



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“IDENTIFICACIÓN *IN SÍLICO* DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN  
EN EL PROCESO DE BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES Y SU  
REGULACIÓN EN *Helianthus annuus*”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Presentado para optar al grado académico de:**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: TIPANQUIZA DUQUE JESENIA CUMANDÁ**

**TUTOR: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M.Sc.**

**Riobamba-Ecuador**

**2018**

**©2018, Jesenia Cumandá Tipanquiza Duque**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: “IDENTIFICACIÓN *IN SÍLICO* DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES Y SU REGULACIÓN EN *Helianthus annuus*”, de responsabilidad de la señorita, Jesenia Cumandá Tipanquiza Duque, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Lic. Karen Acosta M.Sc.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DIRECTOR DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

BQF. Valeria Rodríguez M.Sc.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Yo, Jesenia Cumandá Tipanquiza Duque declaro que el presente Trabajo de titulación es de mi total autoría, por lo tanto soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el mismo, y el patrimonio intelectual del Trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

---

Jesenia Cumandá Tipanquiza Duque

050295601-4

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres, razón e inspiración de alcanzar el éxito.

Jesenia

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios en primer lugar, por la vida y por la bendición de tener a los mejores padres, quienes con su esfuerzo, sacrificio y apoyo han hecho posible, que culmine esta etapa en mi formación profesional, al tiempo que han inculcado en mí, valores humanos invaluable para el desenvolvimiento en cualquier ámbito.

A todos quienes me brindaron su apoyo moral y económico a lo largo de mi carrera universitaria, por creer a mí, e incentivar a continuar.

Mi profundo agradecimiento y gratitud a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Bioquímica y Farmacia, por abrirme las puertas para estudiar la carrera que tanto anhelaba.

A mis profesores, quienes han contribuido con mi formación; y a mis amigos con quienes he reído y he llorado, que han sido parte de mi vida por todos estos años.

A todas las personas que, tienen fe en mí y que de alguna forma han colaborado para hacer esto posible.

Jesenia

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>CH</b>	Chalcona sintasa
<b>CHI</b>	Chalcona isomerasa
<b>BAN</b>	Antocianidina reductasa
<b>DFR</b>	Dihidroflavonol reductasa
<b>EBI</b>	European Bioinformatics Institute
<b>EGB</b>	Genes biosintéticos tempranos
<b>F3'H</b>	Flavonoide 3'-hidroxilasa
<b>LAR</b>	Leucoantocianidina reductasa
<b>LDOX</b>	Leucoantocianidina dioxigenasa
<b>LGB</b>	Genes biosintéticos tardíos
<b>LTR</b>	Repetición terminal larga
<b>M</b>	Molar
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>SIB</b>	Swiss Institute of Bioinformatics

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xxi
SUMARY.....	xxii
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1 Fundamentación teórica conceptual.....	3
1.1.1 <i>Biosíntesis de flavonoides</i> .....	3
1.1.1.1 <i>Flavonoides</i> .....	3
1.1.1.2 <i>Función de los flavonoides</i> .....	4
1.1.2 <i>Rutas de biosíntesis de flavonoides</i> .....	5
1.1.3 <i>Enzimas</i> .....	6
1.1.3.1 <i>Clases de enzimas</i> .....	6
1.1.4 <i>Helianthus annuus</i> .....	6
1.1.5 <i>Flavonoides de Helianthus annuus</i> .....	7
1.1.6 <i>Metabolón</i> .....	8
1.1.7 <i>Biología Molecular</i> .....	9
1.1.8 <i>Código genético</i> .....	9
1.1.9 <i>Genoma</i> .....	9
1.1.10 <i>Bioinformática</i> .....	10
1.1.10.1 <i>Aplicaciones de la Bioinformática</i> .....	10
1.1.11 <i>Identificación in silico</i> .....	10
1.1.12 <i>Base de datos</i> .....	11
1.1.13 <i>Kegg</i> .....	11
1.1.14 <i>Blast NCBI</i> .....	11
1.1.15 <i>TMHMM</i> .....	12

1.1.16	<i>String</i> .....	12
1.1.17	<i>Expasy</i> .....	12
1.1.18	<i>Protein Model Portal</i> .....	12
1.1.19	<i>Swiss model</i> .....	13

## CAPÍTULO II

2	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	14
2.1	<b>Tipo y diseño de estudio</b> .....	14
2.1.1	<i>Unidad de análisis</i> .....	14
2.1.2	<i>Población de estudio</i> .....	14
2.1.3	<i>Tamaño de la muestra</i> .....	14
2.2	<b>Lugar de la investigación</b> .....	14
2.3	<b>Materiales</b> .....	14
2.4	<b>Métodos</b> .....	15
2.4.1	<i>Extracción de datos del genoma de <i>Helianthus annuus</i></i> .....	16
2.4.1.1	<i>Accesión a la base de datos Kegg</i> .....	16
2.4.1.2	<i>Búsqueda de la ruta biosintética de flavonoides</i> .....	16
2.4.1.3	<i>Búsqueda de la secuencia de aminoácidos de todas las enzimas</i> .....	17
2.4.1.4	<i>Obtención de la secuencia de aminoácidos de la enzima</i> .....	17
2.4.2	<b>BLAST de secuencias de aminoácidos</b> .....	18
2.4.2.1	<i>Accesión al portal BLAS</i> .....	18
2.4.2.2	<i>Alineación BLAST de la Secuencia de aminoácidos</i> .....	18
2.4.2.3	<i>Resultados BLAST</i> .....	19
2.4.3	<b>Predicción de hélices transmembranales</b> .....	20
2.4.4	<b>STRING de secuencias de aminoácidos</b> .....	21
2.4.5	<b>Cálculo del punto isoeléctrico y masa molecular</b> .....	22
2.4.6	<b>Modelación tridimensional de la enzima</b> .....	23
2.4.7	<b>Predicción de sitios de unión a ligandos</b> .....	24

## CAPÍTULO III

3	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	25
3.1	<b>Enzima Chalona sintasa</b> .....	25

3.1.1	<i>Secuencia de aminoácidos de chalcona sintasa</i> .....	25
3.1.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	25
3.1.3	<i>Reacción de catálisis de chalcona sintasa</i> .....	26
3.1.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de chalcona sintasa</i> .....	27
3.1.5	<i>Hélices transmembrana de chalcona sintasa</i> .....	28
3.1.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de chalcona sintasa</i> .....	29
3.1.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para chalcona sintasa</i> .....	30
3.1.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	31
3.2	<b>Enzima Chalcona isomerasa</b> .....	32
3.2.1	<i>Secuencia de aminoácidos de chalcona isomerasa</i> .....	32
3.2.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	32
3.2.3	<i>Reacción de catálisis de chalcona isomerasa</i> .....	33
3.2.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de chalcona isomerasa</i> .....	33
3.2.5	<i>Hélices transmembrana de chalcona isomerasa</i> .....	34
3.2.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de chalcona isomerasa</i> .....	35
3.2.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para chalcona isomerasa</i> .....	37
3.2.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	37
3.3	<b>Enzima Naringenina 3-dioxigenasa</b> .....	38
3.3.1	<i>Secuencia de aminoácidos de naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	38
3.3.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	38
3.3.3	<i>Reacción de catálisis de naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	39
3.3.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	39
3.3.5	<i>Hélices transmembrana de naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	41
3.3.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	41
3.3.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para naringenina 3-dioxigenasa</i> .....	43
3.3.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	44
3.4	<b>Enzima Flavonol sintasa</b> .....	44
3.4.1	<i>Secuencia de aminoácidos de flavonol sintasa</i> .....	44
3.4.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	45
3.4.3	<i>Reacción de catálisis de flavonol sintasa</i> .....	46
3.4.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de flavonol sintasa</i> .....	64
3.4.5	<i>Hélices transmembrana de flavonol sintasa</i> .....	47

3.4.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de flavonol sintasa</i> .....	48
3.4.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para flavonol sintasa</i> .....	49
3.4.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	50
3.5	<b>Enzima Trans-cinamato 4-monooxigenasa</b> .....	50
3.5.1	<i>Secuencia de aminoácidos de trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	50
3.5.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	51
3.5.3	<i>Reacción de catálisis de trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	52
3.5.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	52
3.5.5	<i>Hélices transmembrana de trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	53
3.5.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	54
3.5.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para trans-cinamato 4-monooxigenasa</i> .....	54
3.5.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	55
3.6	<b>Enzima Dihidroflavonol 4-reductasa</b> .....	55
3.6.1	<i>Secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	55
3.6.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	56
3.6.3	<i>Reacción de catálisis de dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	57
3.6.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	57
3.6.5	<i>Hélices transmembrana de dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	58
3.6.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	59
3.6.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para dihidroflavonol 4-reductasa</i> .....	59
3.6.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	60
3.7	<b>Enzima Flavonoide 3'-monooxigenasa</b> .....	60
3.7.1	<i>Secuencia de aminoácidos de flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	60
3.7.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	61
3.7.3	<i>Reacción de catálisis de flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	61
3.7.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	62
3.7.5	<i>Hélices transmembrana de flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	63
3.7.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	64
3.7.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para flavonoide 3'-monooxigenasa</i> .....	65

3.7.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	66
3.8	<b>Enzima Leucoantocianidina dioxigenasa</b> .....	66
3.8.1	<i>Secuencia de aminoácidos de leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	66
3.8.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	67
3.8.3	<i>Reacción de catálisis de leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	67
3.8.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	68
3.8.5	<i>Hélices transmembrana de leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	69
3.8.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	71
3.8.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para leucoantocianidina dioxigenasa</i> .....	69
3.8.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	72
3.9	<b>Enzima Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</b> .....	72
3.9.1	<i>Secuencia de aminoácidos de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	72
3.9.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	73
3.9.3	<i>Reacción de catálisis de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	73
3.9.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	74
3.9.5	<i>Hélices transmembrana de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	75
3.9.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	75
3.9.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa</i> .....	76
3.9.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	76
3.10	<b>Enzima Leucoantocianidina reductasa</b> .....	77
3.10.1	<i>Secuencia de aminoácidos de leucoantocianidina reductasa</i> .....	77
3.10.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	77
3.10.3	<i>Reacción de catálisis de leucoantocianidina reductasa</i> .....	78
3.10.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de leucoantocianidina reductasa</i> .....	78
3.10.5	<i>Hélices transmembrana de leucoantocianidina reductasa</i> .....	79
3.10.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de leucoantocianidina reductasa</i> .....	80

3.10.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para leucoantocianidina reductasa</i> .....	80
3.10.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	81
3.11	<b>Enzima Cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</b> .....	81
3.11.1	<i>Secuencia de aminoácidos de cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</i> .....	81
3.11.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	82
3.11.3	<i>Reacción de catálisis de cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</i> .....	83
3.11.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de cumaroil shikimato 3'-monooxigenas</i> .....	83
3.11.5	<i>Hélices transmembrana de cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</i> .....	84
3.11.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</i> .....	85
3.11.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para cumaroil shikimato 3'-monooxigenasa</i> .....	87
3.10.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	87
3.12	<b>Enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa</b> .....	88
3.12.1	<i>Secuencia de aminoácidos de cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	88
3.12.2	<i>Interpretación biológica de la enzima</i> .....	88
3.12.3	<i>Reacción de catálisis de cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	89
3.12.4	<i>Alineamiento local de la secuencia de aminoácidos de cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	89
3.12.5	<i>Hélices transmembrana de cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	90
3.12.6	<i>Redes de interacción proteína-proteína de cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	91
3.12.7	<i>Modelado estructural tridimensional predicho para cafeoil-CoA-metiltransferasa</i> .....	91
3.12.8	<i>Predicción de sitios de unión a ligandos</i> .....	92
3.13	<b>Factores de regulación de la biosíntesis de flavonoides en Helianthus annuus</b> .....	92
3.13.1	<i>Regulación transcripcional de la biosíntesis de flavonoides en Helianthus annuus</i> .....	93
3.13.2	<i>Regulación fisiológica de la biosíntesis de flavonoides en Helianthus annuus</i> .....	93
3.13.2.1	<i>Retroalimentación positiva</i> .....	94
3.13.2.2	<i>Retroalimentación negativa</i> .....	94

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>96</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-3:</b>	Características de la enzima Chalcona sintasa.....	25
<b>Tabla 2-3:</b>	Interacciones funcionales de Chalcona sintasa.....	29
<b>Tabla 3-3:</b>	Características de la enzima Chalcona isomerasa.....	32
<b>Tabla 4-3:</b>	Interacciones funcionales de Chalcona isomerasa.....	35
<b>Tabla 5-3:</b>	Características de la enzima Naringenina 3-dioxigenasa.....	38
<b>Tabla 6-3:</b>	Interacciones funcionales Naringenina 3-dioxigenasa.....	41
<b>Tabla 7-3:</b>	Características de la enzima Flavonol sintasa.....	45
<b>Tabla 8-3:</b>	Interacciones funcionales de Flavonol sintasa.....	48
<b>Tabla 9-3:</b>	Características de la enzima Trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	51
<b>Tabla 10-3:</b>	Características de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa.....	56
<b>Tabla 11-3:</b>	Características de la enzima Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	61
<b>Tabla 12-3:</b>	Interacciones funcionales de Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	64
<b>Tabla 13-3:</b>	Características de la enzima Leucoantocianidina dioxigenasa.....	67
<b>Tabla 14-3:</b>	Interacciones funcionales de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	70
<b>Tabla 15-3:</b>	Características de la enzima Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	73
<b>Tabla 16-3:</b>	Características de la enzima Leucoantocianidina reductasa.....	77
<b>Tabla 17-3:</b>	Características de la enzima Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	82
<b>Tabla 17.3:</b>	Interacciones funcionales de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	85
<b>Tabla 18-3:</b>	Características de la enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Clasificación de flavonoides.....	4
<b>Figura 2-1:</b>	Rutas biosintéticas de compuestos fenólico.....	5
<b>Figura 3-1:</b>	<i>Helianthus annuus</i> .....	6
<b>Figura 4-1:</b>	Ruta biosintética de flavonoides en células vegetales.....	7
<b>Figura 5-1:</b>	Compuestos bioactivos de <i>Helianthus annuus</i> .....	8
<b>Figura 6-1:</b>	Metabolón flavonoide.....	8
<b>Figura 1-2:</b>	Esquema para la identificación in silico de enzimas.....	15
<b>Figura 2-2:</b>	Búsqueda de “Pathway Maps”.....	16
<b>Figura 3-2:</b>	Selección del mapa de biosíntesis de flavonoides de <i>Helianthus annuus</i> .....	16
<b>Figura 4-2:</b>	Selección de la primera enzima involucrada en la biosíntesis de flavonoides.....	17
<b>Figura 5-2:</b>	Secuencia de aminoácidos de la enzima involucrada en la biosíntesis de flavonoides.....	17
<b>Figura 6-2:</b>	BLAST proteína-proteína del portal NCBI.....	18
<b>Figura 7-2:</b>	BLAST de la secuencia de aminoácidos.....	18
<b>Figura 8-2:</b>	Resultados BLAST de la secuencia de aminoácidos analizada.....	19
<b>Figura 9-2:</b>	Porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos analizados con las disponible en la Base de datos NCBI.....	19
<b>Figura 10-2:</b>	Portal TMHMM para la predicción de Hélices transmembranales.....	20
<b>Figura 11-2:</b>	Predicción de Hélices transmembranales de la secuencia.....	21
<b>Figura 12-2:</b>	STRING de la secuencia de aminoácidos .....	21
<b>Figura 13-2:</b>	Proteínas con similitud de interacción proteína-proteína.....	22
<b>Figura 14-2:</b>	Cálculo de Punto isoelectrico y Peso molecular.....	22
<b>Figura 15-2:</b>	Punto isoelectrico y peso molecular de la secuencia diana.....	23
<b>Figura 16-2:</b>	Predicción de estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos.....	23
<b>Figura 17-2:</b>	Bioinformatics Web Servers de la Universidad de Reading.....	24
<b>Figura 1-3:</b>	Secuencia de 408 aminoácidos Chalcona sintasa.....	25
<b>Figura 2-3:</b>	Reacción IUBMB de chalcona sintasa.....	26
<b>Figura 3-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	27
<b>Figura 4-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Chalcona sintasa.....	27

<b>Figura 5-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Chalcona sintasa.....	28
<b>Figura 6-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	30
<b>Figura 7-3:</b>	Estructura tridimensional de Chalcona sintasa.....	31
<b>Figura 8-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Chalcona sintasa.....	31
<b>Figura 9-3:</b>	Secuencia de 210 aminoácidos de Chalcona isomerasa.....	32
<b>Figura 10-3:</b>	Reacción IUBMB de Chalcona isomerasa.....	33
<b>Figura 11-3:</b>	Nivel de homología de la secuencia de aminoácidos.....	33
<b>Figura 12-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Chalcona isomerasa.....	34
<b>Figura 13-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Chalcona isomerasa.....	34
<b>Figura 14-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	36
<b>Figura 15-3:</b>	Estructura tridimensional de Chalcona isomerasa.....	37
<b>Figura 16-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Chalcona isomerasa.....	37
<b>Figura 17-3:</b>	Secuencia de 364 aminoácidos Naringenina-3dioxigenasa.....	38
<b>Figura 18-3:</b>	Reacción IUBMB de Naringenina-3dioxigenasa.....	39
<b>Figura 19-3:</b>	Nivel de homología de la secuencia de aminoácidos.....	40
<b>Figura 20-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Naringenina 3-dioxigenasa.....	40
<b>Figura 21-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Naringenina 3-dioxigenasa.....	41
<b>Figura 22-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	43
<b>Figura 23-3:</b>	Estructura tridimensional de Naringenina 3-dioxigenasa.....	43
<b>Figura 24-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Naringenina 3-dioxigenasa.....	44
<b>Figura 25-3:</b>	Secuencia de 335 aminoácidos Flavonol sintasa.....	44
<b>Figura 26-3:</b>	Reacción IUBMB de Flavonol sintasa.....	46
<b>Figura 27-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	46
<b>Figura 28-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Flavonol sintasa.....	47
<b>Figura 29-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Flavonol sintasa.....	47
<b>Figura 30-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	49
<b>Figura 31-3:</b>	Estructura tridimensional de Flavonol sintasa.....	49
<b>Figura 32-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Flavonol sintasa.....	50
<b>Figura 33-3:</b>	Secuencia de 505 aminoácidos de Trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	50
<b>Figura 34-3:</b>	Reacción IUBMB de Trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	52
<b>Figura 35-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	52
<b>Figura 36-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	53
<b>Figura 37-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	53

<b>Figura 38-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	54
<b>Figura 39-3:</b>	Estructura tridimensional de trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	55
<b>Figura 40-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de trans-cinamato 4-monooxigenasa.....	55
<b>Figura 41-3:</b>	Secuencia de 355 aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa.....	56
<b>Figura 42-3:</b>	Reacción IUBMB de Dihidroflavonol 4-reductasa.....	57
<b>Figura 43-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	57
<b>Figura 44-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con dihidroflavonol 4-reductasa.....	58
<b>Figura 45-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Dihidroflavonol 4-reductasa.....	58
<b>Figura 46-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	59
<b>Figura 47-3:</b>	Estructura tridimensional de Dihidroflavonol 4-reductasa.....	59
<b>Figura 48-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Dihidroflavonol 4-reductasa.....	60
<b>Figura 49-3:</b>	Secuencia de 234 aminoácidos Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	60
<b>Figura 50-3:</b>	Reacción IUBMB de Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	61
<b>Figura 51-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de.....	62
<b>Figura 52-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	63
<b>Figura 53-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	63
<b>Figura 54-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	65
<b>Figura 55-3:</b>	Estructura tridimensional de Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	65
<b>Figura 56-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Flavonoide 3'-monooxigenasa.....	66
<b>Figura 57-3:</b>	Secuencia de 335 aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	66
<b>Figura 58-3:</b>	Reacción IUBMB de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	67
<b>Figura 59-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	68
<b>Figura 60-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Leucoantocianidina dioxigenasa.....	68
<b>Figura 61-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	69
<b>Figura 62-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	71
<b>Figura 63-3:</b>	Estructura tridimensional de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	71
<b>Figura 64-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Leucoantocianidina dioxigenasa.....	72
<b>Figura 65-3:</b>	Secuencia de 439 aminoácidos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	72
<b>Figura 66-3:</b>	Reacción IUBMB de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	73

<b>Figura 67-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	74
<b>Figura 68-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Shikimato-o-hidroxicinamoiltransferasa.....	74
<b>Figura 69-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	75
<b>Figura 70-3:</b>	STRING de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	75
<b>Figura 71-3:</b>	Estructura tridimensional de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	76
<b>Figura 72-3:</b>	Predicción de sitios de unión a ligandos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa.....	76
<b>Figura 73-3:</b>	Secuencia de 277 aminoácidos Leucoantocianidina reductasa.....	77
<b>Figura 74-3:</b>	Reacción IUBMB de Leucoantocianidina reductasa.....	78
<b>Figura 75-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	78
<b>Figura 76-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Leucoantocianidina reductasa.....	79
<b>Figura 77-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Leucoantocianidina reductasa.....	79
<b>Figura 78-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	80
<b>Figura 79-3:</b>	Estructura tridimensional de Leucoantocianidina reductasa.....	81
<b>Figura 80-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Chalcona sintasa.....	81
<b>Figura 81-3:</b>	Secuencia de 511 aminoácidos Leucoantocianidina dioxigenasa.....	83
<b>Figura 82-3:</b>	Reacción IUBMB de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	83
<b>Figura 83-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	83
<b>Figura 84-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	84
<b>Figura 85-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	84
<b>Figura 86-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	86
<b>Figura 87-3:</b>	Estructural tridimensional Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	87
<b>Figura 88-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa.....	88
<b>Figura 89-3:</b>	Secuencia de 245 aminoácidos Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	88
<b>Figura 90-3:</b>	Reacción IUBMB de Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	89
<b>Figura 91-3:</b>	Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos.....	89
<b>Figura 92-3:</b>	Enzimas con alto porcentaje de homología con Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	90
<b>Figura 93-3:</b>	Predicción de hélices transmembrana de Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	90
<b>Figura 94-3:</b>	Socios de interacción con puntuación más alta.....	91
<b>Figura 95-3:</b>	Estructura tridimensional de Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	91

<b>Figura 96-3:</b>	Sitios de unión a ligandos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa.....	92
<b>Figura 97-3:</b>	Regulación de la biosíntesis de flavonoides.....	95

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue identificar *in silico* las enzimas que participan en el proceso de biosíntesis de flavonoides y sus mecanismos de regulación en *Helianthus annuus*. Se utilizó la secuencia de aminoácidos de cada una de las proteínas decodificadas en la Kyoto encyclopedia of genes and genomes, con la herramienta BLAST se identificaron regiones similares de las secuencias con otras proteínas homólogas, se obtuvieron las redes funcionales de interacción proteína-proteína utilizando la herramienta STRING, se determinó la ubicación de las enzimas en la membrana celular con el portal web TMHMM, se predijo la estructura tridimensional de todas las enzimas y los sitios de unión a ligandos en los Bioinformatics web servers del Swiss Institute of Bioinformatics y la Universidad de Reading respectivamente, también se calculó el peso molecular y el punto isoeléctrico de las mismas. Las enzimas participantes en la biosíntesis de flavonoides identificadas en *Helianthus annuus* son: Chalcona sintasa, Chalcona isomerasa, Naringenina 3-dioxigenasa, Flavonol sintasa, Trans cinamato 4-monooxigenasa, Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa, Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa, Cafeoil-CoA-metiltransferasa; 4 enzimas del metabolón flavonoide: Dihidroflavonol 4-reductasa, Flavonoide 3'-monooxigenasa, Leucoantocianidina dioxigenasa, Leucoantocianidina reductasa. La regulación de la ruta biosintética de flavonoides en *Helianthus annuus* está mediada por un mecanismo a nivel transcripcional, donde ciertos genes codifican el proceso de la expresión genética y otro a nivel fisiológico que constituye un mecanismo de defensa ante condiciones de estrés biótico o abiótico de la planta. Se concluye, por lo tanto que las enzimas que catalizan la biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus* muestran relación estructural y funcional con otras de igual naturaleza, identificadas en diferentes especies. Se recomienda efectuar estudios similares en plantas endémicas del Ecuador bajo técnicas *in silico*.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <BIOINFORMÁTICA>, <IDENTIFICACIÓN *in silico* >, <BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES>, <FACTORES DE REGULACIÓN>, <GIRASOL COMÚN (*Helianthus annuus*)>, <METABOLÓN FLAVONOIDE>.

