inorganic and Organic Phosphate Measurements in the Nanomolar Range. 1987. Analytical Biochemistry, Volumen 161, p. 45-48.

**[15]** May A., Berger S., Hertel T., Köck M. The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene AtPPsPase1 encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. 2011. Biochimica et Biophysica Acta 1810, p. 178–185.

**[16]** Weiner H., Stitt M., Heldt H. W. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. 1987. Biochimica et Biophysica, Acta 893, p. 13-21.

**[17]** Sivula T., Salminen A., Parfenyev A. N., Pohjanjoki P., Goldman A., Cooperman B. S., Baykov A. A., Lahti R. Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. 1999. FEBS Letters, Volumen 454, p. 75-80.

**[18]** V. R. Samygina, A. N. Popov, E. V. Rodina, N. N. Vorobyeva, V. S. Lamzin, K. M. Polyakov, S. A. Kurilova, T. I. Nazarova, S. M. Avaeva. The structures of

*Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{CaPPi}$  at atomic resolution and their mechanistic implications. 2001. *Journal of Molecular Biology*, Volumen 314, p. 633 - 645.

**[19]** Stitt M., Wirtz W., Heldt H. W. Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartments of spinach protoplasts. 1980. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 593, p. 85—102.

**[20]** Heinoen, J.K., ed. The biological role of inorganic pyrophosphate. 2001. Kluwer Academic Publisher: Boston USA. pp 10-13.

**[21]** Krishnan V. A., Gnanam A. Properties and regulation of  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from *Sorghum vulgare* leaves. 1988. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volumen 260, p. 277-284.

**[22]** Schulzea S., Mant A., Kossmann J., Lloyd J. R. Identification of an *Arabidopsis* inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. 2004. *FEBS Letters*, Volumen 565, p. 101–105.

**[23]** Perales-Bolaños. Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* y su respuesta en condiciones de estrés. 2008. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

**[24]** Gutiérrez-Luna M. F. Tesis de Doctorado, en preparación. Facultad de Química, UNAM.

**[25]** Koroleva O. A., Tomlinson M. L., Leader D., Shaw P., Doonan J.H. High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. 2004. *The Plant Journal*, Volumen 41, p. 162-174.

**[26]** Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S., Dang L. M., Allen G. J., Alper S. L., Fink G. R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1  $\text{H}^+$ -pump. 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Volumen 98, p.11444-9.

**[27]** Camara B., Bardat F., Monéger R. Sites of Biosynthesis of Carotenoids in *Capsicum* Chromoplasts. 1982. European Journal of Biochemistry. Volumen 127, p. 255-258.

**[28]** Lara-Núñez A., Rodríguez-Sotres R. Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for L-malate in non-photosynthetic plastids from developing maize embryos. 2004. Plant Science, Volumen 166, p. 1335 - 1343.

**[29]** Mortain Bertrand A., Uteau F., Enault N., D'harlingue A., Schaeffer J., Lamant A. Characterization of alkaline inorganic pyrophosphatase from *Capsicum annuum* chromoplasts. 1992. Plant Physiology and Biochemistry, Volumen 30, p. 779-788.

**[30]** Kim S., Park M., Yeom S., Kim Y., Lee J. M., Lee H., Seo E., Choi J., Cheong K., Kim K., Jung K., Lee G., Oh S., Bae C., Kim S., Lee H., Kim S., Kim M., Kang B., Jo Y. D., Yang H., Jeong H., Kang W., Kwon J., Shin C., Lim J. Y., Park J. H., Huh J. H., Kim J., Kim B., Cohen O., Paran I., Suh M. C., Lee S. B., Kim Y., Shin Y., Noh S., Park J., Seo Y. S., Kwon S., Kim H. A., Park J. M., Kim H., Choi S., Bosland P. W., Reeves G., Jo S., Lee B., Cho H., Choi H., Lee M., Yu Y., Do Choi Y., Park B., van Deynze A., Ashrafi H., Hill T., Kim W. T., Pai H., Ahn H. K., Yeam I., Giovannoni J. J., Rose J. K. C., Sorensen I., Lee S., Kim R. W., Choi I., Choi B., Lim J., Lee Y., Choi D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in capsicum species. Nature Genetics, Volumen 46, p. 270-278.

**[31]** Andrade-Luna R. A., tesis de Licenciatura, 2016, en preparación. Facultad de Química, UNAM.

**[32]** Bartolommei G., Moncelli M. R., Tadini-Buoninsegni F. A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases). 2013. PLoS One 8(3):e58615.