## SUMMARY

The aim of this work was to identify *in silico* the enzymes participating in the biosynthesis process of flavonoids and their regulatory mechanism in *Helianthus annuus*. The amino acid sequence of each one of the decoded proteins in Kyoto encyclopedia of genes and genomes was used. Similar regions of the sequences with other equivalent proteins were identified using BLAST. Functional networks of protein-protein interaction were obtained using STRING. The enzymes in the cell membrane were located using TMHMM. The tridimensional structure of all enzymes and the ligand binding sites in Bioinformatics web servers of Swiss Institute of Bioinformatics and the University of Reading respectively were predicted. The molecular weight and the isoelectric point were calculated. The enzymes participating in the flavonoid biosynthesis identified in *Helianthus annuus* were as follows: chalcone synthase, *chalcona* isomerase, naringenin 3-dioxygenase, flavonol synthase, Trans-cinnamate, 4-monooxygenase, *o*- hydroxycinnamoyl transferase, cumaroyl shikimate 3'-monooxygenase, and caffeoyl-CoA- methyltransferase. The four enzymes of the flavonoid metabolon were as follows: dihydroflavanol 4-reductase, flavonoid 3'-monooxygenase, leucoanthocyanidin, dioxygenase, and leucoanthocyanidin reductase. The flavonoid biosynthetic path in *Helianthus annuus* is regulated by a mechanism at transcriptional level where certain genes code the process of gene expression and other one at a physiological level being a mechanism of defense against conditions of biotic and abiotic stress of the plant. It is concluded that the enzymes catalyzing the flavonoid biosynthesis in *Helianthus annuus* show a structural and functional relationship with others of the same nature identified in different species. It is recommended to carry out similar studies in endemic plants of Ecuador under techniques *in silico*.

**Key words:** <BIOCHEMISTRY>, <BIOINFORMATICS>, <IDENTIFICATION *in silico*>, <FLAVONOID BIOSINTESIS>, <REGULATORY FACTORS>, <COMMON SUNFLOWER (*Helianthus annuus*)>, <FLAVONOID METABOLON>.

## INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de bajo peso molecular distribuidos ampliamente en el reino vegetal, cumplen diversas funciones biológicas; fundamentalmente de protección. Juegan un papel primordial en la interacción de las plantas con su entorno, la protección contra agentes nocivos bióticos o abióticos, la radiación UV; intervienen también en los procesos de reproducción al atraer polinizadores; algunos tipos de flavonoides pueden interactuar con otros organismos simbióticamente, como bacterias y parásitos. (Mazza, 2018, p. 60)

Los flavonoides son investigados por sus propiedades terapéuticas; así, presentan actividad antidiarreica, antitumoral, contraceptiva, antiinflamatoria, espasmolítica, antibacteriana. Tiene también un alto valor nutricional, por lo cual son consumidos como nutraceuticos. (Yang et al., 2015, p. 94)

Estos metabolitos secundarios han sido estudiados desde diferentes enfoques: genéticos, bioquímicos, médicos, moleculares, evolutivos etc., generándose la cuestión de cómo se originan y cómo evolucionan en el medio; de este modo surge el estudio de la expresión génica de los factores involucrados tanto en la vía biosintéticas así como en su proceso de regulación. (Szaszko et al., 2017, p. 176)

El estudio genético del girasol, *Helianthus annuus* ha ido desarrollándose en los últimos años, la decodificación del código genético de la planta ha sido un alcance que permitió reconstruir su historia evolutiva y explorar la diversidad genética. (Badouin et al., 2017a, p. 150)

El término *in silico* hace referencia al trabajo experimental llevado a cabo enteramente en una computadora, al simular procesos biológicos y de laboratorio utilizando algoritmos y modelos matemáticos desarrollados en una base de datos, donde no es necesaria la manipulación de la especie. Estos trabajos tienen un amplio campo de aplicación; junto a los experimentos *in vivo* e *in vitro* consolidan investigaciones de áreas clínicas, genéticas, agrícolas, etc. (Bastle et al., 2018a, p. 435)

Varios ensayos *in silico* llevados a cabo sobre los flavonoides alcanzaron relevancia; en el 2003 se identificó por primera vez la intervención de Antocianidina reductasa como una de las enzimas que participan en la ruta metabólica de biosíntesis de flavonoides. (Grotewold, 2006, p. 200)

La caracterización genómica de factores de transcripción y genes responsables de la biosíntesis de flavonoides abrió un campo de oportunidades a la investigación en nuevas especies, a fin de encontrar rasgos similares o cambios que responden a divergencia de las especies. (Zhai et al., 2016, pp. 1–2)

Un trabajo detallado de la ruta biosintética de los flavonoides fue el realizado en el 2012 en *Arabidopsis thaliana*; donde decodificaron las enzimas del metabolismo de flavonoides. (Pandey et al., 2015, p. 5)

Investigadores de la Universidad de Heidelberg en el 2016, detallaron el proceso de regulación de la síntesis de flavonoides utilizando *Vitis vinifera*, donde varios factores interactúan sinérgicamente para inhibir o estimular producción de estos metabolitos secundarios. (Malacarne et al., 2016a, p. 8)

En base a lo expuesto, los objetivos que guiaron este proyecto de investigación son: Identificar *in silico* las enzimas que participan en el proceso de biosíntesis de flavonoides y sus mecanismos de regulación en *Helianthus annuus*.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Fundamentación teórica y conceptual

#### *1.1.1 Biosíntesis de flavonoides*

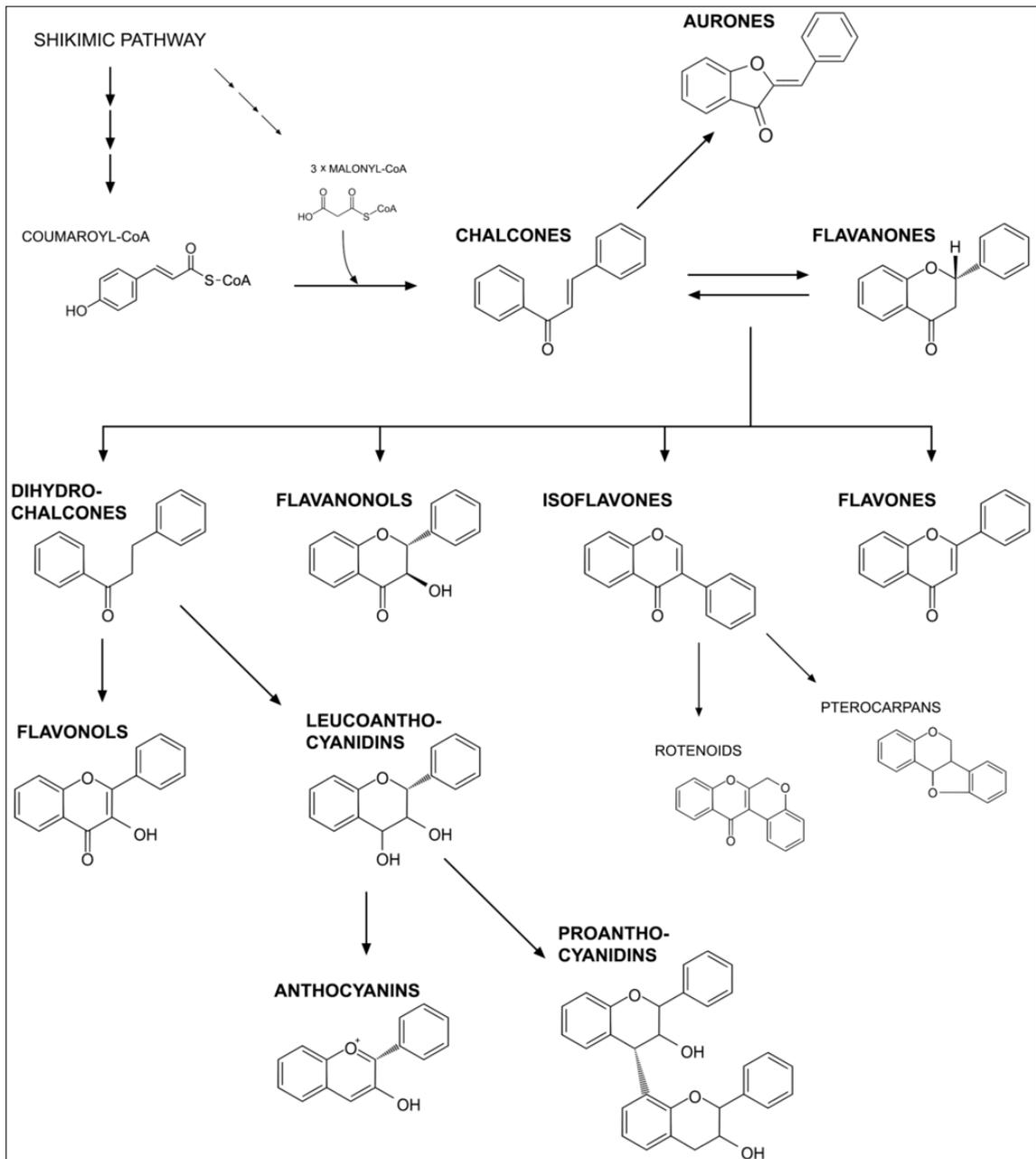
El metabolismo secundario de plantas da lugar a diversos compuestos, con diferentes estructuras y funciones, los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos, denominados así por derivarse originalmente del fenol. (García and Carril, 2011, pp. 129–130)

Un producto derivado de la ruta de las pentosas fosfatos es la Eritrosa 4-fosfato, al reaccionar secuencialmente junto con el ácido fosfoenolpirúvico producen el ácido shikímico, él conduce a su vez a la síntesis de aminoácidos aromáticos y sus derivados, donde el más importante para la síntesis de flavonoides es la fenilalanina la cual al desaminarse da lugar a la formación del ácido cinámico; reacciones posteriores de hidroxilación y otros sustituyentes forman los principales precursores de los flavonoides, el ácido ferúlico y el ácido caféico. (García and Carril, 2011, p. 132)

#### *1.1.1.1 Flavonoides*

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario de las plantas, su estructura corresponde a un compuesto poli fenólico hidroxilado; la palabra flavonoide engloba gran cantidad de productos de origen natural, con un esqueleto de C6-C3-C6. (Weston and Mathesius, 2013, p. 283)

Estos compuestos biológicamente activos desempeñan múltiples funciones; en la planta se transportan por sus tejidos y se hallan dentro de la célula fotosintetizadora, involucrándose directamente en procesos de protección y señalización. (Weston and Mathesius, 2013, p. 283)



**Figura 6-1:** Clasificación de flavonoides

**Fuente:** (G. Wang et al., 2014, p. 799)

### 1.1.1.2 Función de los flavonoides

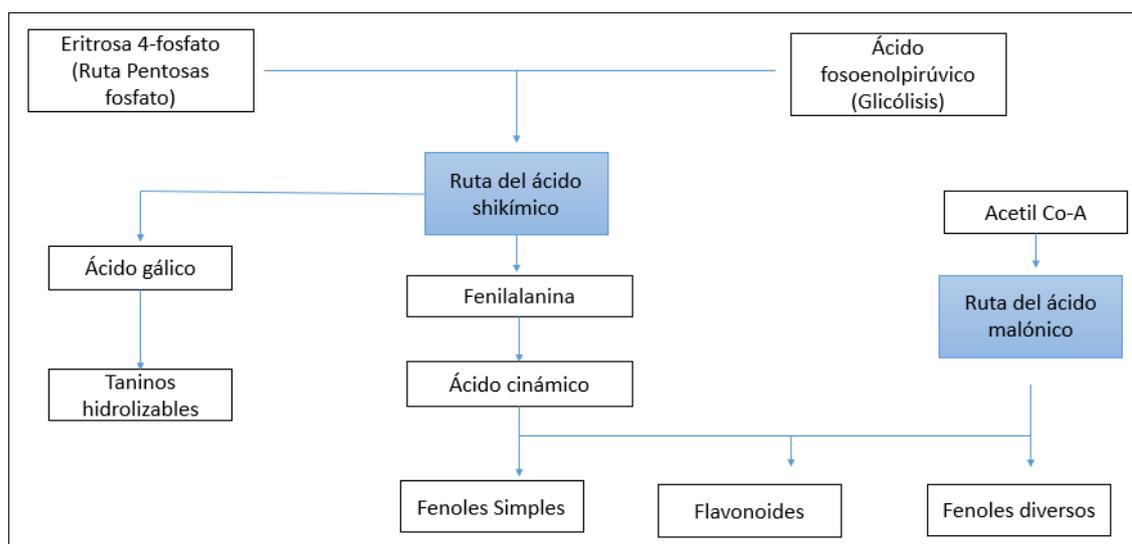
Sus actividades van en dependencia de la naturaleza química de compuesto, de la clase, del grado de hidroxilación y polimerización, presencia de sustituyentes y conjugaciones. (Kumar and Pandey, 2013, p. 1)

La presencia de grupos hidroxilo confiere a la molécula efectos antioxidantes, por quelación de iones metálicos o por neutralización de radicales libres; al incorporarlos a la dieta humana brindan protección al sistema cardiovascular, disminuyen la probabilidad de desarrollar enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad, contribuye al fortalecimiento de la memoria en personas mayores, son hepatoprotectores, antiinflamatorios, anticancerígenos, antivirales, entre las actividades farmacológicas más estudiadas. (Weston and Mathesius, 2013, p. 285)

En el tejido vegetal constituye un mecanismo de defensa anti oxidativo contra diferentes tipos de estrés, tanto abiótico como biótico; dan coloración a las flores y frutos de las plantas, su papel es determinante en la polinización, son sintetizados para proteger a la planta contra agentes infecciosos, para la protección contra la radiación UV y el calor, regulan el crecimiento. (Kumar and Pandey, 2013, p. 4)

### 1.1.2 Rutas de biosíntesis de flavonoides

El origen de los flavonoides al igual que los demás compuestos fenólicos, consta de dos rutas, la del ácido malónico y la del ácido shikímico, siendo la segunda la responsable de la biosíntesis de estos compuestos en plantas. (García and Carril, 2011, p. 130)



**Figura 7-1:** Rutas biosintéticas de compuestos fenólico

**Fuente:** (García and Carril, 2011, p. 130)

### ***1.1.3 Enzimas***

Son biomoléculas de origen proteico, constituidas por cadenas polipeptídicas que tienen como función catalizar una reacción química, son altamente especializadas para el sustrato específico; trabajan en condiciones óptimas de temperatura, presión y pH, de manera individualizada o formando complejos estructura-actividad en una misma ruta metabólica denominados metabolones. (Voet and Voet, 2006, p. 473)

#### ***1.1.3.1 Clases de enzimas***

Las enzimas se organizan según el sustrato sobre el cual ejercen su función, así las Oxidoreductasas catalizan reacciones redox, las Transferasas permiten la transferencia de grupos funcionales entre moléculas, las Hidrolasas rompen moléculas, las Liasas forman instauraciones, las Isomerasas catalizan reacciones que incluyen isomerización y las Ligasas unen moléculas empleando ATP. (Voet and Voet, 2006, p. 480)

### ***1.1.4 Helianthus annuus***

*Helianthus annuus* es una especie nativa de Canadá, el sur de Estados Unidos y el norte de México, actualmente se encuentra adaptada a diversos hábitats y condiciones ambientales, tolera ambientes de secos a húmedos, a pH de suelo entre 5 y 8; crece de manera silvestre o cultivada con muchos usos de sus semillas comestibles para la obtención de aceite, empleada para el forraje de animales como alternativa al combustible y como planta ornamental. (Heiser, 1978, p. 31)

Pertenece al Reino Plantae, Clase Magnoliopsida, al Orden de las Asterales, Familia Asteraceae; con hojas alternas, 4 o 5 flores alternadas amarillas las cuales caen al madurarse las semillas; son plantas anuales que pueden alcanzar los 3 m. de altura. (Heiser, 1978, p. 32)



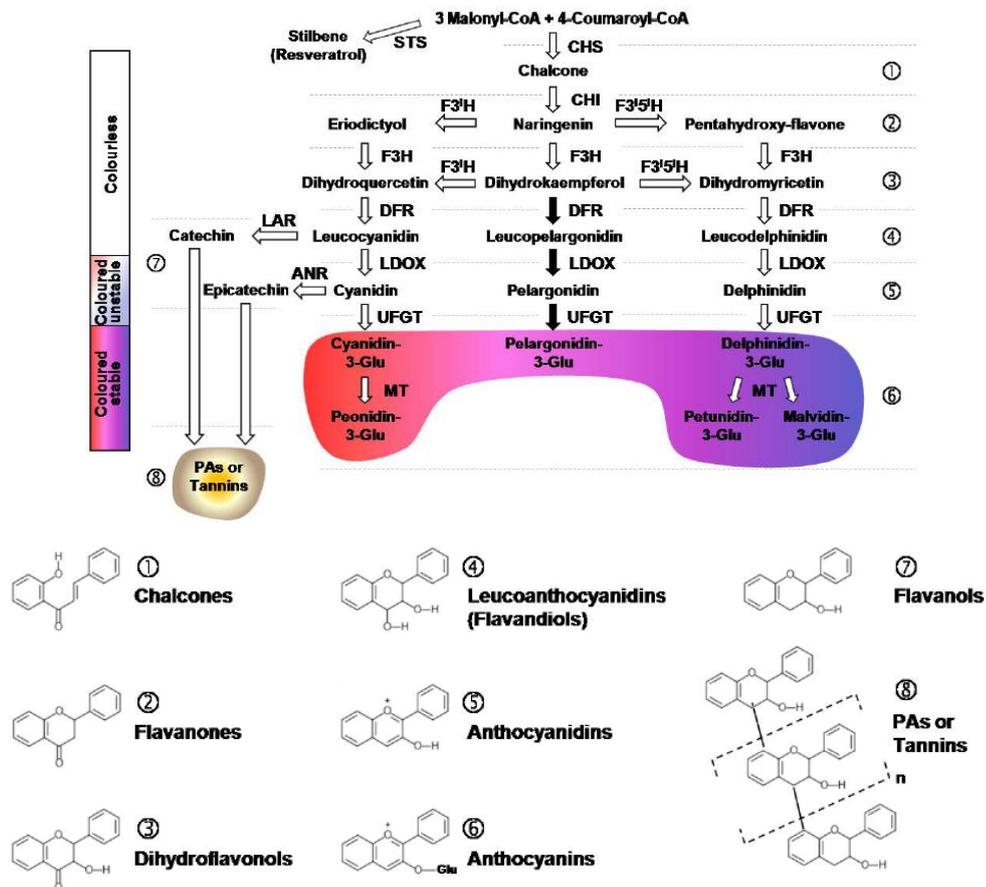
**Figura 8-1:** *Helianthus annuus*

**Fuente:** (Heiser, 1978, p. 28)

El genoma del *Helianthus annuus* consiste en repeticiones largas y similares de nucleótidos y aminoácidos, utilizando tecnologías SMRT (Single molecule real time secuencing), LTR (Long terminal repeat) entre las más difundidas; fue dilucidado para el uso en futuros proyectos de investigación que modifican la diversidad genética para mejorar los mecanismos de resistencia al estrés biótico y abiótico, así como mejorar la calidad nutricional de los productos. (Badouin et al., 2017b, pp. 148–151)

### 1.1.5 Flavonoides de *Helianthus annuus*

La vía metabólica de biosíntesis de flavonoides ha sido mejor descrita en *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* y *Vitis vinífera*, donde las sustancias bioactivas tienen un mismo paso inicial de formación del esqueleto básico de los flavonoides a partir de la condensación de una molécula de p-cumaroil-CoA más 3 moléculas de malonil-CoA, a partir de este punto los diferentes productos se generan en dependencia de las enzimas que catalicen las reacciones según las necesidades de cada especie. (Petrucci et al., 2013a, p. 14952)



**Figura 9-1:** Ruta biosintética de flavonoides en células vegetales

**Fuente:** (Petrucci et al., 2013a, p. 4)

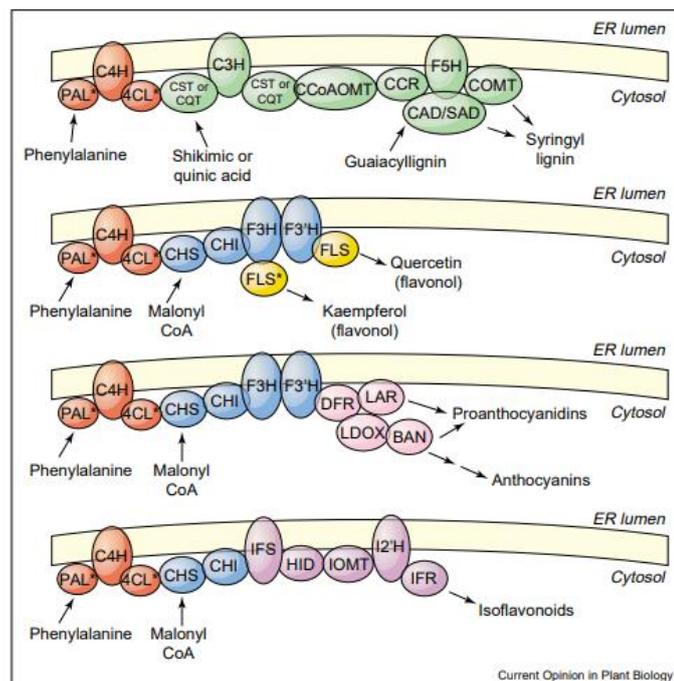
Determinados flavonoides de *Helianthus annuus* han sido identificadas por ensayos en laboratorios utilizando CO<sub>2</sub>, cinco de ellos fueron descritos como los responsables de la actividad biológica de estos metabolitos secundarios. (El Marsni et al., 2015, p. 3)



**Figura 10-1:** Compuestos bioactivos de *Helianthus annuus*

**Fuente:** (El Marsni et al., 2015, p. 6)

### 1.1.6 Metabolón



**Figura 6-1:** Metabolón de síntesis de flavonoides

**Fuente:** (Jørgensen et al., 2005, p. 283)

Se denomina metabolón al complejo multienzimático involucrado en una misma ruta biosintética, el cual implica interacciones específicas entre varias enzimas solubles. En la Figura 6-1 se observa las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de diferentes metabolitos secundarios; se muestran en rojo y azul las enzimas que participan en múltiples ramas de diferentes rutas metabólicas; las enzimas específicas para una ruta determinada tiene un color diferente, así también un metabolón consta de isoformas diferentes de una misma enzima. (Jørgensen et al., 2005, pp. 280–282)

Para la formación del metabolón, varias enzimas se ensamblan para formar el complejo multienzimático anclado a la membrana celular. En el caso del metabolon flavonoide se activa ante condiciones de estrés biótico o abiótico. (Petrucci et al., 2013b, pp. 2–3)

### ***1.1.7 Biología Molecular***

Las bases de la Biología Molecular han permitido describir el proceso por el cual la información contenida en un gen se traduce a una proteína, al estar íntimamente ligada con la genética, ha dado las pautas necesarias para conocer los procesos de síntesis y regulación de enzimas y proteínas a nivel celular. (Watson, 2006, p. 8)

### ***1.1.8 Código genético***

Es la organización de la información genética necesaria para la síntesis de proteínas, en tripletes de nucleótidos de ARNm, denominados codones; cada triplete determina la síntesis de un aminoácido. (Jiménez García and Merchant, 2003, pp. 12–13)

### ***1.1.9 Genoma***

Es la totalidad de la información genética hereditaria de un organismo es decir, el ADN que se encuentra contenido en un cromosoma, a manera de una base de datos natural, con instrucciones para el desarrollo y funcionamiento del mismo. (Watson, 2006, p. 91)

### ***1.1.10 Bioinformática***

Los últimos avances de la Biología Molecular y Tecnologías Genómicas han acarreado la necesidad de analizar y procesar grandes cantidades de datos, para convertirla en información manejable; es ahí donde la Bioinformática toma un papel protagónico en la resolución de problemas biológicos. (Fatumo et al., 2014, p. 2)

La Bioinformática constituye un área de investigación y participación interdisciplinaria, donde las tecnologías informáticas confluyen con la ciencia biológica; nace de la necesidad de almacenar y organizar secuencias de ADN genómico, identificar en ellas intrones y exones, determinar las condiciones para los procesos de transcripción de un gen, detallar la estructura de una proteína conocida y predecir la de una nueva en base a la secuenciación de sus aminoácidos. (Mulder et al., 2018, p. 3)

Según el Weizmann Institute of Science de Israel define a la Bioinformática como el campo de la ciencia que se encarga del manejo computacional de la información genética contenida en el ADN, ARN y las proteínas, en base a una serie de algoritmos matemáticos y métodos computacionales. (Lelieveld et al., 2016, p. 4)

#### ***1.1.10.1 Aplicaciones de la bioinformática***

La Bioinformática al analizar cantidades inmensurables de información biológica, tiene un gran campo de aplicación, con trascendental importancia en la búsqueda de avances genéticos en medicina molecular, telemedicina, desarrollo de nuevos fármacos, estudio de mecanismos de resistencia antimicrobiana, mejora de la calidad nutricional de plantas, estudios evolutivos, estudios de cambio climáticos, creación de armas biológicas, etc. (Lelieveld et al., 2016, pp. 5–6)

### ***1.1.11 Identificación in silico***

El término *in silico* fue utilizado por primera vez 1989 por Pedro Miramontes, investigador de la Universidad Autónoma de México, para identificar su trabajo “Restricciones fisicoquímicas de ácidos nucleicos y evolución molecular”, el cual hace referencia al experimento biológico que fue llevado a cabo enteramente en un computador. (Bastle et al., 2018b, p. 437)

La metodología *in silico* tiene su aplicación en la predicción, validación, simulación y descripción de procesos biológicos, sin necesidad de disponer de la sustancia en estudio, ya que genera

información, a partir de la información genética administrada por las redes bioinformáticas; en el campo de la medicina es ampliamente utilizada para la predicción de los efectos de toxicidad sobre la salud humana; la precisión del método puede ser comparable a alternativas de experimentación *in vivo* e *in vitro*. (Salinas and Lisbona, 2016, p. 49)

#### ***1.1.12 Base de datos***

Es un sistema que guarda grandes cantidades de información, de manera estructurada y organizada, almacenada en equipos remotos y que se comparte por medio de la red; el cual consta de mecanismos que permiten compartir la información a múltiples usuarios a la vez. (Cabrera et al., 2011, p. 33)

#### ***1.1.13 Kegg***

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/>), es un sistema de base de datos, para la interpretación biológica de genes, genomas, rutas metabólicas, enzimáticas y más; representadas en forma de mapas que muestran relaciones moleculares e interacciones; consta de recursos de bases de datos adicionales para la interpretación funcional y aplicación experimental de la información genómica proporcionada. (Kanehisa et al., 2017, p. 354)

#### ***1.1.14 Blast NCBI***

BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permite identificar regiones similares de una determinada secuencia de nucleótidos o proteínas, con la base de datos de secuencias disponible en el portal NCBI; los resultados obtenidos pueden ser utilizados para inferir sobre las relaciones funcionales de la estructura y procesos evolutivos; la eficacia de la alineación se determina según el nivel de significancia de las coincidencias. (Madden, 2013, pp. 2–3)

Las proteínas descritas son en su mayoría de naturaleza modular, con uno o más dominios, el algoritmo Blast, está programado para identificar estos dominios o tramos cortos de similitud en las secuencias; la alineación local hace referencia a la comparación de las porciones de ARNm que puede ser alineado con una parte de ADN genómico, pues al realizar una alineación global

de toda la secuencias, las similitudes encontradas serían menores. (Choudhuri and Kotewicz, 2014, p. 126)

#### ***1.1.15 TMHMM***

Es una herramienta para la identificación de hélices transmembranales en proteínas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), basado en el algoritmo oculto desarrollado por Anders Krogh y Erik Sonnhammer; muchas son proteínas integrales de membrana. (Choudhuri and Kotewicz, 2014, p. 198)

#### ***1.1.16 String***

Es una base de datos que identifica redes de interacción proteína-proteína para una gran cantidad de organismos (<https://string-db.org/>); las interacciones pueden mostrar relaciones directas (físicas) o indirectas (funcionales), siempre que sean biológicamente significativas. (Szklarczyk et al., 2017, p. 362)

Las predicciones se derivan de un análisis sistematizado de coexpresión genética y de la detección selectiva de señales compartidas a través del genoma. (Szklarczyk et al., 2017, p. 363)

#### ***1.1.17 Expasy***

Es el portal Bioinformático del SIB (Bioinformatics Resource Portal - <https://www.expasy.org/>), el cual es un centro especializado en análisis de proteínas del Swiss Institute of Bioinformatics; proporciona el acceso a diferentes bases de datos y softwares para el análisis de secuencias de nucleótidos y estructuras de proteínas. (Artimo et al., 2012, p. 587)

#### ***1.1.18 Protein Model Portal***

Proporciona un método de homología para la modelación de proteínas (<https://www.proteinmodelportal.org/>), el modelo propuesto puede derivarse de una estructura identificada experimentalmente o recurrir a modelos precalculados que se relacionen en el proceso de evolución, en este caso la calidad del modelo va en dependencia de la distancia

evolutiva; la versión actualizada del portal cuenta con 7,6 millones de estructuras.(Arnold et al., 2009, p. 2)

Predice la estructura tridimensional de una secuencia de nucleótidos dada, basándose en los resultados de la alineación con una proteína de estructura conocida; este modelo comparativo tiene amplia aplicación en el campo biomédico. (Arnold et al., 2009, p. 3)

### ***1.1.19 Swiss model***

Es un servidor web Bioinformático de modelado comparativo (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), el cual propone una estructura tridimensional a una secuencia diana, en base a plantillas de especies familiares determinadas experimentalmente. (Bordoli et al., 2008, p. 3)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Tipo y Diseño de Estudio

La investigación realizada es pura basada en un diseño no experimental, enfoque cualitativo-cuantitativo.

##### 2.1.1 Unidad de análisis

Genoma de *Helianthus annuus*

##### 2.1.2 Población de estudio

*Helianthus annuus*

##### 2.1.3 Tamaño de muestra

Totalidad del código genético de *Helianthus annuus*

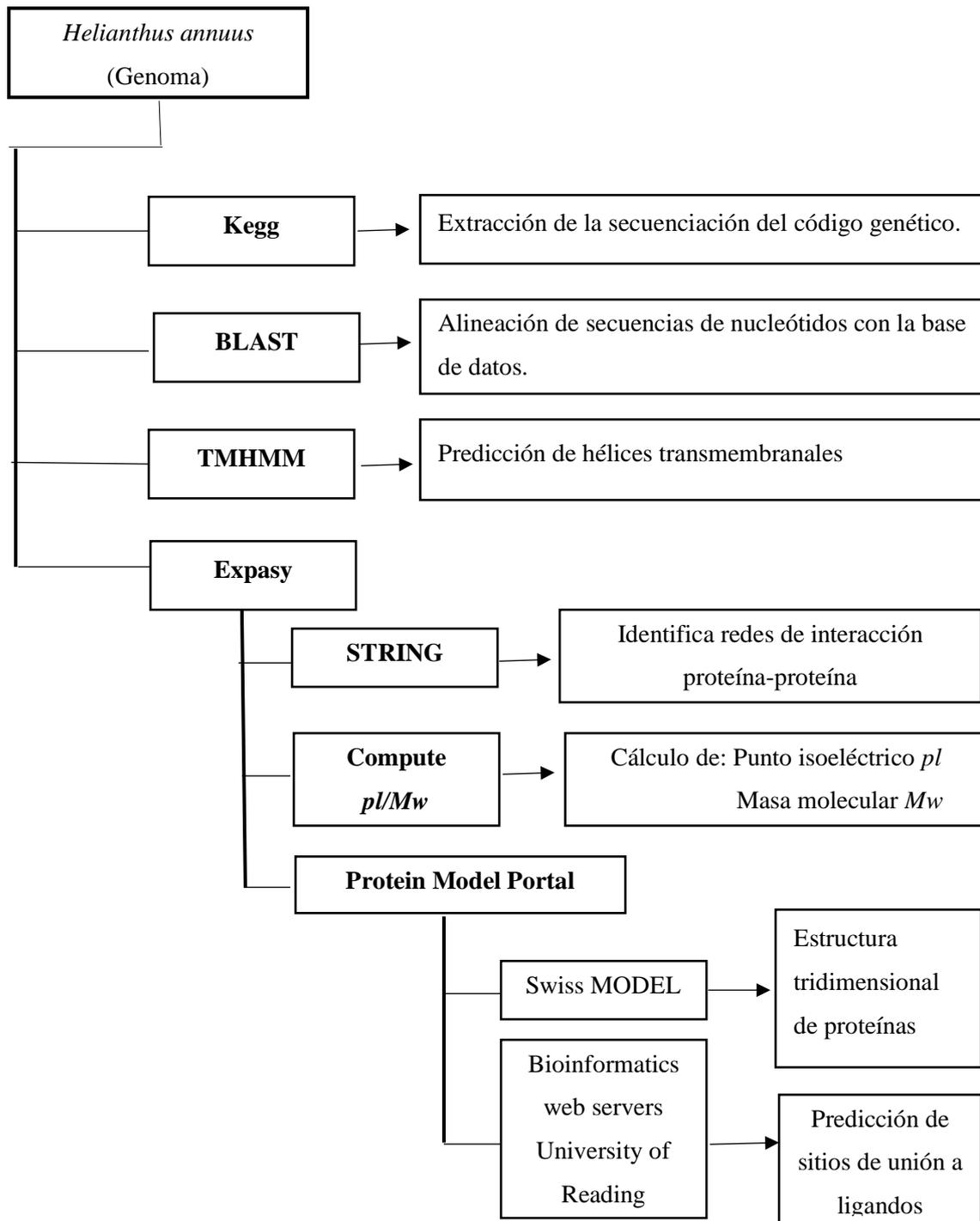
#### 2.2 Lugar de investigación

La presente investigación no experimental se llevó a cabo en la biblioteca general de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el cantón Riobamba de la provincia de Chimborazo.

#### 2.3 Materiales

Computador provisto del servicio de internet.

## 2.4 Métodos



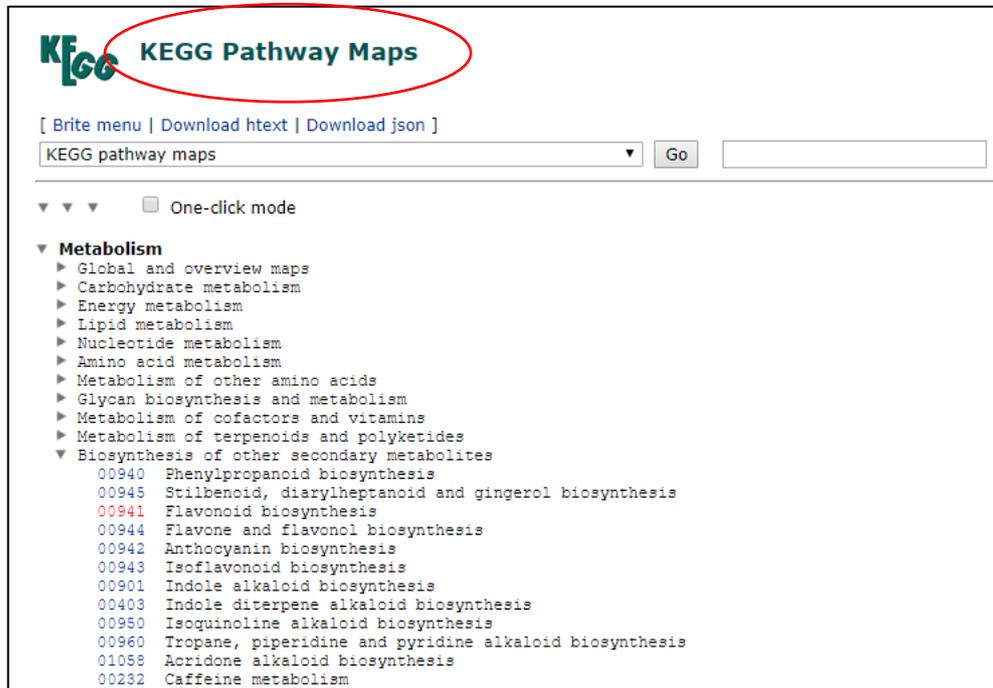
**Figura 1-2:** Esquema para la identificación in silico de enzimas

Realizado por: Jesenia Tipanquiza. 2018

## 2.4.1 Extracción de datos del Genoma de *Helianthus annuus*

### 2.4.1.1 Acceso a la Base de datos Kegg

Buscar en el navegador el portal web de Kegg, y seleccionar las “Pathway Maps”

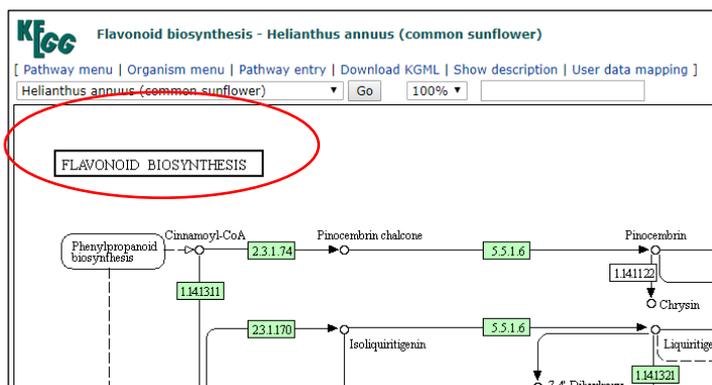


**Figura 2-2:** Búsqueda de “Pathway Maps”

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 2.4.1.2 Búsqueda de la ruta biosintética de flavonoides

En el buscador del portal Kegg, seleccionamos el organismo que deseamos encontrar: *Helianthus annuus*

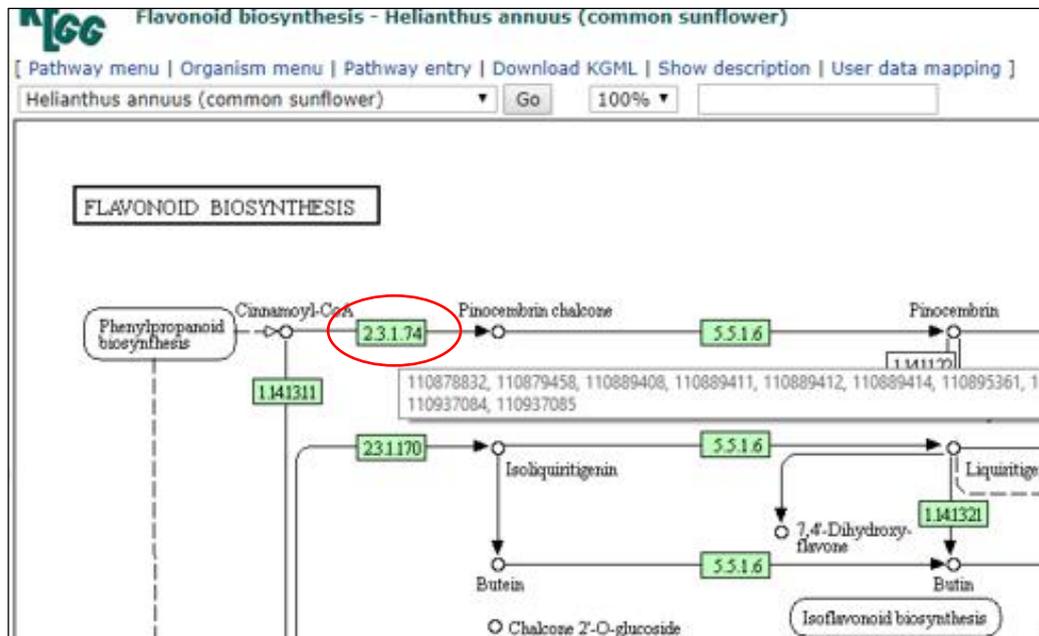


**Figura 3-2:** Selección del mapa de biosíntesis de flavonoides de *Helianthus annuus*

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower)”)

### 2.4.1.3 Búsqueda de la secuencia de aminoácidos de todas las enzimas

Una vez desplegado el mapa de la biosíntesis de flavonoides, ir seleccionando una por una las enzimas involucradas en la biosíntesis de los diferentes flavonoides.



**Figura 4-2:** Selección de la primera enzima involucrada en la biosíntesis de flavonoides

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”

### 2.4.1.4 Obtención de la secuencia de aminoácidos de la enzima

Other DBs	NCBI-GeneID: 110878832 NCBI-ProteinID: XP_021982900
AA seq	408 aa <a href="#">AA seq</a> <a href="#">DB search</a> MNHFQKVVHLETIRENQRAHGLATILAIGTANPSNYIMQADYPDFYFRVTNSEHVMNLKN KFKRICDNTMITKRFMLLTFEFLKDNPNMCQYTSPSLNTRQDLLITQVPLGKVAATKAI EEWGLPKSKITHLIFCTTSGIDMPGADYQLTKLLGLSPSVNRLMMYQQGCSGGMVLRLA KDIAENKGSRLVVCSEIMATIFHGPSENHIDSLVGQALFGDGA AAIIVGSDPDLAVEH PLFEIVSASQTIIPDTEMAINLHLREDGLKLHLDKDVPKMIFENIENILMQAVRPLGLSD WNSLFWIVHPGRRILDEVELKLNLDKQKLRASRHVLSEYGNMTSACVLFIIENMRNKS L EDGKSTTGEGLDWGLFGFGPLTVETVVLHSPSTVQQVKTGPEDLA
NT seq	1227 nt <a href="#">NT seq</a> atgaatcattttcaaaaggttgtacatcttgaacaattcgagagaatcaacgggcacat

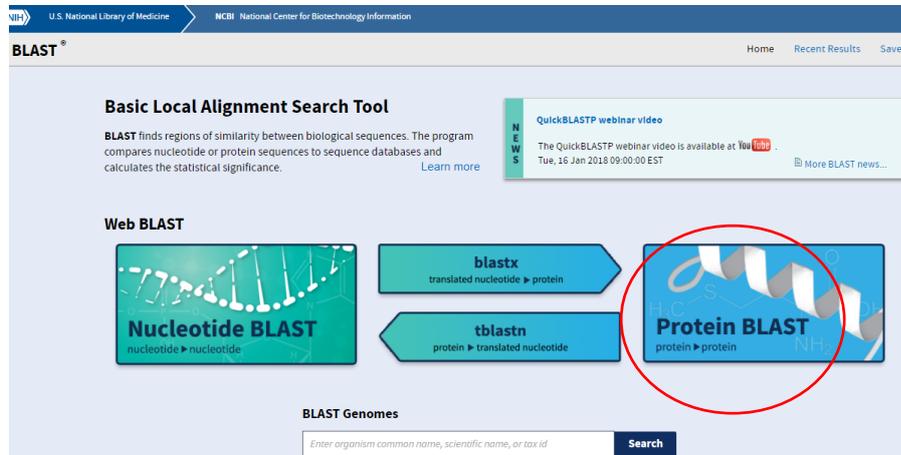
**Figura 5-2:** Secuencia de aminoácidos de la enzima involucrada en la biosíntesis de flavonoides

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”

## 2.4.2 BLAST de secuencias de aminoácidos

### 2.4.2.1 Acceso al portal BLAST

Buscar en el navegador el portal de NCBI y seleccionar el BLAST proteína-proteína

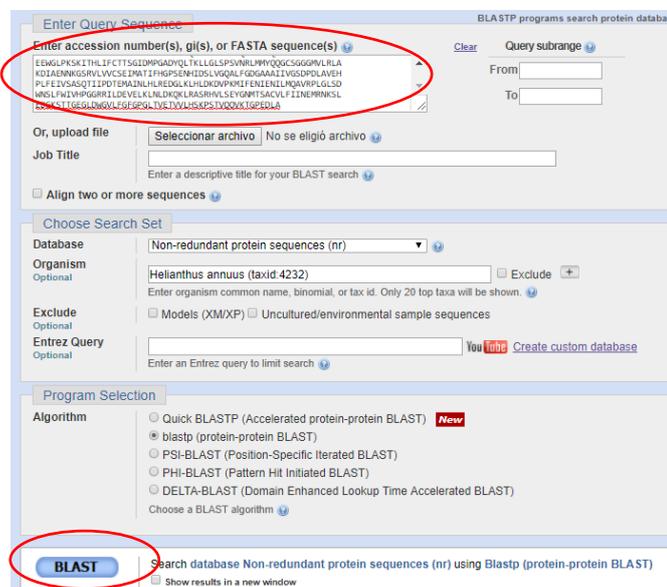


**Figura 6-2:** BLAST proteína-proteína del portal NCBI

**Fuente:** (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,”)

### 2.4.2.2 Alineación BLAST de la secuencia de aminoácidos

Al elegir el BLAST proteína-proteína conduce a la página principal, donde los datos requeridos deben ser llenados. Copiar la secuencia de aminoácidos obtenida en el portal KEGG en formato Fasta y pegar en la cuadrícula correspondiente. Completar la información de acuerdo a *Helianthus annuus*. Seleccionar el botón BLAST para empezar.

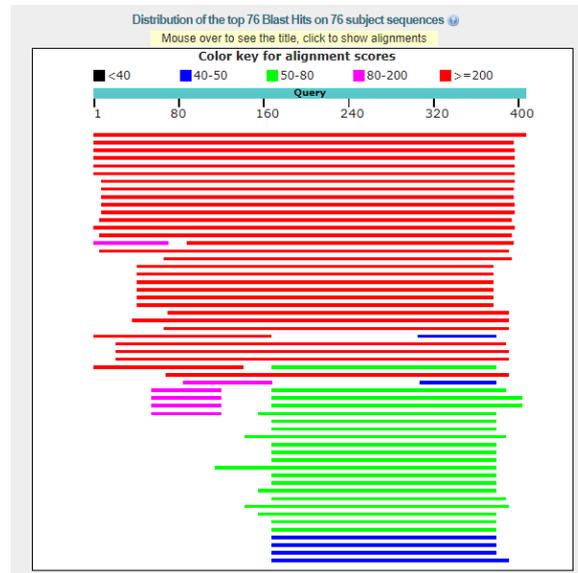


**Figura 7-2:** BLAST de la secuencia de aminoácidos.

**Fuente:** (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,”)

### 2.4.2.3 Resultados BLAS

A continuación los resultados de las alineaciones de la secuencia de aminoácidos se representan con diferentes coloraciones. Las coincidencias encontradas se ordenarán en función del porcentaje de similitud.



**Figura 8-2:** Resultados BLAST de la secuencia de aminoácidos analizada

**Fuente:** (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,” )

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase 3-like [Helianthus annuus]</a>	848	848	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021982900.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	681	681	97%	0.0	82%	<a href="#">XP_021992621.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">2-pyrone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	679	679	97%	0.0	81%	<a href="#">XP_021992619.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	670	670	97%	0.0	82%	<a href="#">XP_021992620.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative thiolase-like protein [Helianthus annuus]</a>	661	661	97%	0.0	82%	<a href="#">OTG16124.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like isoform X1 [Helianthus annuus]</a>	660	660	97%	0.0	82%	<a href="#">XP_021983611.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	619	619	95%	0.0	73%	<a href="#">XP_021998364.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	614	614	95%	0.0	72%	<a href="#">XP_022009654.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative thiolase-like protein [Helianthus annuus]</a>	613	613	95%	0.0	72%	<a href="#">OTF98008.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase [Helianthus annuus]</a>	613	613	95%	0.0	72%	<a href="#">XP_022009667.1</a>

**Figura 9-2:** Porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos analizados con las disponibles en la Base de datos NCBI

**Fuente:** (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,” )

### 2.4.3 Predicción de Hélices transmembranales

El portal TMHMM Server v.2.0 se encuentra disponible en la Web Servers del Department of Bio and Health Informatics. Para la predicción de las hélices transmembrana de la secuencia de aminoácidos en estudio, se debe colocar en el casillero correspondiente en formato Fasta. Finalmente para iniciar, seleccionar el botón “Submit”.

DTU Bioinformatics  
Department of Bio and Health Informatics

[Home](#)

## TMHMM Server v. 2.0

### Prediction of transmembrane helices in proteins

---

#### SUBMISSION

Submission of a local file in **FASTA** format (HTML 3.0 or higher)

No se eligió archivo

OR by pasting sequence(s) in **FASTA** format:

```
EEWGLPKSKITHLIFCTTSGIDMPGADYQLTKLLGLSPSVNRLMMYQQGCSGGGMVLR  
KIDIAENNKGSRVLVVCSEIMATIFHGPPSENHIDS LVGQALFGDGA AAIIVGSDPDLAVEH  
PLFEIVSASQTIIPDTEMAINLHLREDGLKHLHDKDVPKMI FENIENILMQAVRPLGLSD  
WNSLFWIVHPGRRILDEVELKLNLDKQKLRASRHLSEYGNM TSACVLFIIINEMRNKSL  
EDGKSTTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLHSPSTVQQVK TGPEDLA
```

Output format:

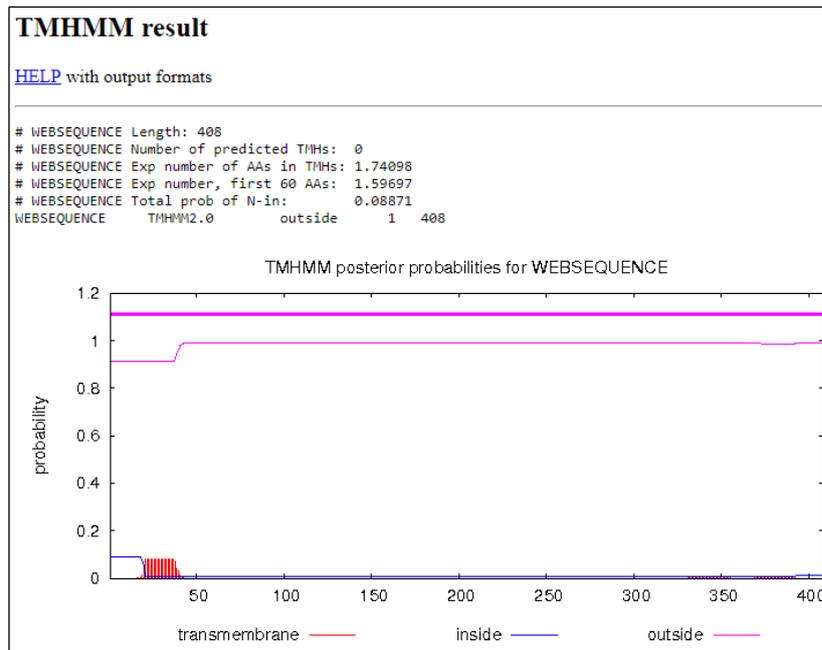
Extensive, with graphics  
 Extensive, no graphics  
 One line per protein

Other options:

Use old model (version 1)

**Figura 10-2:** Portal TMHMM para la predicción de Hélices transmembranales

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0.”)