- [33]** Deng J., Jiang Q., Wang Y., Yang L., Yu P., Mao L. Real-time colorimetric assay of inorganic pyrophosphatase activity based on reversibly competitive coordination of  $\text{Cu}^{2+}$  between cysteine and pyrophosphate ion. 2013. *Analytical Chemistry*, Volumen 85, p. 9409-9415.
- [34]** Njoki P. N., Lim I. S., Mott D., Park H., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C. J. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. 2007. *The Journal of Physical Chemistry*, Volumen 111, p. 14664-14669.
- [35]** Kim S., Eom M., Kim S., Seo S., Han M. A highly sensitive gold nanoparticle-based colorimetric probe for pyrophosphate using a competition assay approach. 2013. *Chemical Communications*, Volumen 49, p. 152-4
- [36]** Aryal S., B. K. C. R., Dharmaraj N., Bhattarai N., Kim C. H., Kim H. Y. Spectroscopic identification of S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. 2006. *Spectrochimica Acta Part A*, Volumen 63, p. 160–163.
- [37]** McFarland A. D., Haynes C. L., Mirkin C. A., Van Duyne R. P., Godwin H. A. Color My Nanoworld. 2004. *Journal of Chemical Education*, Volume 81, p. 544A.
- [38]** Acres R. G., Feyer V., Tsud N., Carlino E., Prince K. C. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. 2014. *The Journal of Physical Chemistry*, Volumen 118, p. 10481 –10487.
- [39]** Caprile L., Cossaro A., Falletta E., Della Pina C., Cavalleri O., Rolandi R., Terreni S., Ferrando R., Rossi M. Floreano L., Canepa M. Interaction of L-cysteine with naked gold nanoparticles supported on HOPG: a high resolution XPS investigation. 2012. *Nanoscale*, Volumen 4, 7727-34.
- [40]** Mocanu A., Cernica I., Tomoaia G., Bobos L., Horovitz O., Tomoaia-Cotisel M. Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine. 2009. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volumen 338, p. 93–101.

**[41]** Alshammari A., Köckritz A., Kalevaru V. N., Bagabas A., Martin A. Influence of Single Use and Combination of Reductants on the Size, Morphology and Growth Steps of Gold Nanoparticles in Colloidal. 2012. Mixture Open Journal of Physical Chemistry, Volumen 2, p. 252-261.

**[42]** Li C., Li D., Wan G., Xu J., Hou W. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. 2011. Nanoscale Research Letters, 6:440.

**[43]** Luthuli S. D., Chili M. M., Revaprasadu N., Shonhai A. Cysteine - Capped Gold Nanoparticles Suppress Aggregation of Proteins Exposed to Heat Stress. 2013. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volumen 65, Number 5, p. 454-461.

**[44]** Li C., Li D., Wan G., Xu J., Hou W. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. 2011. Nanoscale Research Letters, 6:440.

**[45]** Wang T., Hu X., Dong S. The fragmentation of gold nanoparticles induced by small biomolecules. 2008. Chemical Communications, p. 4625–4627.

**[46]** Wang Y., Wang J., Yang F., Yang X. Spectrophotometric Determination of Cysteine with Gold Nanoparticles Stabilized with Single-stranded Oligonucleotides. 2010. Analytical Sciences, Volumen 26, p. 545-549

**[47]** Zhuang X., Wang D., Yang L., Yu P., Jiang W., Mao L. Cysteine-modulated colorimetric sensing of extracellular  $Mg^{2+}$  in rat brain based on the strong chelation interaction between dithiothreitol and  $Mg^{2+}$ . 2013. Analyst, Volumen 138, p. 3046-3052

**[48]** Deng H., Li G., Liu A., Chen W., Lin X., Xia X. Thermally treated bare gold nanoparticles for colorimetric sensing of copper ions. 2014. Microchimica Acta, Volumen 181, p. 911–916.

**[49]** Chai F., Wang C., Wang T., Ma Z., Su Z. L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg<sup>2+</sup> induced by ultraviolet light. 2010. *Nanotechnology* 21, 025501 (6pp).

**[50]** Sung Y., Wu S. Colorimetric detection of Cd(II) ions based on di-(1H-pyrrol-2-yl)methanethione functionalized gold nanoparticles. 2014. *Sensors and Actuators, B* 201, p. 86–91.

**[51]** Chansuvarna W., Tuntulanib T., Imyimb A. Colorimetric detection of mercury(II) based on gold nanoparticles, fluorescent gold nanoclusters and other gold-based nanomaterials. 2015. *Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 65, p. 83–96.