**Figura 11-2:** Predicción de Hélices transmembranales de la secuencia.

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

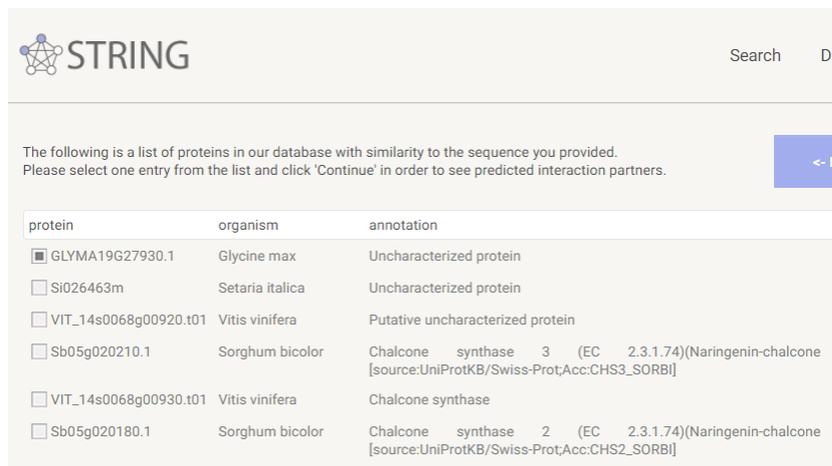
#### 2.4.4 STRING de secuencias de aminoácidos

Una vez accedido al portal STRING, seleccionar la opción “Protein by sequence”. Pegar la secuencia de aminoácidos de la enzima diana. Seleccionar el organismo que corresponde a la secuencia, y empezar en el botón “Search”.

**Figura 12-2:** STRING de la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“STRING: functional protein association networks,”)

La siguiente lista de proteínas presenta similitud con la secuencia de aminoácidos analizada. Al seleccionar alguna de ellas se detallara las redes de interacción proteína-proteína predicha.



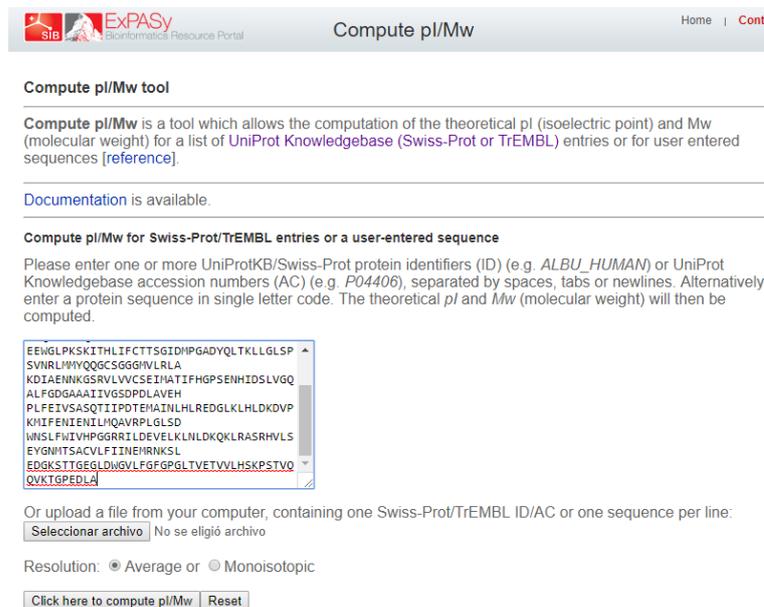
protein	organism	annotation
<input checked="" type="checkbox"/> GLYMA19G27930.1	Glycine max	Uncharacterized protein
<input type="checkbox"/> Si026463m	Setaria italica	Uncharacterized protein
<input type="checkbox"/> VIT_14s0068g00920.t01	Vitis vinifera	Putative uncharacterized protein
<input type="checkbox"/> Sb05g020210.1	Sorghum bicolor	Chalcone synthase 3 (EC 2.3.1.74)(Naringenin-chalcone [source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:CHS3_SORBI])
<input type="checkbox"/> VIT_14s0068g00930.t01	Vitis vinifera	Chalcone synthase
<input type="checkbox"/> Sb05g020180.1	Sorghum bicolor	Chalcone synthase 2 (EC 2.3.1.74)(Naringenin-chalcone [source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:CHS2_SORBI])

**Figura 13-2:** Proteínas con similitud de interacción proteína-proteína

**Fuente:** (“STRING: functional protein association networks,”)

#### 2.4.5 Cálculo del punto isoeléctrico y masa molecular

Para calcular el peso molecular y el punto isoeléctrico de la secuencia de aminoácidos proporcionada, accedemos al portal de ExPASy (Bionformatics Resource Portal) y colocamos la misma en formato Fasta.



Compute pI/Mw tool

Compute pI/Mw is a tool which allows the computation of the theoretical pI (isoelectric point) and Mw (molecular weight) for a list of UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot or TrEMBL) entries or for user entered sequences [reference].

Documentation is available.

Compute pI/Mw for Swiss-Prot/TrEMBL entries or a user-entered sequence

Please enter one or more UniProtKB/Swiss-Prot protein identifiers (ID) (e.g. *ALBU\_HUMAN*) or UniProt Knowledgebase accession numbers (AC) (e.g. *P04406*), separated by spaces, tabs or newlines. Alternatively, enter a protein sequence in single letter code. The theoretical pI and Mw (molecular weight) will then be computed.

```

EEMGLPKSKIITHLIFCTTSGIDMHPGADYQLTKLLGLSP
SVNRLMYYQQCSGGIIVLRLA
KDTAENKQSRVLCSEIPIATIFHGSPSENHIDSLVGG
ALFGDGAIIIGSDPDLAVEH
PLFEIVSASQTIIPDTEIMAINLHLREDGKLLHLDKDPV
KNIIFENIENLHQAVRPLGLSD
WISLFIIVHPGRRRLDEVLEKLLLDKQLRASRHVLS
EYGNITSACVLFITNEIHRNKS
EDGKSTIGEGLDWVLEFGFGPLTVETVVLHSPSTVQ
QVKTGPEDLA
    
```

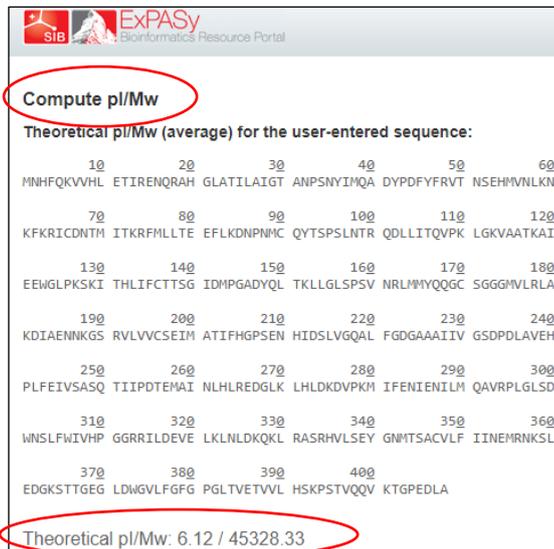
Or upload a file from your computer, containing one Swiss-Prot/TrEMBL ID/AC or one sequence per line:

No se eligió archivo

Resolution:  Average or  Monoisotopic

**Figura 14-2:** Cálculo de Punto isoeléctrico y Peso molecular.

**Fuente:** (“ExPASy: calcula la herramienta pI / Mw,”)



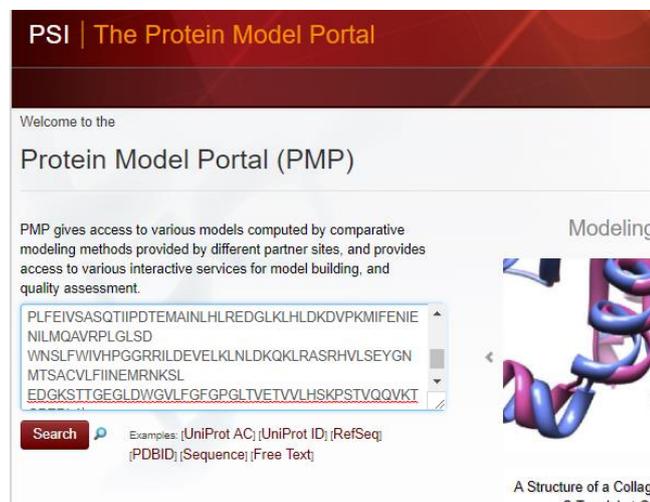
**Figura 15-2:** Punto isoelectrico y peso molecular de la secuencia diana.

**Fuente:** (“ExpASy: calcula la herramienta pI / Mw,”)

#### 2.4.6 Modelación tridimensional de la enzima

Para obtener la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos diana, recurrimos al Protein Model Portal. Colocamos el formato Fasta de dicha secuencia, seleccionar la opción “Search” para empezar.

Ha este portal es encuentra indexados varios sitios que pueden proporcionar información similar, la cual puede ser utilizada para la verificación de los resultados.



**Figura 16-2:** Predicción de estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos.

**Fuente:** (“Modeling submission -- Protein Model Portal - PSI SBKB,”)

## 2.4.7 Predicción de sitios de unión a ligandos

Para la predicción de los sitios de unión a ligandos de la secuencia de aminoácidos, se accede al Protein Model Portal, uno de los sitios indexados reenviará la información solicitada a un correo institucional. El web server del cual se tomarán los sitios de unión a ligandos es el Bioinformatics Web Servers de la University of Reading.

University of Reading | Life | Study | Research | Business | About | A-Z | Search | University site | Go

### Bioinformatics Web Servers

#### The IntFOLD Server Results Page (Version 2.0)

Please cite the following papers:

McGuffin, L.J., Atkins, J., Salehe, B.R., Shuid, A.N. & Roche, D.B. (2015) IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences. *Nucleic Acids Research*, 43, W169-73. [PubMed](#)

Roche, D. B., Buenavista, M. T., Tetchner, S. J. & McGuffin, L. J. (2011) The IntFOLD server: an integrated web resource for protein fold recognition, 3D model quality assessment, intrinsic disorder prediction, domain prediction and ligand binding site prediction. *Nucleic Acids Res.*, 39, W171-6. [PubMed](#)

The server implements the IntFOLD2-TS method to generate alternative models:

Buenavista, M. T., Roche, D. B. & McGuffin, L. J. (2012) Improvement of 3D protein models using multiple templates guided by single-template model quality assessment. *Bioinformatics*, 28, 1851-1857. [PubMed](#)

Links to graphical output:  
• [Top 5 3D models](#)

**Contact**  
Tel: 0118 378 6332  
Email: [l.j.mcguffin@reading.ac.uk](mailto:l.j.mcguffin@reading.ac.uk)  
► [Full contact details](#)

**Figura 17-2:** Bioinformatics Web Servers de la Universidad de Reading.

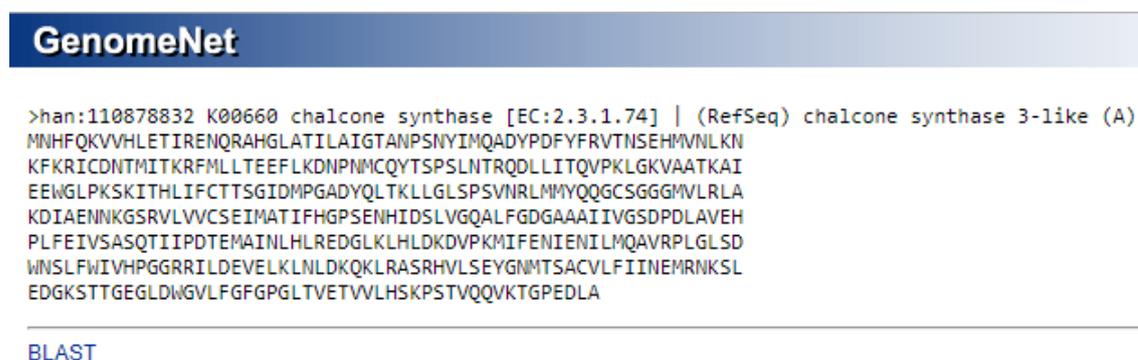
**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,” )

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 Enzima Chalcona sintasa

##### 3.1.1 Secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa



**Figura 1-3:** Secuencia de 408 aminoácidos Chalcona sintasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

##### 3.1.2 Interpretación biológica de la enzima

La base de datos KEGG proporciona un mapa que detalla la biosíntesis de flavonoides, éste contiene la secuencia de aminoácidos de las enzimas que participan en este proceso, al analizar la información correspondiente a la primera enzima, Chalcona sintasa encontramos características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según esta base de datos.

**Tabla 1-3:** Características de la enzima Chalcona sintasa.

Código de accesoión KEGG	110878832
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Transferasa, Aciltransferasa
Descripción genética	Familia chalcona y estilbeno sintasa

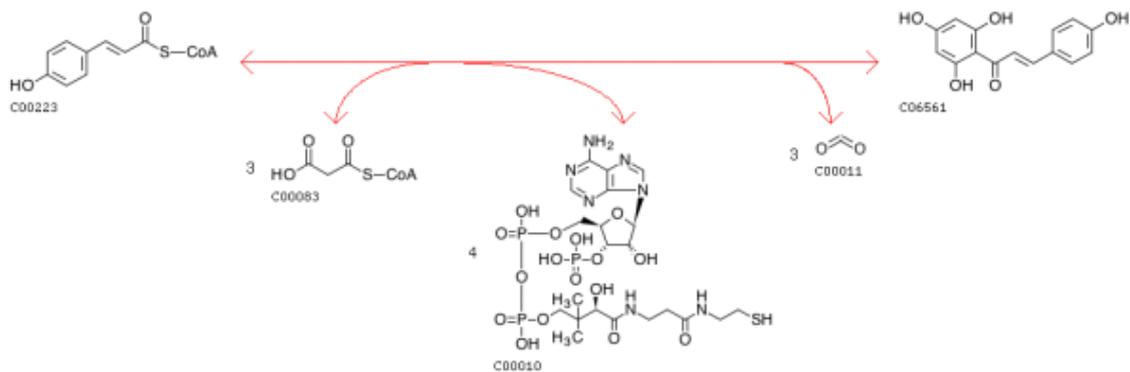
Sysname	Malonil-CoA: 4-coumaroil CoA maloniltransferasa
Nombres	Naringenina-chalcona sintasa Chalcona sintasa Flavanona sintasa 6'-deoxichalcona sintasa DOCS CHS
Reacción (IUBMB)	3 malonil-CoA + 4-coumaroil-CoA → 4 CoA + naringenina chalcona + 3 CO <sub>2</sub>
Substrato	Malonil-CoA, 4-coumaroil-CoA
Producto	CoA + Naringenina chalcona + CO <sub>2</sub>
Ruta metabólica*	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, ritmo circadiano de las plantas.

\*International Union of Biochemistry and Molecular Biology

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza. 2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 3.1.3 Reacción de catálisis de Chalcona sintasa



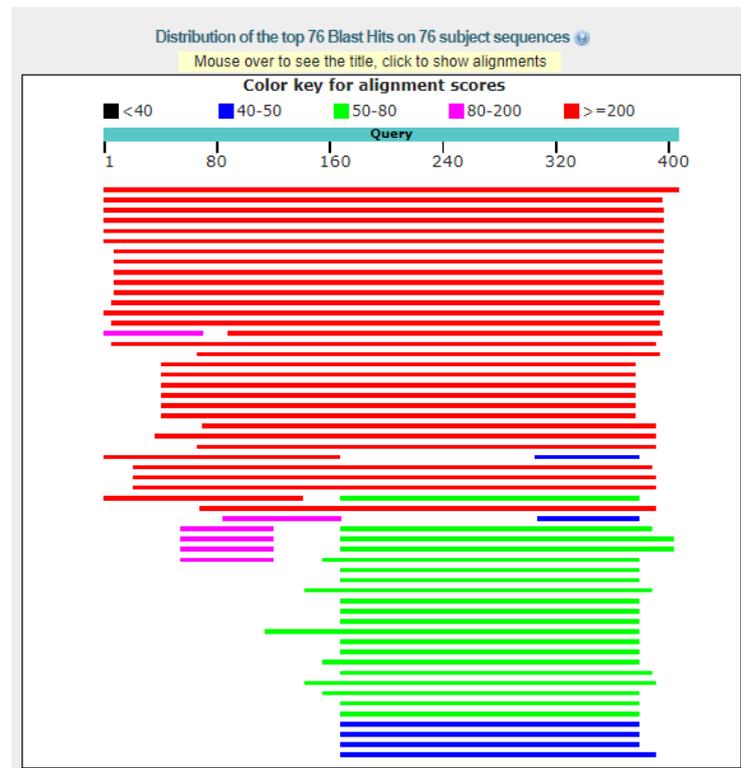
**Figura 2-3:** Reacción IUBMB de chalcona sintasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R01613,” )

Reacción en varios pasos, en presencia de NADH y reductasa produce 6'-deosichalcona; la chalcona sintasa transfiere grupos aminoacilo, convirtiendo la fenilalanina en naringenina (CO6561)

### 3.1.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 3-3:** Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (408 letters),” )

La Figura 3-3 permite visualizar el grado de homología que presenta la secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa con la de diferentes especies, cada línea corresponde a un organismo diferente. Las líneas rojas indican mayor cantidad de regiones similares, los colores restantes indican algo de homología en alguna sección de la secuencia.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 3

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase 3-like [Helianthus annuus]</a>	848	848	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021982900.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">chalcone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	681	681	97%	0.0	82%	<a href="#">XP_021992621.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">2-pyrone synthase-like [Helianthus annuus]</a>	679	679	97%	0.0	81%	<a href="#">XP_021992619.1</a>

**Figura 4-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Chalcona sintasa

**Fuente:** (“NCBI Conserved Domain Search,”)

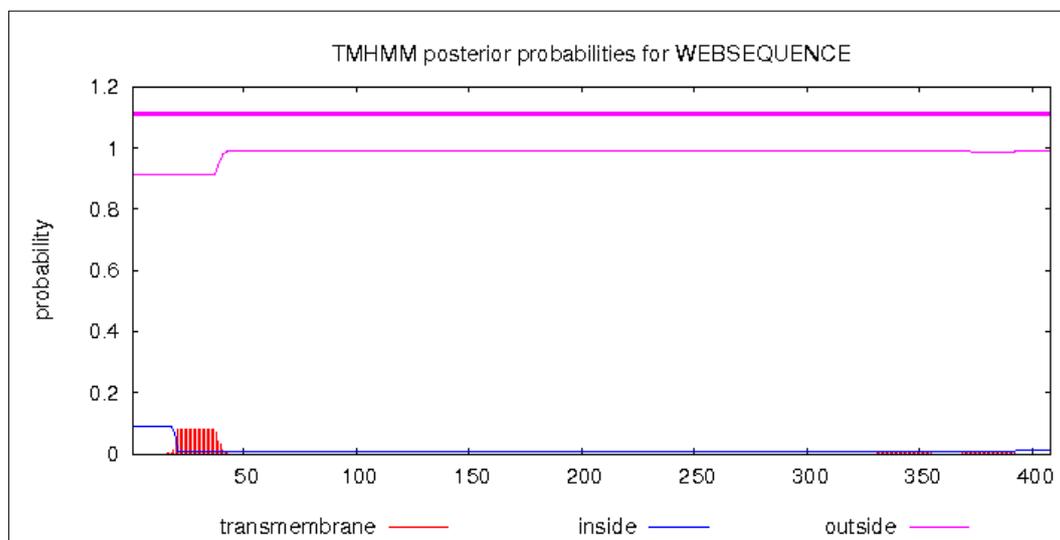
Tres de los resultados presentados en la Figura 3-3 tienen alto porcentaje de homología. En la Figura 4-3, se observa en primera instancia con un 100% de similitud a la enzima “Chalcona sintasa 3-like”, donde hay una coincidencia de los 408 aminoácidos de la secuencia. La enzima “Chalcona sintasa-like” con 407 aminoácidos, comparte igualdad en un 82%. La enzima “2-pirona sintasa-like” tiene un total de 403 aminoácidos en su secuencia, donde un 82% de ellos son los mismos que los de la enzima Chalcona sintasa.

En base a la similitud de la estructura de la cadena de aminoácidos que comparten las enzimas, pueden ser predichas las funciones. En el caso de Chalcona sintasa su participación en el proceso de biosíntesis de flavonoides ha sido probado experimentalmente con técnicas de AND recombinante, (Ohno et al., 2018, p. 415) silenciando 4 genes biosintéticos del tipo chalcona sintasa, para la síntesis de flavonoides (DvCHS1, DvCHS2 , DvCHS3, and DvCHS4), dando como resultado pétalos desprovistos de color, demostrado la relación directa que existe entre el color de las flores de las plantas con la acumulación de flavonoides foliares.

### 3.1.5 Hélices transmembrana de Chalcona sintasa

La figura 5-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Chalcona sintasa muestran alta probabilidad de encontrarse en el exterior de la membrana



**Figura 5-3:** Predicción de hélices transmembrana de Chalcona sintasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0.”)

### 3.1.6 Redes de interacción proteína-proteína

El motivo por el cual las proteínas interactúan entre sí, es por que comparten similitud estructural o funcional, por que exhiben homología genética o porque están involucradas secuencialmente dentro de una ruta metabólica.

Las interacciones proteína-proteína dada por el portal STRING identifican redes entre organismos completamente secuenciados y que manifiesten conexiones biológicamente significativas.

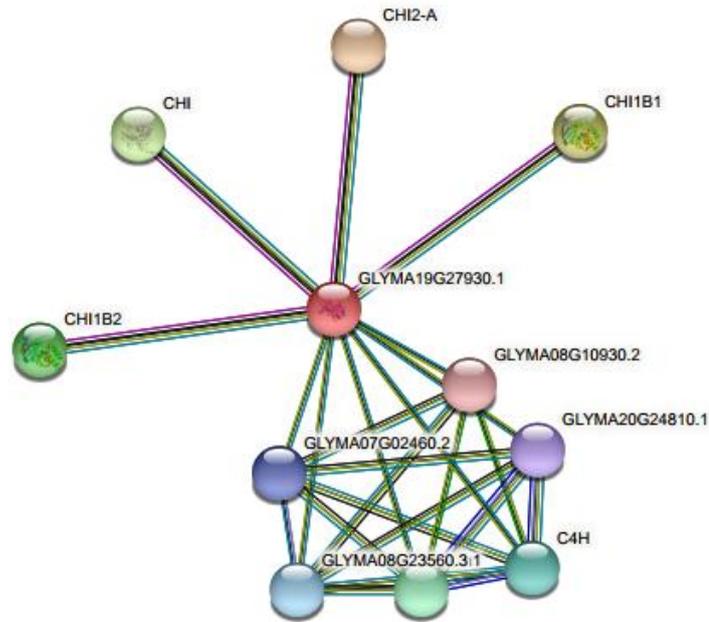
**Tabla 2-3:** Interacciones funcionales de Chalcona sintasa.

Enzima	Función	Puntaje de confianza
CHI2-A	Chalcona-flavona isomerasa 2.A; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas; Responsables de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (también llamada chalcona) en la naringenina (228 aa).	96,7%
CHI 1 B1	Chalcona-flavona isomerasa 1B-1; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas; Responsables de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (también llamada chalcona) en la naringenina (226 aa).	96,7%
CHI	Chalcona-flavona isomerasa 1A; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas; Responsables de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (también llamada chalcona) en la naringenina (218 aa).	96,7%
CHI 1 B2	Chalcona-flavona isomerasa 1B-2; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas; Responsables de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona (también llamada chalcona) en la naringenina (226 aa).	96,7%
C4H	Trans-cinamato 4-monooxigenasa; Controla el flujo de carbono a los pigmentos esenciales para la polinización, protección UV, síntesis de fitoalexinas y ligninas para la defensa contra patógenos. (506 aa).	95,3%

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("GLYMA19G27930.1 proteína (*Glycine max*) - red de interacción STRING,")

En la tabla 2-3 se muestran las proteínas con las que guarda conexión Chalcona sintasa, la base de datos STRIG, detecta al socio con mayor puntuación a *Glycine max*, la asociación proteína-proteína son de tipo funcional, se puede evidenciar que la función de esta enzima en dicho organismo es similar que en *Helianthus annuus*.



**Figura 6-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

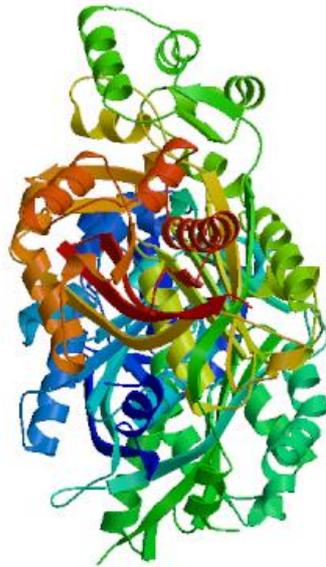
**Fuente:** (“GLYMA19G27930.1 proteína (*Glycine max*) - red de interacción STRING,”) )

En la figura 6-3, las interacciones conocidas experimentalmente son marcadas de color violeta, así Chalcona sintasa forma redes funcionales con CHI 1B2, CHI, CHI2-A, CHI 1B1 de *Glycine max*. El color azul representa la coexpresión genética similar entre las enzimas de Chalcona sintasa de *Helianthus annuus* y *Glycine max*. El amarillo indica redes de interacción proteína-proteína teóricas. Se obvian las interacciones biológicamente no significativas.

### 3.1.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Chalcona sintasa.

El portal SWISS- MODEL diseña un modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.

El peso molecular estimado para la estructura homodímero es de 45328.33 M. y el punto isoelectrico de la enzima 6.12.

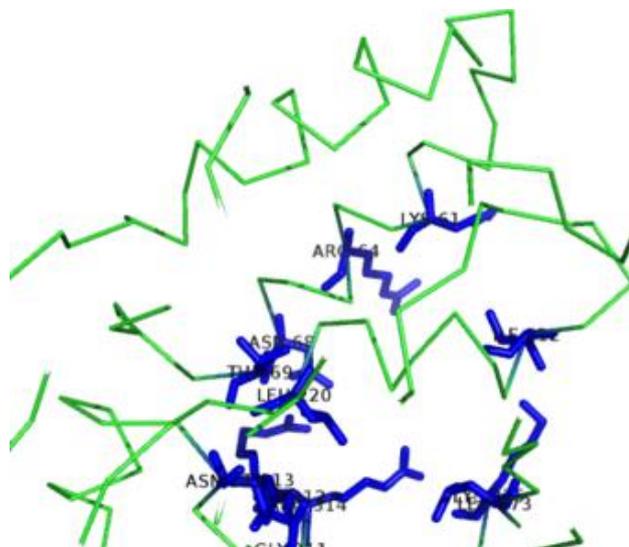


**Figura 7-3:** Estructura tridimensional de Chalcona sintasa

**Fuente:** ("SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |")

### *3.1.8 Predicción de sitios de unión a ligandos*

En la figura 8-3 se distinguen los segmentos específicos de la cadena de aminoácidos para la formación del complejo ligando-receptor, los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.



**Figura 8-3:** Sitios de unión a ligandos de Chalcona sintasa

**Fuente:** ("Bioinformatics Web Servers - University of Reading,")

## 3.2 Enzima Chalcona isomerasa

### 3.2.1 Secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa

```
GenomeNet  
>han:110872655 K01859 chalcone isomerase [EC:5.5.1.6] | (RefSeq) probable chalcone--flavonone isomerase 3 (A)  
MESEPMVDDIPFPPQITTTKPLSLLGHGITDIEIHFLQIKFTAIGVYIDPVILTHLQKW  
KGKSGTDLAEDDDFFDSIISAPVDKYL RIVAIKEIKGSQYGVQLESSVRDLAADDKYEE  
EEEEALEQIVEFFQSKYFKKDSVITFSFPAASNFEIGFSSEGKEPKVIKVENGNWVEM  
IKKWYLGTTAYSPTISSLANTLSLELSK  
  
BLAST
```

**Figura 9-3:** Secuencia de 210 aminoácidos de Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”

### 3.2.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la segunda enzima, Chalcona isomerasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según la base de datos KEGG.

**Tabla 3-3:** Características de la enzima Chalcona isomerasa

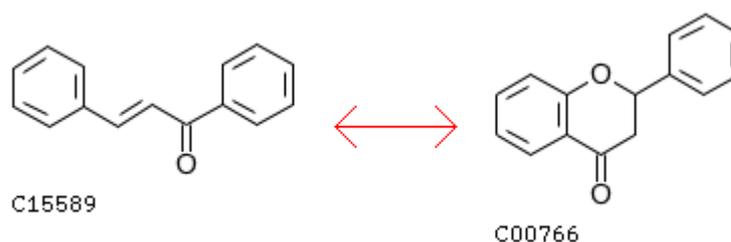
Código de accesoión KEGG	110872655
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Isomerasa, Liasa intramolecular
Descripción genética	Probable chalcona-flavanona isomerasa 3 Proteína codificante
Sysname	Flavanona liasa (Ring-opening)
Nombres	Chalcona isomerasa Chalcona-flavanona isomerasa Flavanona liasa
Reacción (IUBMB)	De chalcona → a flavanona
Substrato	Chalcona

Producto	flavanona
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.2.3 Reacción de catálisis de Chalcona isomerasa



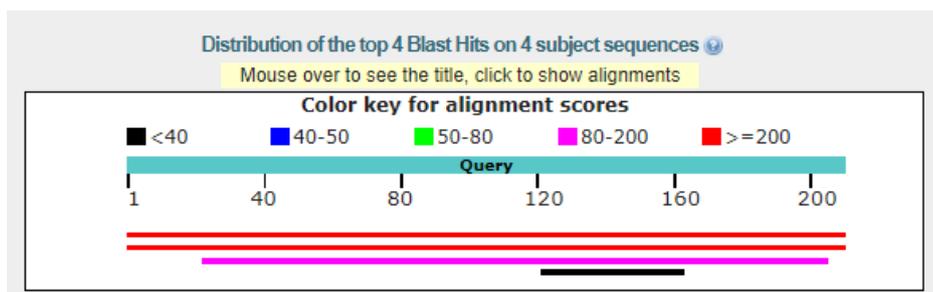
**Figura 10-3:** Reacción IUBMB de Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R07344,”)

La chalcona (C15589) sufre una hidroxilación en la posición 2' para producir flavanona (C00766). Esta enzima también está implicada en la conversión estereoespecífica de la naringenina chalcona en (2S) naringenina, un paso temprano en la síntesis de flavonoides (Burke et al., 2016, pp. 2–3).

### 3.2.4 Alineación tipo local de la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 11-3:** Nivel de homología de la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (210 letters),”)

En la figura 11-3 indica un nivel alto de homología encontrada, entre la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa con dos especies identificadas de color rojo, una menor proporción de similitud con una tercera especie en color violeta; lo que sugiere que pocas proteínas comparten regiones similares a secuencia diana.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

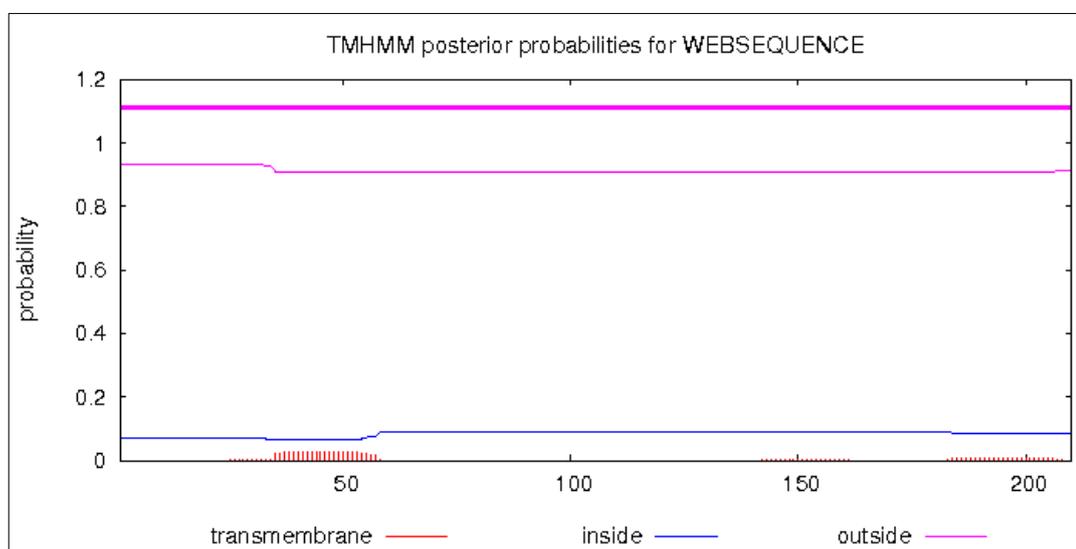
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">probable chalcone-flavanone isomerase 3 [Helianthus annuus]</a>	424	424	100%	3e-153	100%	<a href="#">XP_021977194.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative chalcone-flavanone isomerase family protein [Helianthus annuus]</a>	423	423	100%	6e-153	99%	<a href="#">OTG18296.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">fatty-acid-binding protein 3, chloroplastic [Helianthus annuus]</a>	83.2	83.2	87%	1e-18	28%	<a href="#">XP_022013446.1</a>

**Figura 12-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,”)

La figura 12-3 identifica a Chalcona-flavanona isomerasa con un 100% similitud de los 210 aminoácidos de su secuencia; 99% de similitud con la familia de proteínas putativa chalcona-flavanona isomerasa, es decir todas las proteínas de esa familia comparten 209 aminoácidos iguales a chalcona isomerasa de *Helianthus annuus*; en el caso de la proteína de unión a ácidos grasos 3-cloropasto solo el 28% de sus regiones tienen similitud.

### 3.2.5 Hélices transmembrana de Chalcona isomerasa



**Figura 13-3:** Predicción de hélices transmembrana de Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

La figura 13-3 se muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Chalcona isomerasa muestran alta probabilidad de encontrarse en el exterior de la membrana, y se puede observar también que un segmento de la secuencia entre los aminoácidos 40 a 55 puede hallarse en un dominio transmembrana.

### 3.2.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de chalcona isomerasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Arabidopsis thaliana*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

**Tabla 3-3:** Interacciones funcionales de Chalcona isomerasa

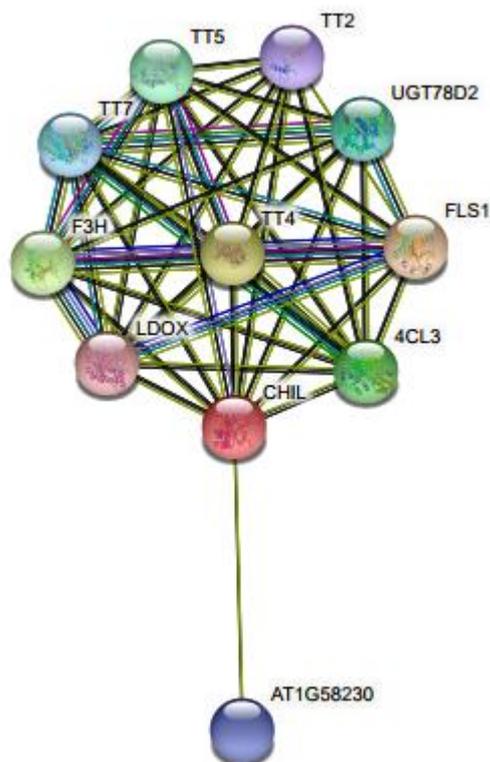
Enzima	Función	Puntaje de confianza
FLS1	Flavonol sintasa 1; Cataliza la formación de flavonoles desde el dihidroflavonol. Puede actuar en la transformación de dihidrokaempferol a kaemperol, dihidroquercetina a quercetina y de dihidromiricetin a miricetin. In vitro cataliza la oxidación de ambos enantiomeros de la naringenina, confiriendo una configuración cis- y trans-dihidrokaempferol (336 aa).	92,5%
TT4	Chalcona sintasa; El producto primario de esta enzima es 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona, que puede en condiciones específicas, isomerizarse espontáneamente en naringenina (395 aa).	91,7%
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa; Cataliza la 3-beta-hidroxilación de 2S-flavanonas a 2R,3R-dihidroflavonoles que son intermediarios en la biosíntesis de flavonoles, antocianidinas, catequinas y protocianidinas en plantas (358 aa).	91,1%
4CL3	4-cumarato-CoA ligasa 3; Produce CoA tioester de una variedad de hidroxil- y metoxil- substitutos del ácido cinámico, que son usados en la síntesis de varios compuestos derivados del fenilpropano, incluido antocianinas, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, ligninas (561 aa).	90,8%
TT5	TRANSPARENT TESTA 5; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas en tricíclicas (S)-flavononas. Responsable de la isomerización de 4, 2',4',6'-tetrahidroxichalcona en naringenina (246 aa).	88,1%

UGT78D2	UDO-glucosil transferasa 78D2; cataliza la glicosilación de flavonoides desde UDP-glucosa. Cataliza la glicosilación de antocianinas desde UDP-glucosa (460 aa).	84,8%
TT7	TRANSPARENTE TESTA 7; Cataliza la 3'-hidroxilación del anillo B de flavonoides. Convierte la narigenina a erodictiol y la dihidrokaempferol a dihidroquercetina (513 aa).	76,8%
AT1G58230	Efecto vinculante; posiblemente está involucrado en la supresión de la actividad del BCHC1 (260 aa).	73,7%
TT2	TRANSPARENT TESTA 2; Activador de la transcripción; Esta envuelto en el control del metabolismo tardío del <i>Cardamine impatiens</i> (258 aa).	69,3%
LDOX	Leucoantocianidin dioxigenasa; Involucrada en la biosíntesis de antocianidinas y protoantocianidinas por catálisis de la oxidación de leucoantocianidinas en antocianidinas. Posee Flavonol sintasa con baja actividad in vitro (356 aa).	69,3%

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("CHIL protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,")

En la tabla 3-3 se describen las funciones de las proteínas identificadas en *Arabidopsis thaliana* y que guardan similitud estructural y funcional con las participantes en la síntesis de flavonoides en *Helianthus annuus*, se muestra también el porcentaje de similitud de cada una.



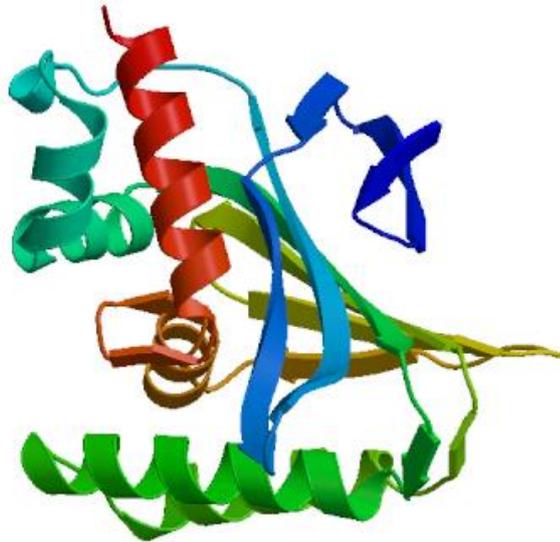
**Figura 14-3:** Socios de interacción con puntuación más alta

**Fuente:** ("CHIL protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,")

### 3.2.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Chalcona isomerasa

El portal SWISS- MODEL diseña un modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de Chalcona isomerasa, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.

El peso molecular estimado para la estructura monómera es 23484.73 M., el punto isoeléctrico 4.68.



**Figura 15-3:** Estructura tridimensional de Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,”)

### 3.2.8 Predicción de sitios de unión a ligandos



**Figura 16-3:** Sitios de unión a ligandos de Chalcona isomerasa

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,”)

En la figura 16-3 se distinguen los segmentos específicos de la cadena de aminoácidos para la formación del complejo ligando-receptor, los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.

### 3.3 Enzima Naringenina 3-dioxigenasa

#### 3.3.1 Secuencia de aminoácidos de naringenina 3-dioxigenasa

```

GenomeNet

>han:110915473 K00475 naringenin 3-dioxygenase [EC:1.14.11.9] | (RefSeq) naringenin,2-oxoglutarate 3-dioxygenase (A)
MAPVSLKNDETSLHENRFVRDEDERPKVPYNKFSSEIPVISLKGIDDVDGSSVDGFGSRR
AEICDKIVKACEDWGIQVVDHGVDTKLLSEMTRLAREFFELPTEEKLRFDMTGGKGGF
IVSSHQGEAVQDWRREIVTYFSYPIKARDYSRWPDTPKEWRVTEKYSEELMGLACKLLE
VLSEAMGLEKALTKACVMDQKVVVNYYPKCPQDPLTGLKRHTDPGTITLLQDQVGG
LQATRDGGNTWITVQPIEGAFVNLGDHGHYLSNGRFKNADHQAVVNSNTSRLSIATFQN
PAPEAVVYPLKVNEGEKSIHEKPITFMEMYKXKMSDLELARKLKLAKQDLEKVKPIE
NIFA

BLAST
  
```

**Figura 17-3:** Secuencia de 364 aminoácidos Naringenina-3dioxigenasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

#### 3.3.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la tercera enzima, Naringenina-3dioxigenasa encontramos características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según esta base de datos.

**Tabla 4-3:** Características de la enzima Naringenina 3-dioxigenasa

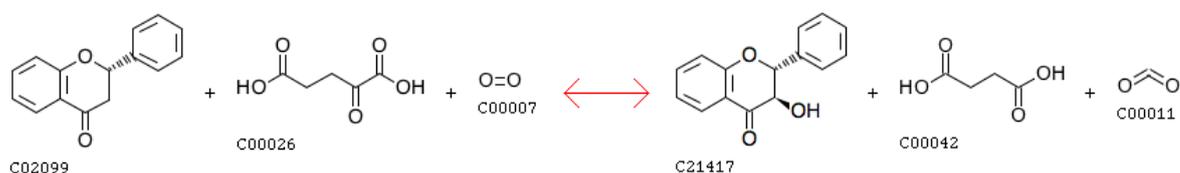
Código de accesoión KEGG	110915473
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Sysname	(2S)-flavan-4-ona 2-oxoglutarato
Nombres	Flavanona 3-dioxigenasa Naringenin 3-hidroxilasa Flavanona 3-hidroxilasa

	Flavanona 3beta-hidroxilasa
Reacción (IUBMB)	(2S)-flavan-4-ona + 2-oxoglutarato + O <sub>2</sub> → (2R,3R)-dihidroflavonol + succinato + CO <sub>2</sub>
Substrato	(2S)-flavan-4-ona; 2-oxoglutarato; O <sub>2</sub>
Producto	(2R,3R)-dihidroflavonol Succinato CO <sub>2</sub>
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.3.3 Reacción de catálisis de Naringenina 3-dioxigenasa



**Figura 18-3:** Reacción IUBMB de Naringenina-3dioxigenasa

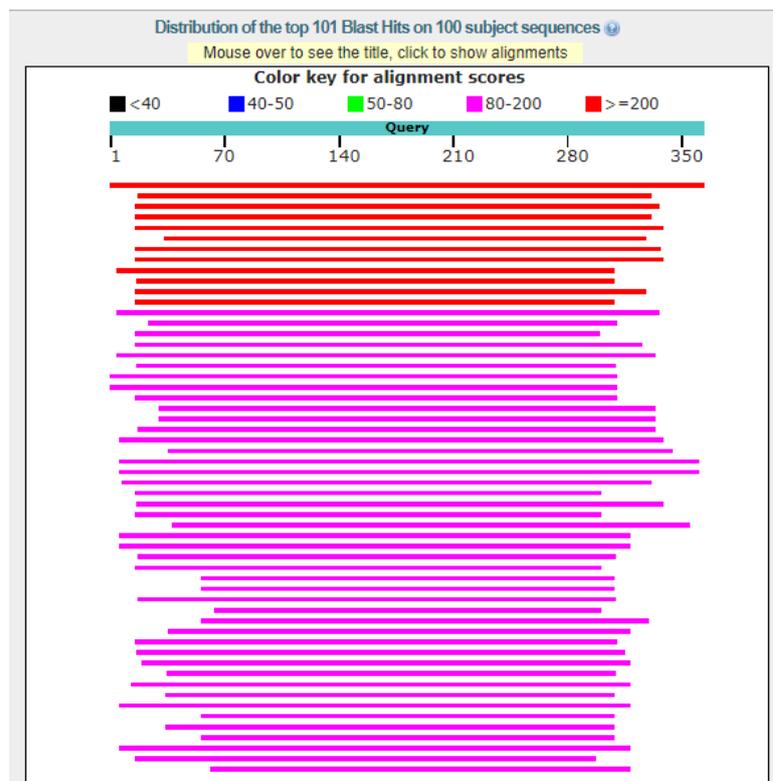
**Fuente:** (“KEGG REACTION: R07329,”)

La reacción que cataliza la tercera enzima en esta ruta biosintética de flavonoides es el paso de naringenina a pelargonidina, un paso temprano, lo que conlleva a estar implicado también en la producción de antocianinas. Este proceso requiere de la presencia de Fe<sup>2+</sup> y ascorbato.

Algunas enzimas son bifuncionales y también catalizan la reacción de la flavonol sintasa. (Zoratti et al., 2014, p. 3)

### 3.3.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Naringenina 3-dioxigenasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 19-3:** Nivel de homología se la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (364 letters),” )

En la figura 19-3 se muestran 54 proteínas que tienen un nivel de similitud con naringenina 3-dioxigenasa, la primera coincide totalmente con la misma cadena se aminoácidos, lo cual hace referencia a sus posibles similitudes en función y en estructura o que descienden de un mismo tronco común. (Malacarne et al., 2016b, p. 9)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

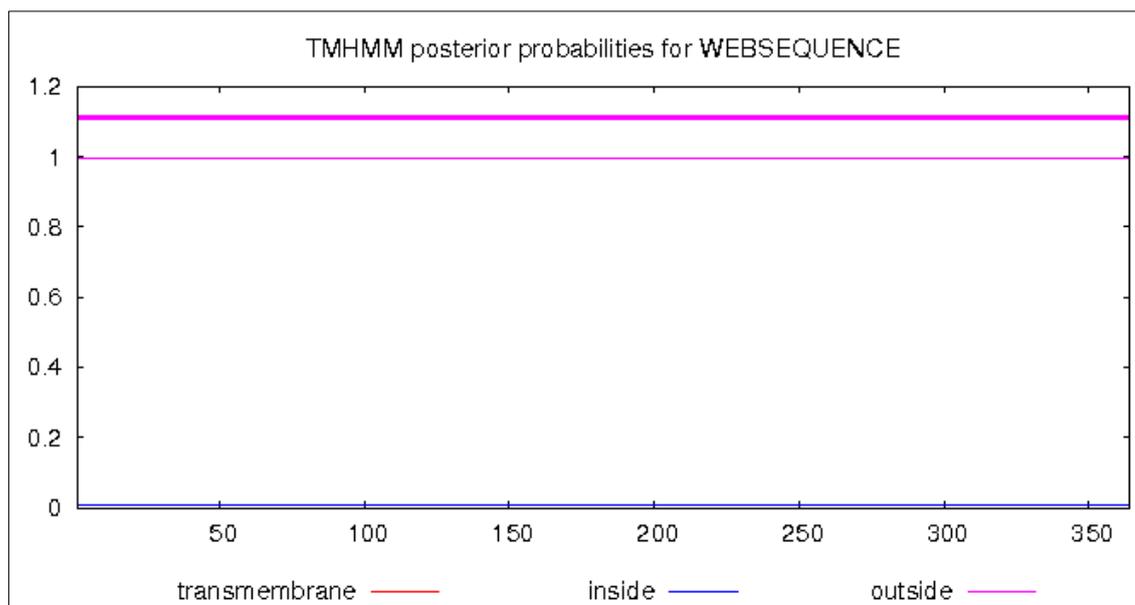
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">naringenin, 2-oxoglutarate 3-dioxygenase [Helianthus annuus]</a>	757	757	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_022015871.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">protein DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like [Helianthus annuus]</a>	224	224	86%	4e-70	38%	<a href="#">XP_022029426.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">protein DMR6-LIKE OXYGENASE 2-like [Helianthus annuus]</a>	223	223	88%	5e-70	37%	<a href="#">XP_022027013.1</a>

**Figura 20-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Naringenina 3-diosxigenasa

**Fuente:** (“NCBI Conserved Domain Search,” )

Se observa un 100% de coincidencia de la naringenina 2-oxoglutarato-dioxigenasa con la enzima analizada, en el segundo caso el 38% de la proteína DMR6-like 2-oxigenasa coincide, mientras que en el tercer caso como se puede observar en la imagen 19.3 un 37% coincide.

### 3.3.5 Hélices transmembrana de Naringenina 3-dioxigenasa



**Figura 21-3:** Predicción de hélices transmembrana de Naringenina 3-dioxigenasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,” n.d.)