**[52]** Li X., Wang Z. Gold Nanoparticle-based Colorimetric Assay for Determination of Lead (II) in Aqueous Media. 2010. *Chemical Research in Chinese Universities*, Volumen 26, p. 194-197.

**[53]** Zhang Y., Chen J., Bai L., Zhou X., Wang L. Gold Nanoparticle-based Optical Probe for Quick Colorimetric Visualization of Cysteine. 2010. *Journal of the Chinese Chemical Society*, Volumen 57, p. 972-975.

**[54]** Kim Y., Johnson R. C., Hupp J. T. Gold Nanoparticle-Based Sensing of “Spectroscopically Silent” Heavy Metal Ions. 2001. *Nano Letters*, Volumen 1, p. 165–167.

**[55]** Wu S. P., Chen Y. P., Sung Y. M. Colorimetric detection of Fe<sup>3+</sup> ions using pyrophosphate functionalized gold nanoparticles. 2011. *Analyst*, Volumen 136, p. 1887-1891.

**[56]** Deng J., Yu P., Yang L., Mao L. Competitive Coordination of Cu<sup>2+</sup> between Cysteine and Pyrophosphate Ion: Toward Sensitive and Selective Sensing of Pyrophosphate Ion in Synovial Fluid of Arthritis Patients. 2013. *Analytical Chemistry*, Volumen 85, p. 2516–2522.

**[57]** Wang H., Xu W., Zhang H., Li D., Yang Z., Xie x., Li T., Liu X. EcoRI-Modified Gold Nanoparticles for Dual-Mode Colorimetric Detection of Magnesium and Pyrophosphate Ions. 2011. *Small*, Volumen 7, p. 1987–1992.

**[58]** Majzik A., Fülöp L., Csapó E., Bogár F., Martinek T., Penke B., Bíró G., Dékány I. Functionalization of gold nanoparticles with amino acid,  $\beta$ -amyloid peptides and fragment. 2010. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volumen 81, p. 235–241.

**[59]** Mortain Bertrand A., Uteau F., Enault N., D'harlingue A., Schaeffer J., Lamant A. Characterization of alkaline inorganic pyrophosphatase from *Capsicum annuum* chromoplasts. 1992. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volumen 30, p. 779-788.

**[60]** Hernández-Verdugo S. Importancia del chile silvestre (*Capsicum annuum*) como recurso genético de México. 2014. *Mensaje Bioquímico*, Volumen X *Plant Physiology and Biochemistry LI*.

**[61]** Huang X., Zhang J. 2006. Surfactant-sensitized malachite green method for trace determination of orthophosphate in aqueous solution. *Analytica Chimica*, Volumen 580, p. 55 - 67.

**[62]** Bitesizebio. 2011. *Ask a Chemist: How Colorimetric Assays Work*. [En línea] (Actualizado al 18 de julio de 2011). Disponible en: <http://bitesizebio.com/7214/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/> [Último acceso el 19 de marzo de 2015].

**[63]** Baykov A. A., Evtushenko O. A., Avaeva S. M. A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay. 1988. *Analytical Biochemistry*, Volumen 171, p. 266-270.

**[64]** Huang X., Zhang J. Kinetic spectrophotometric determination of submicromolar orthophosphate by molybdate reduction. 2008. *Microchemical Journal*, Volumen 89, p. 58–71.

- [65]** Zhang J. Z., Fischer C. J., Ortner P. B. Continuous Flow Analysis of Phosphate in Natural Waters Using Hydrazine as a Reductant. 2001. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Volumen 80, p. 61-73
- [66]** Altmann H. J., Gielewski A., Scholz L. Photometric determination of small amounts of o-phosphate with Malachite Green. 1971. Analytical and Bioanalytical Chemistry, p. 256- 274.
- [67]** Itaya K., Ui M. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. 1966. Clinica Chimica Acta, Volumen 14, p. 361.
- [68]** Motomizu S., Wakimoto T., Tôei K. Spectrophotometric determination of phosphate in river waters with molybdate and Malachite Green. 1983. The Analyst, Volumen 108, p. 361-367.
- [69]** Penney, C.L. A simple micro-assay for inorganic phosphate. 1976. Analytical Biochemistry, Volumen 75, p. 201-210.
- [70]** Motomizu S., Oshima M., Hirashima A. Spectrophotometric determination of phosphorus in river water based on the reaction of vanadomolybdophosphate with malachite Green. 1988. Analytical Chemistry Acta, Volumen 211, p. 119-127.
- [71]** Drummond L., Maher W. Determination of phosphorus in aqueous solution via formation of the phosphoantimonymolybdenum blue complex. Re-examination of optimum conditions for the analysis of phosphate. 1995. Analytical Chemistry Acta, Volumen 302, p. 69-74.
- [72]** Denisona F. H., Haygarthb P. M., Housea W. A., Bristowb A. W. The measurement of dissolved phosphorus compounds: Evidence for hydrolysis during storage and implications for analytical definitions in environmental analysis. 1998. Int. J. Environ. Analytical Chemistry, Volumen 69, p. 111-123.
- [73]** Tarapchak S.J. Soluble reactive phosphorus measurements in lake water: Evidence for molybdate-enhanced hydrolysis. 1983. Journal of Environmental Quality, Volumen 12, p. 105-108.