La figura 21-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Naringenina 3-dioxigenasa muestran alta probabilidad de encontrarse en el exterior de la membrana

### 3.3.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de Naringenina 3-dioxigenasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Arabidopsis thaliana*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

**Tabla 5-3:** Interacciones funcionales de Naringenina 3-dioxigenasa

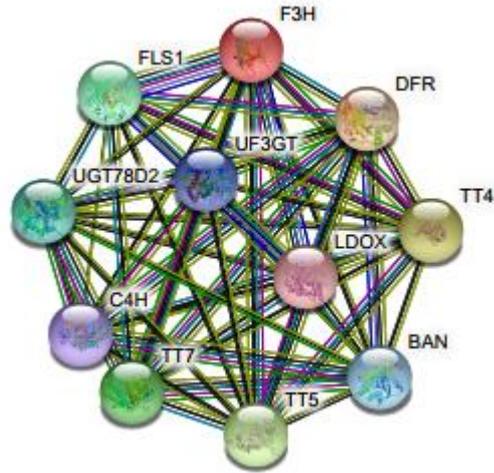
Enzima	Función	Puntaje de confianza
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa (382 aa).	99,9%

TT4	Chalcona sintasa; El producto primario de esta enzima es 4,2',4',6',-tetrahidroxichalcona que puede en condiciones específicas isomerizarse espontáneamente en naringenina (395 aa).	99,9%
TT5	TRANSPARENT TESTA 5; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas en tricíclicas. Responsable de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona in naringenina (246 aa).	99,9%
TT7	TRANSPARENT TESTA 7; Cataliza la 3'-hidroxilación del anillo B de los flavonoides a estado 3',4'-hidroxilado.	99,6%
FLS1	Flavonol sintasa 1; Cataliza la formación de flavonoles desde el dihidroflavonol. Puede actuar en la transformación de dihidrokaempferol a kaemperol, dihidroquercetina a quercetina y de dihidromiricetin a miricetin. In vitro cataliza la oxidación de ambos enantiomeros de la naringenina, confiriendo una configuración cis- y trans-dihidrokaempferol (336 aa).	99,5%
UGT78D2	UDO-glucosil transferasa 78D2; cataliza la glicosilación de flavonoides desde UDP-glucosa. Cataliza la glicosilación de antocianinas desde UDP-glucosa (460 aa).	97,2%
BAN	BANYULS; Involucrada en la biosíntesis de taninos condensados. Convierte cianidinas en (-)-epicatequinas en gran cantidad (340 aa).	97,0%
UF3GT	UDP-glucosa-flavon 3-o-glucosiltransferasa; Esta involucrada en ciertos pasos de la biosíntesis de antocianinas. Convierte cianidina 3-o-glucosido a cinidina 3-O-xilosyl (1->) glucosido. Puede usar 3-o-glucosilato antocianidin (468 aa).	96,9%
C4H	Cinamato-4-hidroxilasa; Controla el flujo de carbono a los pigmentos esenciales para la polinización, la protección de radiación UV, a numerosas fitoalexinas para la protección de la planta frente a patógenos, y a ligninas. (505)	96,0%
LDOX	Leucoantocianidin dioxigenasa; Involucrada en la biosíntesis de antocianidinas y protoantocianidinas por catálisis de la oxidación de leucoantocianididas en antocianidinas. Posee Flavonol sintasa con baja actividad in vitro (356 aa).	95,6%

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("F3H protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network," )

En la tabla 5-3 se muestran las proteínas con las que guarda conexión Naringenina 3-dioxigenasa, la base de datos STRIG, detecta al socio con mayor puntuación a *Arabidopsis thaliana*, la asociación proteína-proteína son de tipo funcional y pueden visualizarse en la imagen 22-3

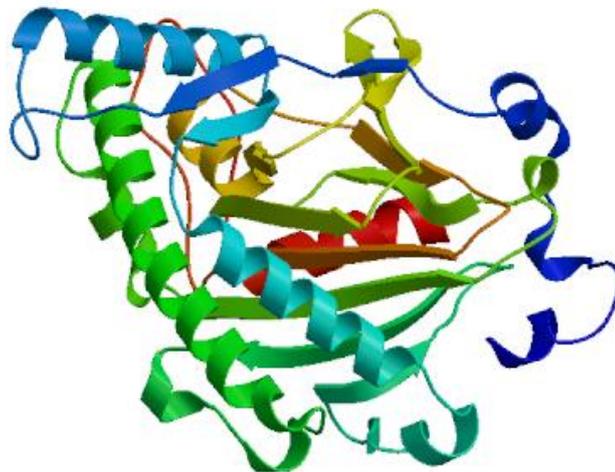


**Figura 22-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“F3H protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,”)

### 3.3.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Naringenina 3-dioxigenasa

Modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de esta enzima, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.

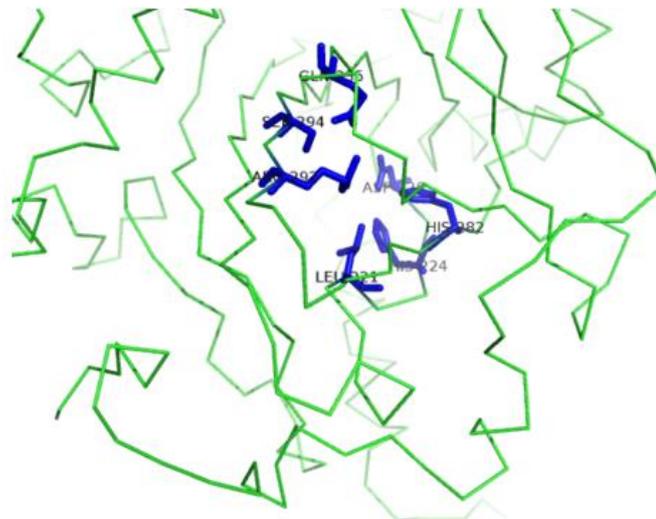


**Figura 23-3:** Estructura tridimensional de Naringenina 3-dioxigenasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,”)

La estructura tridimensional corresponde a una proteína monomérica, su peso molecular aproximado es de 41168.02M, con punto isoeléctrico de 5.57.

### 3.3.8 Predicción de sitios de unión a ligandos



**Figura 24-3:** Sitios de unión a ligandos de Naringenina 3-dioxigenasa

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,” )

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 24-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.

## 3.4 Enzima Flavonol sintasa

### 3.4.1 Secuencia de aminoácidos de flavonol sintasa

```
GenomeNet
>han:110878613 K05278 flavonol synthase [EC:1.14.11.23] | (RefSeq) flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like (A)
MEIERVQEIASLSNLKGTIPSEFIILENEQATTTTIHGAVLEVPVIDLCNPDDQSLVASI
SEASKSWGIFQVVMHGIPNEHISELQKVGKEFFELPQDEKEVIKPIGVEGVEGYGTHQ
KEVEGKKGWVDHLFHRVWPPSAVWYHYWPKNPPSYRÉTNEQYTQSLIPVADKLLGLLSRG
LGLEDGEVKQGLGCEDMFYMLKINYYPAACPPELDLGLGPHTDMSSITILVPNEVQGLQV
FKDDHWYDVAYIPNALIVHIGDQIEILSNGKYKSVYHRTTVNKEKTRMSWPMFLEPPPEF
EVGPIPKLITQDNPSKFKTKKYKDFVDCCKLNKLPQ
```

[BLAST](#)

**Figura 25-3:** Secuencia de 335 aminoácidos Flavonol sintasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 3.4.2 Interpretación biológica de enzima

Al analizar la información correspondiente a la cuarta enzima, flavonol sintasa encontramos características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según la base de datos KEGG.

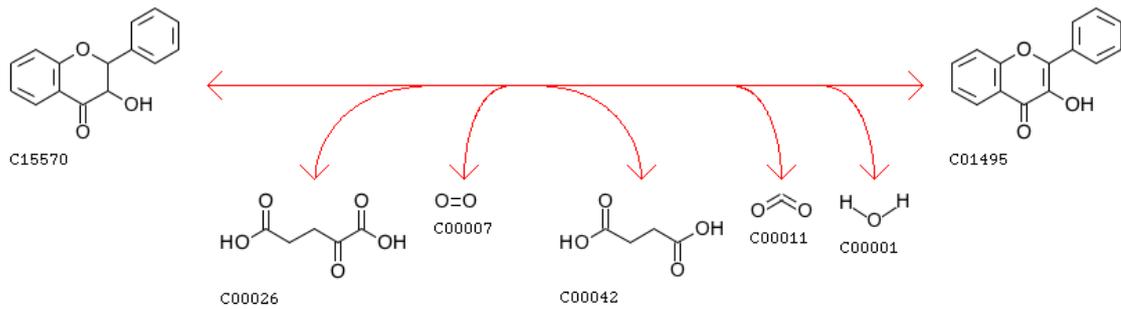
**Tabla 6-3:** Características de la enzima Flavonol sintasa

Código de accesoión KEGG	110878613
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Descripción genética	Flavonol sintasa Proteína codificante
Sysname	Dihidroflavonol 2-oxoglutarato
Nombres	Flavonol sintasa
Reacción (IUBMB)	Dihidroflavonol + 2-oxoglutarate + O <sub>2</sub> → a flavonol + succinato + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O
Substrato	Dihidroflavonol 2-oxoglutarato O <sub>2</sub>
Producto	Flavonol Succinato CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 3.4.3 Reacción de catálisis de Flavonol sintasa



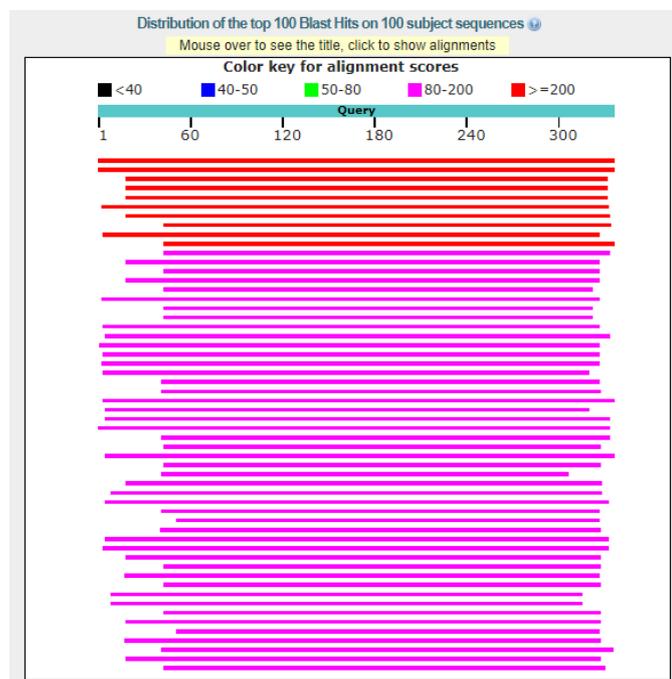
**Figura 26-3:** Reacción IUBMB de Flavonol sintasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R07368,”)

La enzima flavonol sintasa a parte de la de-saturación de (2R, 3R)-dihidroflavonoles a flavonoles tiene la función de convertir la naringenina en kaempferol, ésta bifuncionalidad de la enzima fue identificada en *Citrus unshiu* (Wellmann et al., 2002, p. 12). Actúa incorporando o deduciendo oxígeno molecular. La reacción requiere del cofactor Fe<sup>2+</sup>

### 3.4.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Flavonol sintasa

Al alinear la secuencia de aminoácidos de flavonol sintasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 27-3:** Nivel de homología de la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (335 letters),”)

El nivel de homología de la enzima flavonol sintasa consueña en un 100% con flavanona 3-hidroxilasa, en un 39% con leucoantocianidina dioxigenasa

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

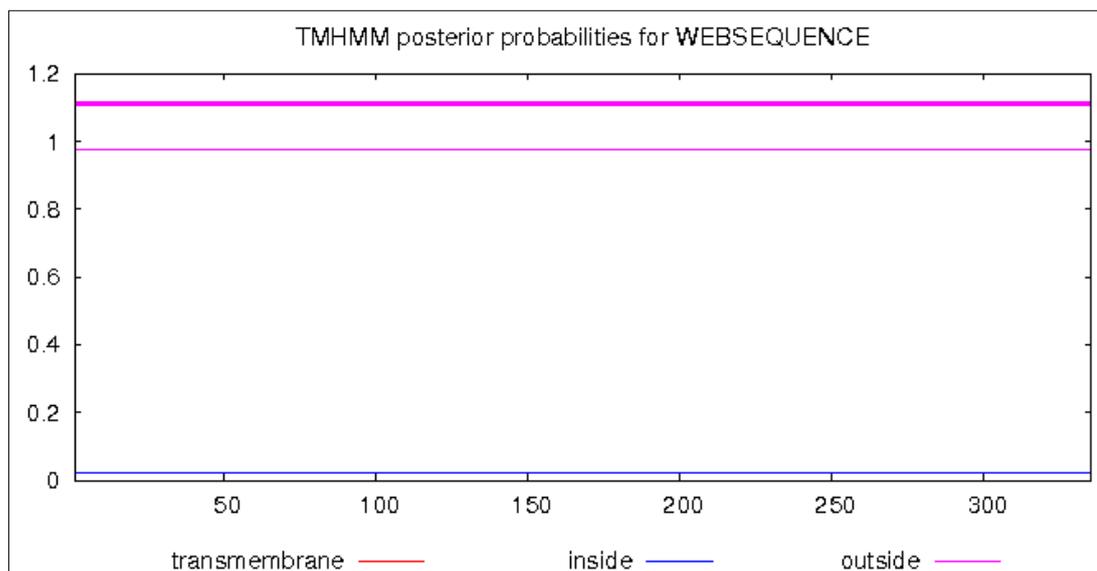
Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like [Helianthus annuus]</a>	691	691	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021982639.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like [Helianthus annuus]</a>	596	596	100%	0.0	90%	<a href="#">XP_021982641.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">leucoanthocyanidin dioxygenase-like [Helianthus annuus]</a>	239	239	93%	3e-76	39%	<a href="#">XP_022033616.1</a>

**Figura 28-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Flavonol sintasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (335 letters),”)

### 3.1.5 Hélices transmembrana de Flavonol sintasa



**Figura 29-3:** Predicción de hélices transmembrana de Flavonol sintasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

La figura 29-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Flavonol sintasa muestran alta probabilidad de encontrarse en el exterior de la membrana

### 3.4.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de Flavonol sintasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Solanum tuberosum*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

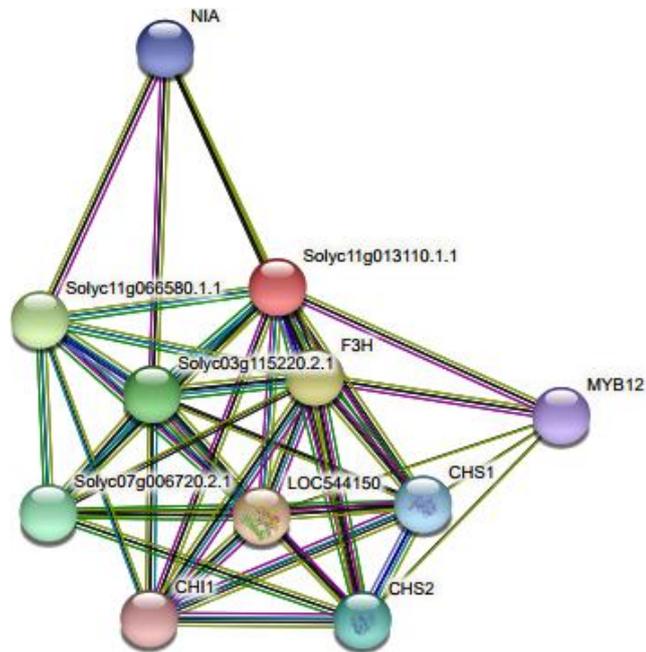
**Tabla 7-3:** Interacciones funcionales de Flavonol sintasa.

Enzima	Función	Puntaje de confianza
LOC544150	Dihidroflavonol-4-reductasa (379 aa).	96,2%
F3H	Flavanona 3 beta-hidroxilasa (362 aa).	95,4%
Solyc11g066580.1.1	Flavonoid 3',5'-hidroxilasa; Putativa flavonoide 3'5' hidroxilasa (511 aa).	94,6%
CHS2	Chalcona sintasa 2; El producto primario de esta enzima es 4,2',4'6'-tetrahidroxichalcona, que puede bajo condiciones específicas isomerizarse espontáneamente a naringenina (389 aa).	72,6%
CHS1	Chalcona sintasa 1; El producto primario de esta enzima es 4,2',4'6'-tetrahidroxichalcona, que puede bajo condiciones específicas isomerizarse espontáneamente a naringenina (389 aa).	68,6%
NIA	Nitrato reductasa [NADH]; Nitrato reductasa es una enzima clave, involucrada en el primer paso de la asimilación de nitrato en las plantas, hongos y bacterias (912 aa).	48,8%
MYB12	MYB12; myb12 es un factor de transcripción (338 aa).	48,8%

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("FLS protein (*Solanum tuberosum*) - STRING interaction network,")

En la tabla 7-3 se muestran las proteínas con las que guarda conexión flavonol sintasa, la base de datos STRIG, detecta al socio con mayor puntuación a *Solanum tuberosum*, la asociación proteína-proteína son de tipo funcional y pueden visualizarse en la imagen 29-3.

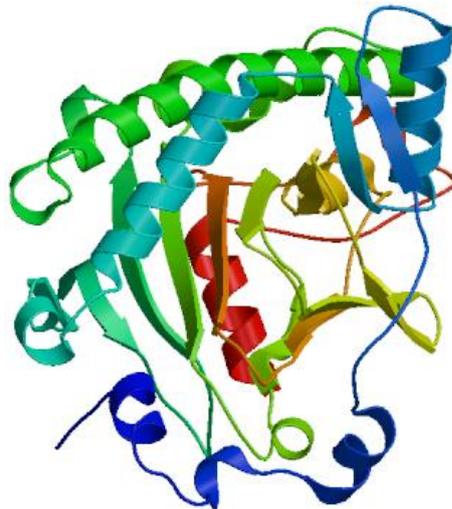


**Figura 30-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“FLS protein (*Solanum tuberosum*) - STRING interaction network,”)

### 3.4.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Flavonol sintasa.

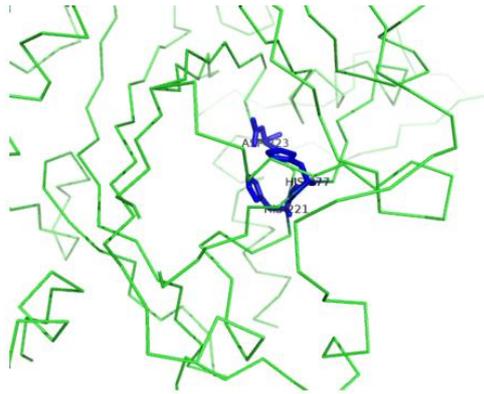
La estructura tridimensional para la secuencia de aminoácidos de flavonol sintasa corresponde a una proteína monomérica, con un peso molecular de 37977,34 M. y un punto isoeléctrico de 5,28.



**Figura 31-3:** Estructura tridimensional de Flavonol sintasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,”)

### 3.4.8 Predicción de sitios de unión a ligandos



**Figura 32-3:** Sitios de unión a ligandos de Flavonol sintasa

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,”)

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 32-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.

## 3.5 Enzima Trans-cinamato 4-monooxigenasa

### 3.5.1 Secuencia de aminoácidos de Trans-cinamato 4-monooxigenasa

#### GenomeNet

```
>han:110865806 K00487 trans-cinnamate 4-monooxygenase [EC:1.14.13.11] | (RefSeq) trans-cinnamate 4-monooxygenase (A)
MDLLLIEKTLALLFAAIIGAVISKLRGKRFKLPVIFGNLQVGGDLNHRRLTD
LAKKFGEIFLLRMGQRNLVVVSSPDLAKEVLHTQGVFVGSRTRNVVDFITGKGQDMVFT
VYGEHWKMRIRIMTVPFFTNKVVQQYRYGWEAEAAAVVEDVKKNPAAATEGVIRRLQL
MNYNMFRIIMFDRRFESDDPLFVKLALNGERSRLAQSFYNYGDFIPILRPFLKGYLK
LCKEVKEKRFQLFKDYFVDERKKLESTKSVNQLKCAIDHILDAKEKEINEDNVLYIV
ENINVAAIETTLSIENGAELVNHPEIQAKLRNELDTKLGPGVQVTEPDLHKLPYLQAV
IKETLRLMAIPLLPHMNLHDAKLGGYDIPAESKILVNAHWLANNPEQWKKPEEFRPER
FFEEESKVEANGNDFRYLFPFGVRRSCPGLIILALPILGITIGRLVQNFELPPPGQAKVD
TTEKGGQFSLHILKHSTIVAKPRAL
```

BLAST

**Figura 33-3:** Secuencia de 505 aminoácidos de Trans-cinamato 4-monooxigenasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.5.2 Interpretación biológica de enzima

Al analizar la información correspondiente a la quinta enzima, Trans-cinamato 4-monooxigenasa encontramos características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según la base de datos KEGG

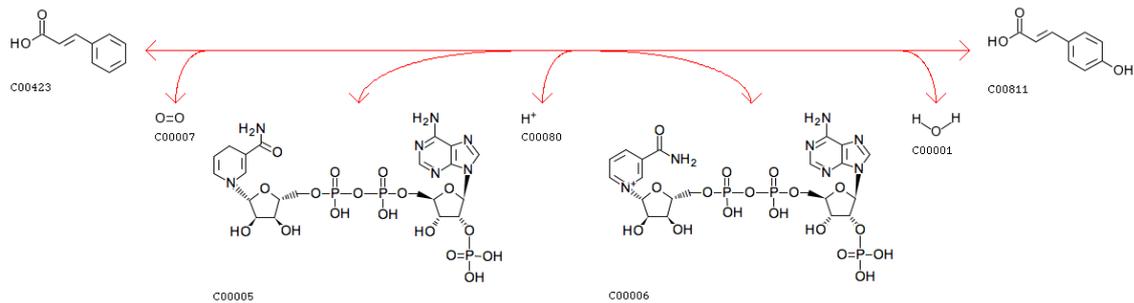
**Tabla 8-3:** Características de la enzima Trans-cinamato 4-monooxigenasa

Código de accesoión KEGG	110865806
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Descripción genética	Trans-cinamato 4-monooxigenasa
Nombres	Trans-cinamato 4-monooxigenasa Ácido cinámico 4-hidroxilasa Citocromo P450 cinamato 4-hidroxilasa Cinamato 4-hidroxilasa Ácido trans-cinámico 4-hidroxilasa
Reacción (IUBMB)	Trans-cinamato + NADPH + H <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> → 4-hidroxicinamato + NADP <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O
Substrato	Trans-cinamato NADPH H <sup>+</sup> O <sub>2</sub>
Producto	4-hidroxicinamato NADP <sup>+</sup> H <sub>2</sub> O
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoide-quinonas, metabolismo de la fenilalanina, biosíntesis de fenilpropanoides, biosíntesis de estilbeno

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” .)

### 3.1.3 Reacción de catálisis de Trans-cinamato 4-monooxigenasa



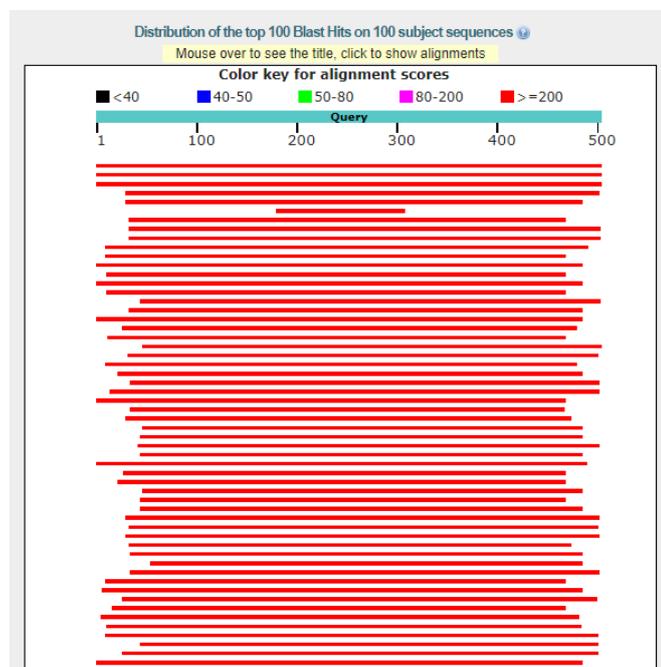
**Figura 34-3:** Reacción IUBMB de Trans-cinamato 4-monooxigenasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R02253,”)

La enzima trans-cinamato 4-monooxigenasa, actúa incorporando o reduciendo un oxígeno molecular; siendo NADH o NAPH un donante, en el primer caso NADH la actuación es más lenta. Como cofactor interviene la proteína hemo-tiolato. Esta enzima es un miembro de la súper familia de enzimas P450, cataliza el primer paso oxidativo de la ruta del fenilpropanoide en plantas superiores. (Dias et al., 2015, pp. 4–5)

### 3.1.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Trans-cinamato 4-monooxigenasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de Trans-cinamato 4-monooxigenasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 35-3:** Nivel de homología de la secuencia de aminoácidos

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (505 letters),”)

En la figura 35-3 se puede observar un porcentaje de homología en un 100% con la primera enzima, en un 92% en el segundo caso y de un 93% en el tercero. Identificadas con el mismo nombre por cumplir la misma función en la ruta biosintética de los flavonoides, pero identificada en otro organismo. (Mierziak et al., 2014, p. 4)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

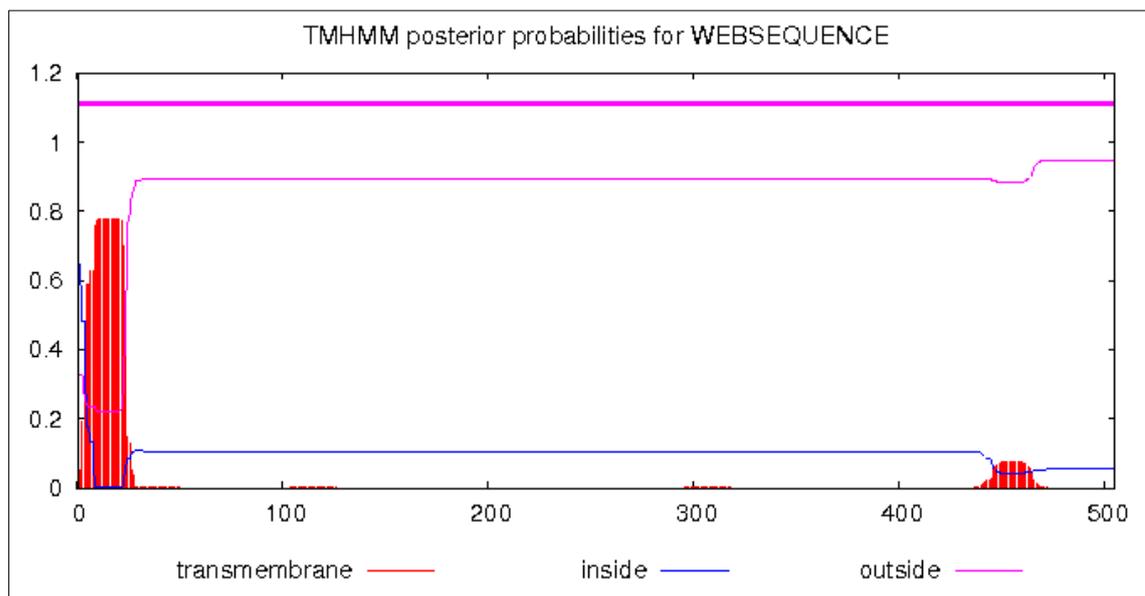
Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">trans-cinnamate 4-monooxygenase [Helianthus annuus]</a>	1035	1035	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021970822.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">trans-cinnamate 4-monooxygenase-like [Helianthus annuus]</a>	969	969	100%	0.0	92%	<a href="#">XP_021972445.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">trans-cinnamate 4-monooxygenase [Helianthus annuus]</a>	965	965	100%	0.0	93%	<a href="#">XP_021977977.1</a>

**Figura 36-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Trans-cinamato 4-monooxigenasa

**Fuente:** (“NCBI Conserved Domain Search,”)

### 3.5.5 Hélices transmembrana de Trans-cinamato 4-monooxigenasa



**Figura 37-3:** Predicción de hélices transmembrana de Trans-cinamato 4-monooxigenasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

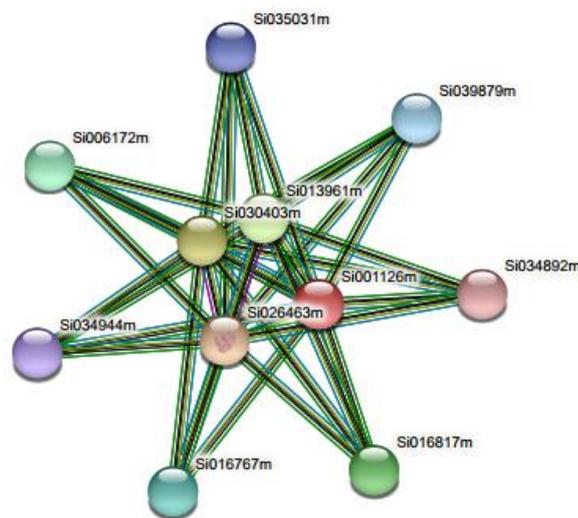
La figura 37-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Trans-cinamato 4-monooxigenasa muestran alta probabilidad de encontrarse en el exterior de la membrana, con fragmentos específicos de entre los aminoácidos 1-20 de hallarse en un dominio transmembrana.

### 3.5.6 Redes de interacción proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína dada por el portal STRING predicen redes entre organismos completamente secuenciados y que manifiesten conexiones biológicamente significativas.

Al analizar la secuencia de aminoácidos de trans-cinamato 4-monooxigenasa en la base de datos STRING, detecta interacción con proteínas funcionalmente similares de *Setaria itálica*, pero similitud de funciones no está detallada, ya que hasta el momento dichas proteínas no han sido caracterizadas.



**Figura 38-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“Si001126m protein (*Setaria itálica*) - STRING interaction network,”)

### 3.5.7 Modelo estructural tridimensional predicho para trans-cinamato 4-monooxigenasa

La estructura tridimensional diseñada por SWISS- MODEL para la secuencia de aminoácidos de trans-cinamato 4-monooxigenasa corresponde a la de una proteína de tipo monomérica, cuyo peso molecular estimado es de 57874,39 M. y su punto isoeléctrico de 9,07.



## GenomeNet

```
>han:110898892 K13082 bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase
MKEDSPATVCVTGASGFIGSWLVMRLLEGGYIVRATVRDPGDMKKVKHLKELPGAETNLT
LYKADMTQEGSFDEAIEGCHGVFHVATPMDFESKDPENEIIKPTVQGVLSIVRSCAKAKT
VKKLVFTSSAGTVNVQEKQLPVYDESHWSDLDFINSEKMTAWMYFVSKTLAERAANKAAI
ENNIDFISIIPTLVVGPFITPTFPPSLITALSLINGMESHYSIIKQGQFVHLDLCECHI
FLYENPEAKGRYICSSHDATIHQLARMIKEKWPEYHVPTQFVGIDEDIPVVSFSSKKLTD
MGFEFKYNLEEMFKGAIDCCREKGLLPYSTNEVKKRLITSPINDHVQGECKVAN
```

### BLAST

**Figura 41-3:** Secuencia de 355 aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.6.2 Interpretación biológica de enzima

El análisis de la información correspondiente a la sexta enzima, dihidroflavonol 4-reductasa se encontraron características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo según la base de datos KEGG.

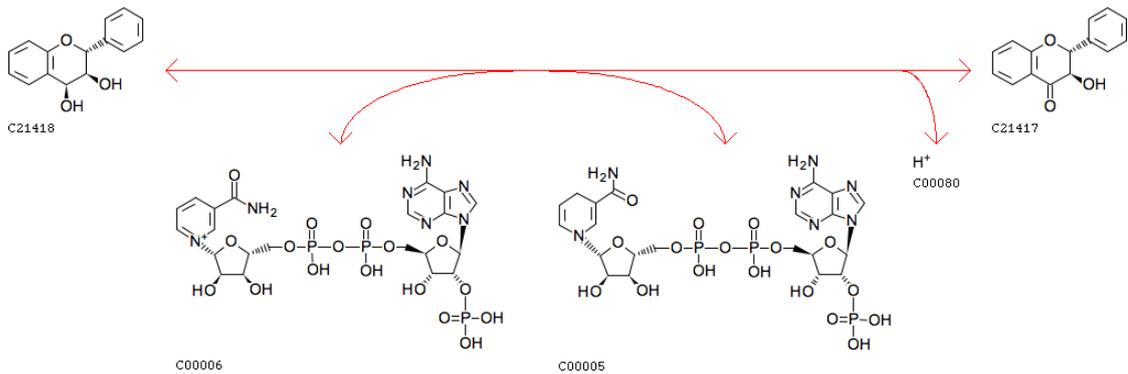
**Tabla 9-3:** Características de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa

Código de accesoión KEGG	110898892
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Nombres	Dihidroflavonol 4-reductasa Dihidroflavonol bifuncional 4 reductasa Flavanona 4-reductasa
Reacción (IUBMB)	(2R,3S,4S)-leucoantocianidina + NADP <sup>+</sup> → (2R,3R)-dihidroflavonol + NADPH <sup>+</sup> + H <sup>+</sup>
Substrato	NADP <sup>+</sup> ; (2R, 3S, 4S) -leucoantocianidina
Producto	(2R, 3R) –dihidroflavonol; NADPH; H <sup>+</sup>
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, vías metabólicas

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.6.3 Reacción de catálisis de Dihidroflavonol 4-reductasa



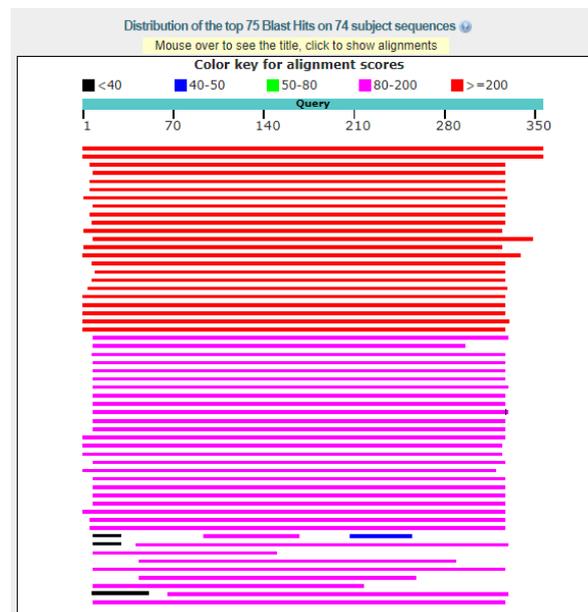
**Figura 42-3:** Reacción IUBMB de Dihidroflavonol 4-reductasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R11500,”)

Esta enzima se encuentra implicada en la biosíntesis de antocianidinas, actuando sobre el dihidrokaempferol, taxifolina y dihidromiricetina. Por acción de ésta también, cada dihidroflavonol se reduce a su determinado cis-flavan-3,4-diol. NAD<sup>+</sup> actúa en lugar de NADP<sup>+</sup> pero en menor velocidad. La dihidroflavonol 4-reductasa actúa sobre los grupos CH-OH de cada donante. (Li et al., 2012, p. 3)

### 3.6.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Dihidroflavonol 4-reductasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de dihidroflavonol 4-reductasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 43-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (355 letters),”)

En la imagen 43-3 se puede observar el porcentaje de homología con otras enzimas funcionalmente idénticas. Las dos primeras se identifican como dihidroflavonol 4-reductasa con un 100% y 99% de homología respectivamente y en el tercer caso con un 42% de homología para la secuencias de sus aminoácidos.

Sequences producing significant alignments:

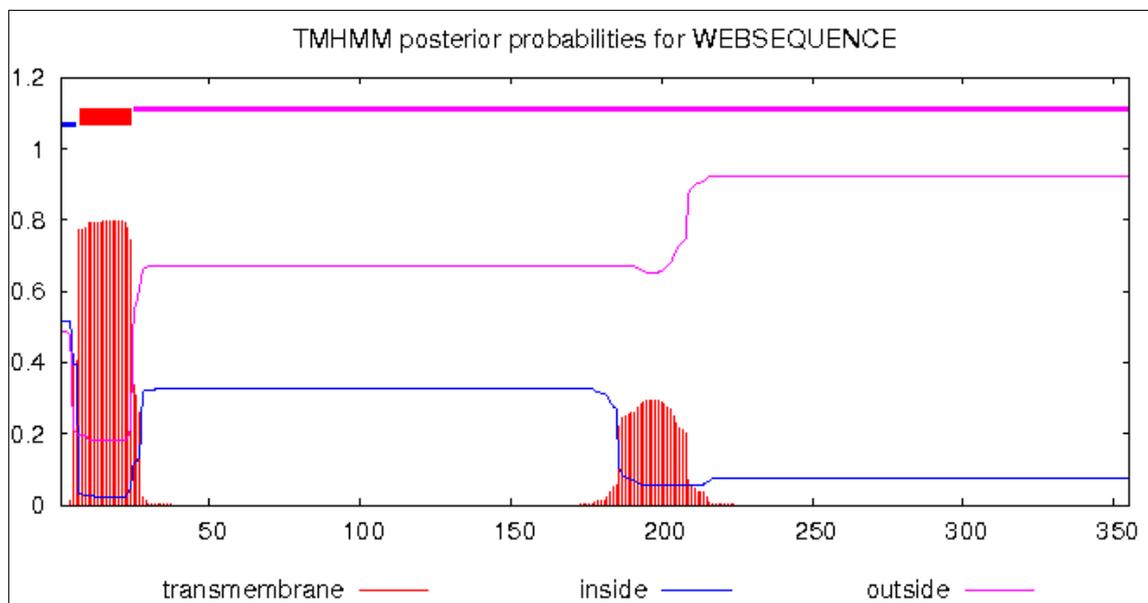
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">dihydroflavonol 4-reductase [Helianthus annuus]</a>	743	743	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_022001438.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">dihydroflavonol 4-reductase [Helianthus annuus]</a>	739	739	100%	0.0	99%	<a href="#">ABU93477.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">tetraketide alpha-pyrone reductase 1-like [Helianthus annuus]</a>	265	265	90%	2e-86	42%	<a href="#">XP_022012902.1</a>

**Figura 44-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con dihidroflavonol 4-reductasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (355 letters),” )

### 3.6.5 Hélices transmembrana de Dihidroflavonol 4-reductasa



**Figura 45-3:** Predicción de hélices transmembrana de Dihidroflavonol 4-reductasa

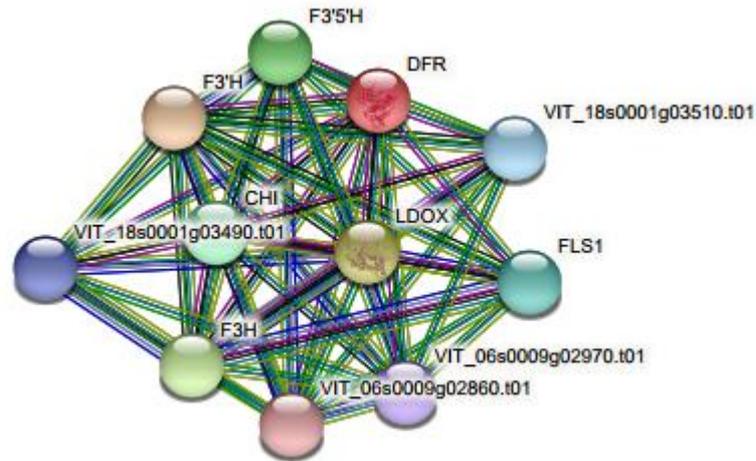
**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,” )

La figura 45-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Dihidroflavonol 4-reductasa muestran altas probabilidades de que las porciones de aminoácidos 1-25 sean un dominio transmembrana.

### 3.6.6 Redes de interacción proteína-proteína

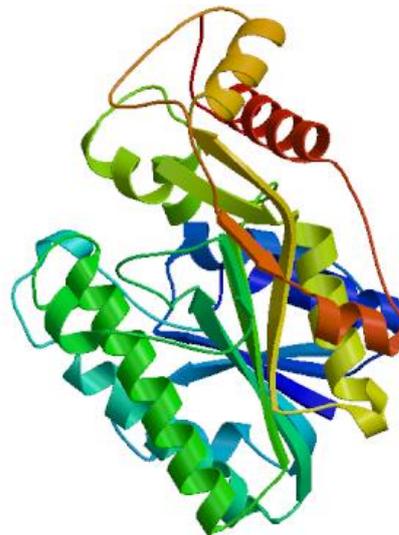
Al analizar la secuencia de aminoácidos de Dihidroflavonol 4-reductasa en la base de datos STRING, detecta interacción con proteínas funcionalmente similares de *Vitis vinifera*, pero la similitud de funciones no está detallada, ya que hasta el momento dichas proteínas no han sido caracterizadas.



**Figura 46-4:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“DFR protein (*Vitis vinifera*) - STRING interaction network,” )

### 3.6.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Dihidroflavonol 4-reductasa



**Figura 47-5:** Estructura tridimensional de Dihidroflavonol 4-reductasa

**Función:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,”)



### 3.7.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la séptima enzima, Flavonoide 3'-monooxigenasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo en la base datos KEGG.

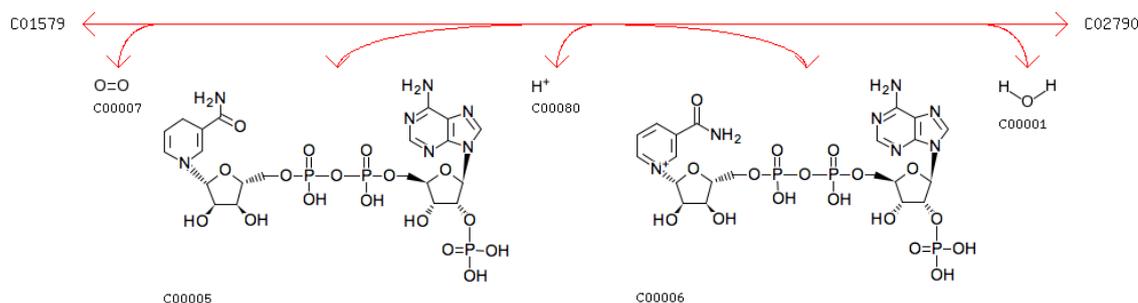
**Tabla 10-3:** Características de la enzima Flavonoide 3'-monooxigenasa

Código de accesoión KEGG	110870487
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Nombres	Flavonoide 3' monooxigenasa
Reacción (IUBMB)	Flavonoide + NADPH + H + O <sub>2</sub> → 3'-hidroxiflavonoide + NADP + H <sub>2</sub> O
Substrato	Flavonoide NADPH H <sup>+</sup> O <sub>2</sub>
Producto	3'-hidroxiflavonoide NADPH; H <sub>2</sub> O
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, vías metabólicas, biosíntesis de flavonol y flavona

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),")

### 3.7.3 Reacción de catálisis de Flavonoide 3'-monooxigenasa



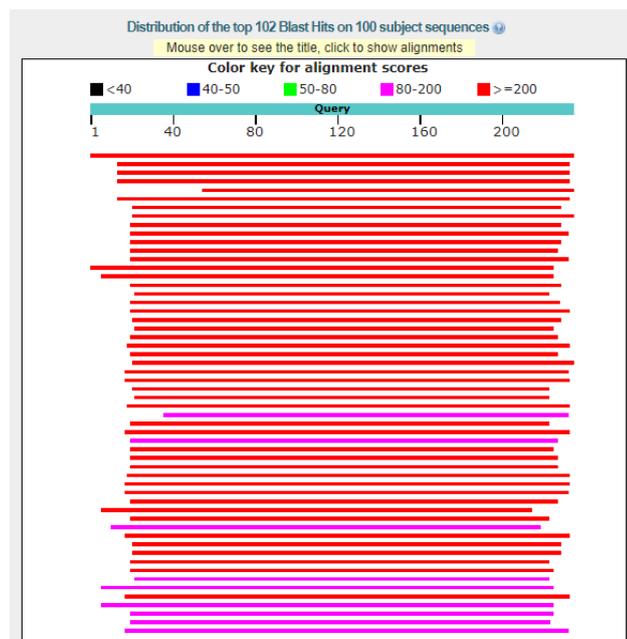
**Figura 50-3:** Reacción IUBMB de Flavonoide 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("KEGG REACTION: R03615,")

Al ser una enzima del tipo oxidoreductasa, actúa incorporando o reduciendo oxígeno molecular, utiliza a NADH o NADPH como donante; Actúa simultáneamente sobre varios flavonoides, incluidos la naringenina y el dihidrokaempferol. No actúa con 4-cumarato o con 4-cumaroil-CoA.(Y.-S. Wang et al., 2014, p. 4)

### 3.7.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Flavonoide 3'-monooxigenasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de flavonoide 3'-monooxigenasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 51-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** ("NCBI Blast:Protein Sequence (234 letters),")

En la figura 51-3 se observa un porcentaje de homología de un 100% con la enzima flavonoide 3'-monooxigenasa-like; un 87% con la enzima flavonoide 3'-monooxigenasa isoforma X1; y un 87% con la enzima putativa flavonoide 3'-monooxigenasa.

Sequences producing significant alignments:

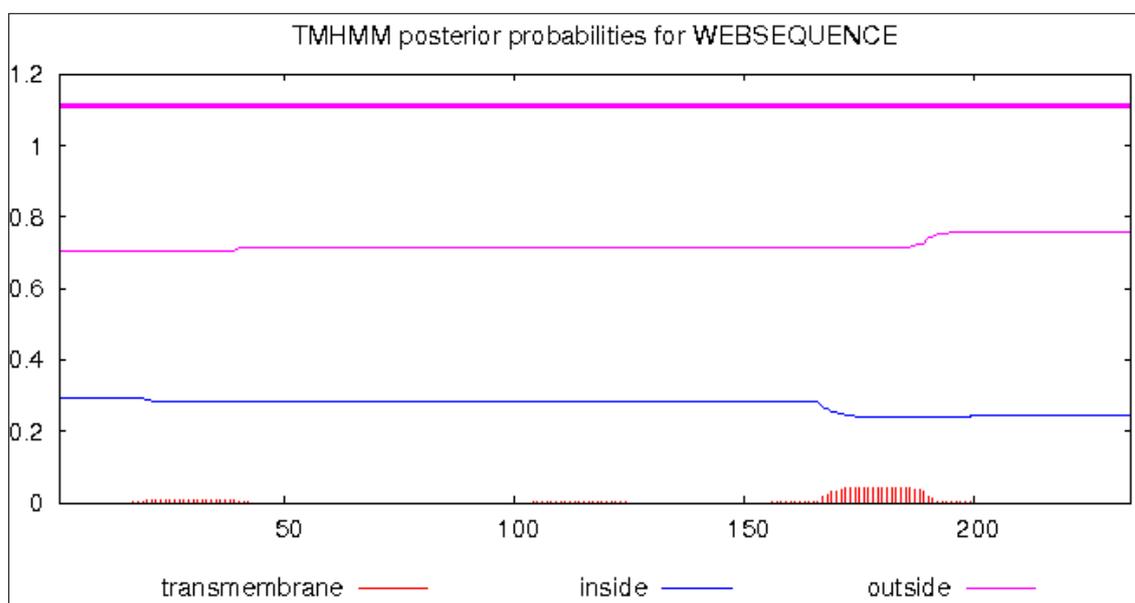
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments <span>Download</span> <span>GenPept</span> <span>Graphics</span> <span>Distance tree of results</span> <span>Multiple alignment</span>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">flavonoid 3'-monooxygenase-like [Helianthus annuus]</a>	485	485	100%	8e-177	100%	<a href="#">XP_021975356.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">flavonoid 3'-monooxygenase-like isoform X1 [Helianthus annuus]</a>	402	402	93%	7e-140	87%	<a href="#">XP_021978269.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative flavonoid 3'-monooxygenase [Helianthus annuus]</a>	402	402	93%	2e-139	87%	<a href="#">OTG19412.1</a>

**Figura 52-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Flavonoide 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("NCBI Blast:Protein Sequence (234 letters),")

### 3.7.5 Hélices transmembrana de Flavonoide 3'-monooxigenasa



**Figura 53-3:** Predicción de hélices transmembrana de Flavonoide 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("TMHMM Server, v. 2.0," n.d.)

La figura 53-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje "x" corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje "y" a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Flavonoide 3'-monooxigenasa muestran bajas probabilidades de que las porciones de aminoácidos 180-190 sean un dominio transmembrana.