- [74] Itoh T., Hisada H., Usui Y., Fujii Y. Hydrolysis of phosphate esters catalyzed by copper(II)-triamine complexes. The effect of triamine ligands on the reactivity of the copper(II) catalysts. 1998. *Inorganica Chimica Acta*, Volumen 283, p. 51-60.
- [75] Cooperman B.S., Baykov A. A., Lahti R. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. 1992. *Trends in Biochemical Sciences*, Volumen 17, p. 262-266.
- [76] Camara B., Dogbo O., d'Harlingue A., Kleinig H., Monéger R. Metabolism of plastid terpenoids: lycopene cyclization by *Capsicum* chromoplast membranes. 1985. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 836, p. 262- 266.
- [77] Gómez-García M. R., Losada M., Serrano A. A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. 2006. *Biochemical Journal.*, Volumen 395, p. 211–221.
- [78] Gómez-García M. R., Losada M., Serrano A. Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. 2007. *FEBS Journal*, Volumen 274, p. 3948–3959.
- [79] Cooper, B.S. The Mechanism of Action of Yeast Inorganic Pyrophosphatase. 1982. *Methods In Enzymology*, Volumen 87, p. 526-548.
- [80] Zyryanov A. B., Shestakov A. S., Lahti R., Baykov A. A. Mechanism by which metal cofactors control substrate specificity in pyrophosphatase. 2002. *Biochemical Journal*. Volumen 367, p. 901–906.
- [81] Chen J., Brevet A., Fromant M., Lévêque F., Schmitter J. M., Blanquet S., Plateau. Pyrophosphatase Is Essential for Growth of *Escherichia coli*. 1990. *Journal of Bacteriology*, Volumen 172, p. 5686-5689.
- [82] *Plant Physiology and Development*. 2015. Metabolic Flexibility Helps Plants to Survive Stress [En línea]. (Actualizado al 2015). Disponible en: <http://6e.plantphys.net/essay12.01.html> [Último acceso el 15 de marzo de 2016].

**[83]** MRSEC Education Group. 2008. Citrate Synthesis of Gold Nanoparticles. [En línea] (Actualizado al 2008). Disponible en: <http://education.mrsec.wisc.edu/nanolab/gold/> [Último acceso el 15 de marzo de 2016].

**[84]** Remant Bahadur K.C., Thapa B., Bhattarai N. Gold nanoparticle-based gene delivery: promises and challenges. 2013. *Nanotechnology Reviews*. Volumen 3, p. 269–280.

**[85]** Sigma-Aldrich. 2016. Gold Nanoparticles: Properties and Applications. [En línea]. (Actualizado al 2016) <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html> [Último acceso el 15 de marzo de 2016].

**[86]** Cytodiagnosics. 2016. Gold Nanoparticle Properties. [En línea]. (Actualizado al 2016) <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Gold-Nanoparticle-Properties-d2.htm>

**[87]** Dyballa N., Metzger S. Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. 2009. *Journal of Visualized Experiments*, Volumen 30, p. 1431.

**[88]** The Arabidopsis Information Resource [En línea]. (Actualizado al 2016) <https://www.arabidopsis.org> [Último acceso el 31 de mayo de 2016].

**[89]** Grzechowiak, M., Ruszkowski, M., Sikorski, M., Jaskolski, M. 2015, Crystal structure of Inorganic Pyrophosphatase PPA1 from *Arabidopsis thaliana*. RCSB Protein Data Bank Entry 4LUG, DOI: 10.2210/pdb4lug/pdb.

**[90]** Gutiérrez-Luna FM, Navarro de la Sancha E, Valencia-Turcotte LG, Vázquez-Santana S, Rodríguez-Sotres R. Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. 2016. *Plant Science*, Sometido

**[91]** Takeshige K., Tazawa M. Determination of the Inorganic Pyrophosphate Level and Its Subcellular Localization in *Chara corallina*. 1989. The journal of biological chemistry, Volumen 264, p. 3262-3266.