### 3.7.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de Flavonoide 3'-monooxigenasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Arabidopsis thaliana*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

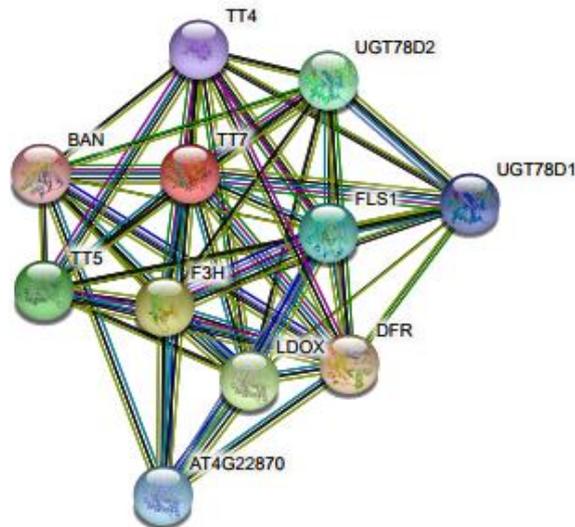
**Tabla 11-3:** Interacciones funcionales de Flavonoide 3'-monooxigenasa

Enzima	Función	Punto de confianza
DFR	Dihidroflavonol 4-reducasa (382 aa).	99.7 %
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa; cataliza la 3-beta hidroxilación de 2S-flavanonas a 2R, 3R-dihidroflavonoles que son intermedios en la biosíntesis de flavonoles, las antocianidinas, catequinas y proantocianidinas en las platas (358 aa).	99.6 %
LDOX	Dioxigenasa leucoantocianidina; Participa en la biosíntesis de protoantocianidinas, al catalizar la oxidación de leucoantocianidina en antocianidinas (356 aa).	99.1 %
TT5	TESTA TRANSPARENTE 5; Cataliza la ciclación intramolecular de chalconas bicíclicas en tricíclicas (S)-flavonona. Responsables de la isomerización de 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona en naringenina (246 aa).	98.8 %
UGT78D2	UDP-glucosil transferasa 78D2; Cataliza la glicosilación de flavonoides de glucosa en UDP. Cataliza la glicosilación de las antocianinas de glucosa en UDP. Posee alta actividad de quercetina 3-O-glucosiltransferasa in vitro (460 aa).	97.6 %
FLS1	Flavonol sintasa 1; Cataliza la formación de flavonoles a partir de dihidroflavonoles. Puede actuar sobre dihidrocampferol para producir kaempferol, también sobre dihidroquercetina para producir quercetina y sobre dihidromiricetina para producir miricetina. In vitro cataliza la oxidación de ambos enantiómeros de la naringenina para dar cis- y trans- dihidrocanferol (336 aa).	97.4 %
UGT78D1	UDP-glucosil transferasa 78D1 (453 aa).	95.5 %
TT4	Chalcona sintasa; El producto principal de esta enzima es 4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona, que pueden, bajo condiciones específicas isomerizar espontáneamente en naringenina (395 aa).	93.1 %
BAN	BANYULS; Participa en la biosíntesis de los taninos condensados. Convierte la epicatequina en cianidina como producto principal (340 aa).	91.3 %

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("TT7 protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,")

En la tabla 11-3 se muestran las proteínas con las que Flavonoide 3'-monooxigenasa establece redes de conexión según la base de datos STRING, identificando a *Arabidopsis thaliana* como socio con mayor puntuación a la asociación proteína-proteína, redes que pueden visualizarse en la imagen 54-3.

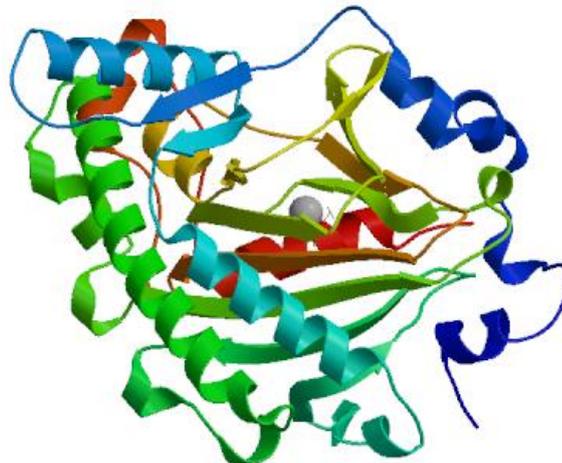


**Figura 54-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** ("TT7 protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,")

### 3.7.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Flavonoide 3'-monooxigenasa

El portal SWISS-MODEL diseña un modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de Chalcona sintasa, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.



**Figura 55-3:** Estructura tridimensional de Flavonoide 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,")

La estructura tridimensional predicha para la secuencia de aminoácidos de Flavonoide 3'-monooxigenasa corresponde a la de una proteína monomérica, cuyo peso molecular estimado es de 26091.03 M. y su punto isoeléctrico de 4.88.

### 3.7.8 Predicción de sitios de unión a ligandos

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 56-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.



**Figura 56-3:** Sitios de unión a ligandos de Flavonoide 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("Bioinformatics Web Servers - University of Reading,")

## 3.8 Enzima Leucoantocianidina dioxigenasa

### 3.8.1 Secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa

#### GenomeNet

```
>han:110935543 K05277 leucoanthocyanidin dioxygenase [EC:1.14.11.19] | (RefSeq) leucoanthocyanidin dioxygenase-like (A)
MVISANTRVESLAKSGIHQIPKEYIRPQHELTITIDIFHDENMQGQQLPTIDLNDINSN
DPKAREKCRHEIVKAASEWGMHLVNHGISGDLINRVKAAGEGFFDQPVEEKEKYSNDID
SGNRQGYGSRLATNACQGLEWQDYFFHLVFPPEEKRDLTINPSTPNIDYIHATTEYARQLRS
LVSKILTALSLGLDEGRLEKEVGGMEELLLQLKVNYPKCPPELALGVEAHTDVSAL
TFILQNMVPLQLFHNGQWVTAKCVPSLIVHIGDTIEILSNGKYKSVLHRGLVNKEKVR
ISMVAFCEPPEEKIILKPLPETVSEGEPSLFPPTFLQHMHEKLFRRKNINDSVA
```

BLAST

**Figura 57-3:** Secuencia de 335 aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa

**Fuente:** ("KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),")

### 3.8.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la octava enzima, Leucoantocianidina dioxigenasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo, en la base datos KEGG.

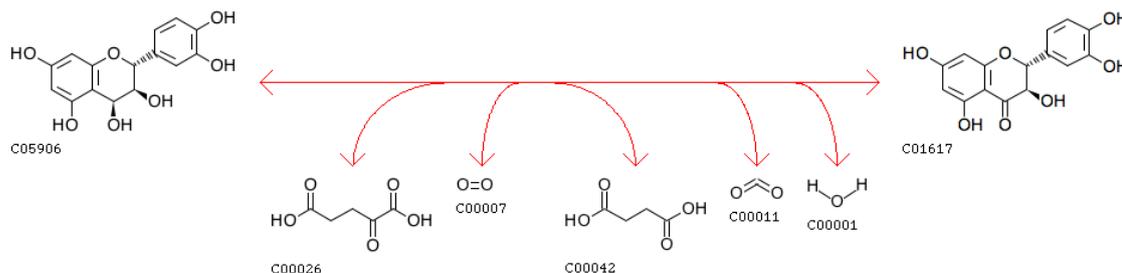
**Tabla 12-3** Características de la enzima Leucoantocianidina dioxigenasa

Código de accesoión KEGG	110935543
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Nombres	Leucoantocianidina dioxigenasa Antocianidina sintasa Leucoantocianidina oxigenasa Leucoantocianidina 2-oxoglutarato ANS
Reacción (IUBMB)	(2R, 3S, 4S) -leucoantocianidina + 2-oxoglutarato + O <sub>2</sub> → antocianidina + succinato + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O
Substrato	(2R, 3S, 4S) -leucoantocianidina 2-oxoglutarato O <sub>2</sub> (4S) - 2,3-dehidroflavan-3,4-diol
Producto	Antocianidina Succinato CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (4S) - 2,3-dehidroflavan-3,4-diol
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, vías metabólicas

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.8.3 Reacción de catálisis de leucoantocianidina dioxigenasa



**Figura 58-3:** Reacción IUBMB de Leucoantocianidina dioxigenasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R05723,”)

Un cofactor indispensable para la catálisis de la enzima es el  $\text{Fe}^{2+}$  y el ascorbato. La leucoantocianidina dioxigenasa está involucrada en la producción de los pigmentos de las flores, especialmente en la producción de antocianina glicosilada.

La enzima hidroxila al carbono C3, forma un enol C2-C3, se produce la pérdida de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  para formar la antocianidina. En ensayos realizados *in vitro* este proceso que incluye la epimerización no enzimática conduce a la formación de dihidroflavonoles, en consecuencia, cuando el sustrato de esta enzima es la leucoantocianidina los productos resultan una mezcla de (+)-taxifolina y (+)-epitaxifolina. Ésta enzima también puede inducir procesos de oxidación de la –taxifolina a quercetina. (Lotkowska et al., 2015)

### 3.8.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa



**Figura 59-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (335 letters),”)

En la imagen 59-3 se visualiza un porcentaje de homología del 100% con la primera y segunda enzima; y un 89% con la enzima leucoantocianidina dioxigenasa-like.

Sequences producing significant alignments:

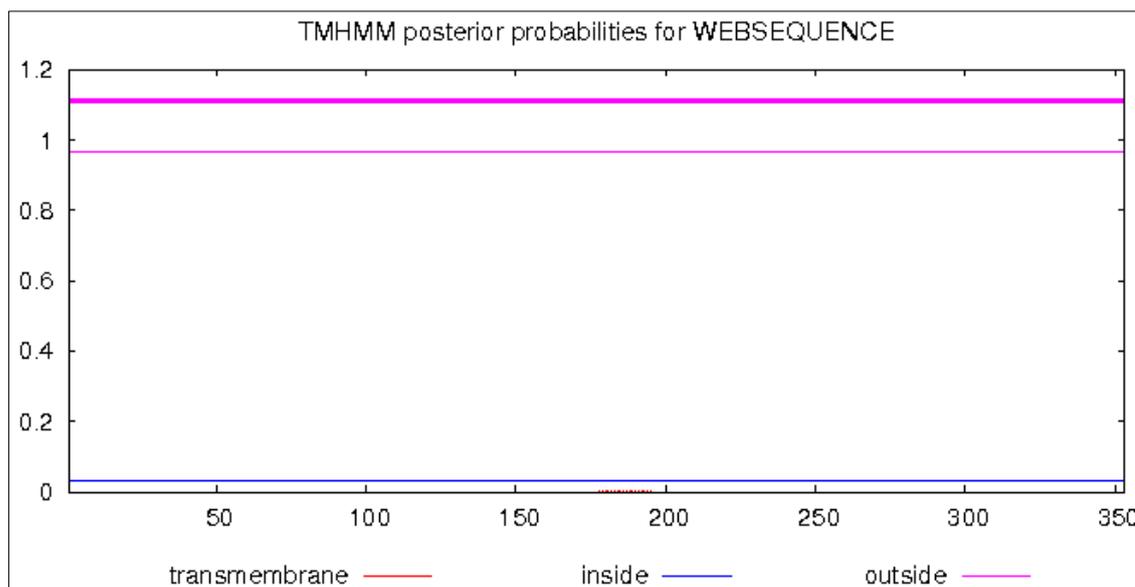
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative oxoglutarate/iron-dependent dioxxygenase [Helianthus annuus]</a>	735	735	100%	0.0	100%	<a href="#">OTG27021.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">leucoanthocyanidin dioxxygenase-like [Helianthus annuus]</a>	734	734	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_022033615.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">leucoanthocyanidin dioxxygenase-like [Helianthus annuus]</a>	655	655	99%	0.0	89%	<a href="#">XP_022033616.1</a>

**Figura 60-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Leucoantocianidina dioxigenasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (335 letters),”)

### 3.8.5 Hélices transmembrana de Leucoantocianidina dioxigenasa



**Figura 61-3:** Predicción de hélices transmembrana de Leucoantocianidina dioxigenasa

**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0.”)

La figura 61-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Leucoantocianidina dioxigenasa muestran altas probabilidades de estar en el exterior de la membrana.

### 3.1.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Arabidopsis thaliana*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

**Tabla 13-3:** Interacciones funcionales de Leucoantocianidina dioxigenasa

Enzima	Función	Puntaje de confianza
DFR	Dihidroflavonol 4-reductasa (382 aa).	99.9 %
BAN	BANYLUS; Participa en la biosíntesis de taninos condensados. Convierte la epicatequina en cianidina como producto principal (340 bis).	99.7 %

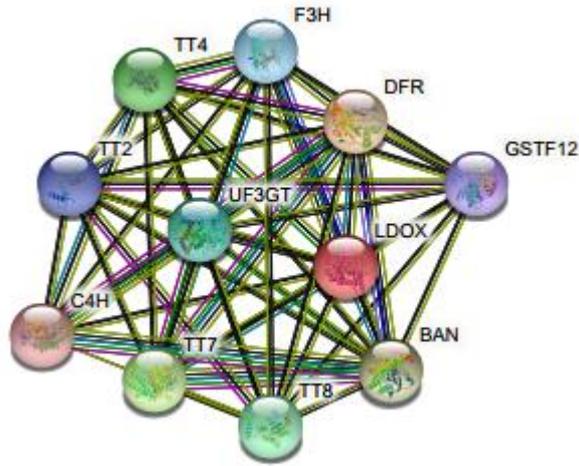
TT7	TESTA TRANSPARENTE 7; Cataliza la 3'-hidroxilación de los flavonoides del anillo B. convierte naringenina en ariodictiol y dihidrokaempferol a dihidroquercetina (513 bis).	99.1 %
TT4	Chalcona sintasa; El producto principal de esta enzima es 4,2',4',6'tetrahidroxichalcona que bajo condiciones específicas isomerizan espontáneamente en naringenina (395 aa).	97.6 %
TT8	TESTA TRANSPARENTE 8; Activador de la transcripción, cuando se asocia con MYB75/PAP1 o MYB/PAP2. Implicados en el control de la pigmentación de flavonoides. Juega un papel fundamental en la regulación de la reductasa antocianidina (BANYLUS) y dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) (518 aa).	97.6 %
UF3GT	UDP-glucosa-flavonoide 3-o-glucosiltransferasa; involucrada en los últimos pasos de la biosíntesis de antocianidinas (468 aa).	97.0 %
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa; Cataliza la 3-beta-hidroxilación de 2S-flavanona a 2R, 3R-dihidroflavonoles, los cuales son los productos intermedios en la biosíntesis de flavonoles, las antocianidinas, catequinas y protoantocianidinas en plantas (358 aa).	95.7 %
TT2	TESTA TRANSPARENTE2; Activador de la transcripción, cuando se asocia con BHLH2 / egl3 / MYC146, BHLH12 / MYC1, o BHLH42 / TT8. Involucrado en el control del metabolismo final de flavonoides, específicamente en el desarrollo de silicuas. Juega un papel clave en la determinación de la activación específica de tejidos por leucoantocianidina reductasa (BANYLUS) (258 aa).	95.4 %
GSTF12	Glutación S-transferasa phi 12; implicado en el transporte y/o acumulación de antocianidinas y protoantocianidinas (PA) en la vacuola. Su función en el citosol es mantener la acumulación regular en la vacuola de precursores PA, tales como epicatequina y epicatequina glicosilada (214 aa).	92.8 %
C4H	Cinamato-4-hidroxilasa; controla el flujo de carbono a los pigmentos esenciales para la polinización y protección de radiación UV, hacia diferentes fitoalexinas sintetizadas cuando hay ataque de patógenos contra las plantas, y a ligninas (505 aa).	91.4 %

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("LDOX protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,")

En la tabla 13-3 se visualizan las proteínas con las cuales Leucoantocianidina dioxigenasa forma redes de interacción, las cuales comparten similitud funcional y estructural, se observa la función de cada una de ellas, las cuales son similares a las descritas en la ruta metabólica de biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus*.

Las redes de interacción proteína-proteína descrita en la tabla anterior, pueden visualizarse en la imagen 62-3.

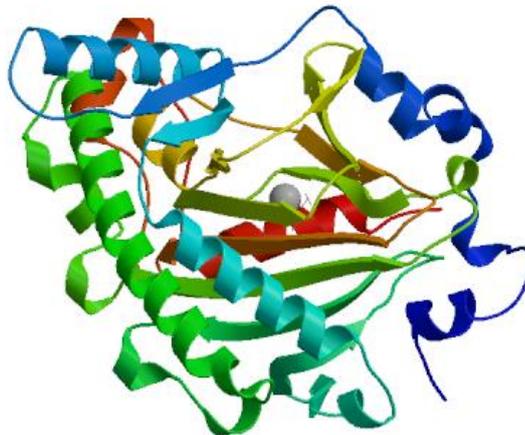


**Figura 62-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“LDOX protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,”)

### 3.8.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Leucoantocianidina dioxigenasa

El portal SWISS- MODEL diseña un modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.



**Figura 63-3:** Estructura tridimensional de Leucoantocianidina dioxigenasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,”)

La estructura tridimensional predicha para la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa corresponde a la de una proteína monomérica, cuyo peso molecular aproximado es de 39863.82 M. y su punto isoeléctrico de 5.71.

### 3.8.8 Predicción de sitios de unión a ligandos

En la figura 63-3 se puede observar que la secuencia de aminoácidos de leucoantocianidina dioxigenasa no cuenta con segmentos para la unión a ligandos.



**Figura 64-3:** Sitios de unión a ligandos de Leucoantocianidina dioxigenasa

Fuente: (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,”)

## 3.9 Enzima Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

### 3.9.1 Secuencia de aminoácidos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

#### GenomeNet

```
>han:110865504 K13065 shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase [EC:2.3.1.133] |
MRVISSFLTCGRRQLHTIVSREIIPSSPTPSNLKTYNLSSTDQFAPDAYIPMVIFYPNS
NNNFHVMKNSLSQTLTHYYPFAGRLATTTPSFVDCNDEGVEFLEAQNDKELSDFLHNMQ
HEDLDQLSPNGLVWKKLRSYFENDTASPLAVQVNQFACGGLAVAASLSHKLADGSSLCN
FFNDWAIMTRL PSTDGSPIDPQFMPSKKTCLNFQGLSLDKSRDSSVTKSFVFAGSKLNEL
KLKVITMTAESEQPIMNPTRIEVLNWLKYKCALKAATHNLLGSKPTGFI LVTNIRNKMI
EPLPKTTIGNFFKLPSPFKDLSEITLSTFVGQLKNLKVEVQGLNAAEIPPHMSLQAI LE
EQQRELDYYGCTSF CRYPFYEVDGFGWGP IKA AIPGT LKNNSFFAMDAPDGDGIEVFVS
LGKEDMEIFERDPELLSFC
```

#### BLAST

**Figura 65-3:** Secuencia de 439 aminoácidos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

Fuente: (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.9.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la novena enzima, Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo en la base datos KEGG.

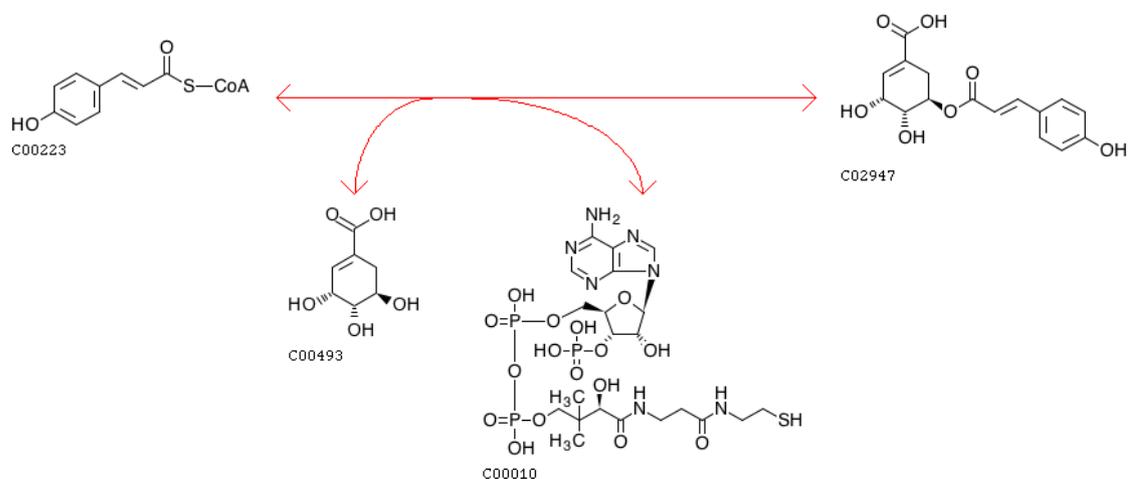
**Tabla 14-3:** Características de la enzima Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

Código de accesoión KEGG	110865504
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Transferasa Aciltransferasa
Nombres	Shikimato o-hidroxicinamoil transferasa
Reacción (IUBMB)	4-coumaroyl-CoA + shikimato → CoA + 4-cumaroilshikimato
Substrato	4-coumaroyl-CoA Shikimato
Producto	4-coumaroilshikimato CoA
Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides, vías metabólicas, biosíntesis de fenilpropanoides.

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 3.9.3 Reacción de catálisis de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

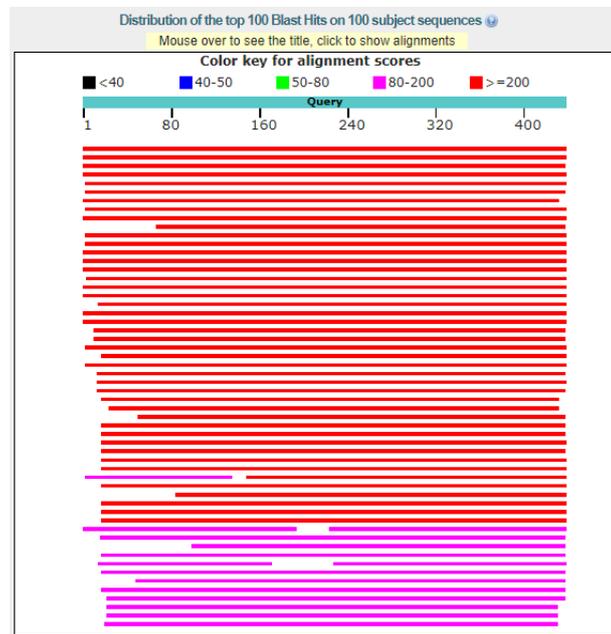


**Figura 66-3:** Reacción IUBMB de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R02416,”)

En la reacción catalizada por esta enzima, el shikimato (C00493) actúa como donante, pero en su lugar también pueden hacerlo el cafeoil-CoA, feruoil-CoA y sinapoil-CoA para dar lugar a 4-cumaroilshikimato (C02947). (Eudes et al., 2016, pp. 2–3)

### 3.9.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa



**Figura 67-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (439 letters),” )

En la figura 67-3 se observa que el porcentaje de homología compartido por esta secuencia de 439 aminoácidos es similar en un 100% en el caso de la primera enzima; y 52% en la segunda y tercera enzima denominadas acilsugar Aciltransferasa 3-like, similares en funcionalidad, pero identificadas en distintos organismo.

Sequences producing significant alignments:

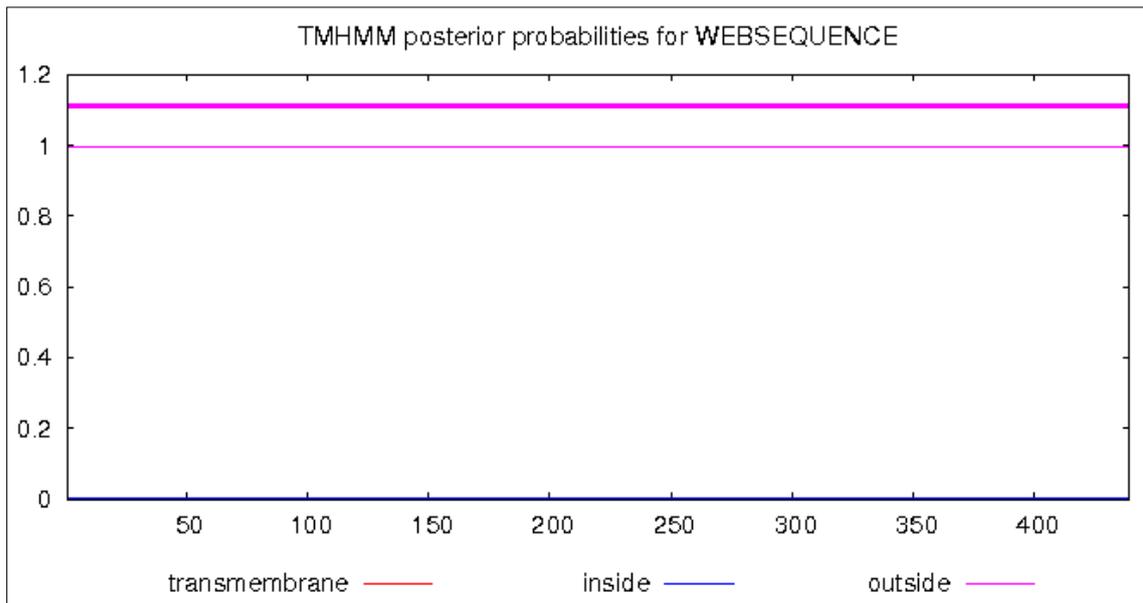
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">acylsugar acyltransferase 3-like [Helianthus annuus]</a>	911	911	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021970452.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">acylsugar acyltransferase 3-like [Helianthus annuus]</a>	457	457	100%	5e-159	52%	<a href="#">XP_021979389.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">acylsugar acyltransferase 3-like [Helianthus annuus]</a>	441	441	99%	2e-152	52%	<a href="#">XP_022033917.1</a>

**Figura 68-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (439 letters),”)

### 3.9.5 Hélices transmembrana de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa



**Figura 69-3:** Predicción de hélices transmembrana de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

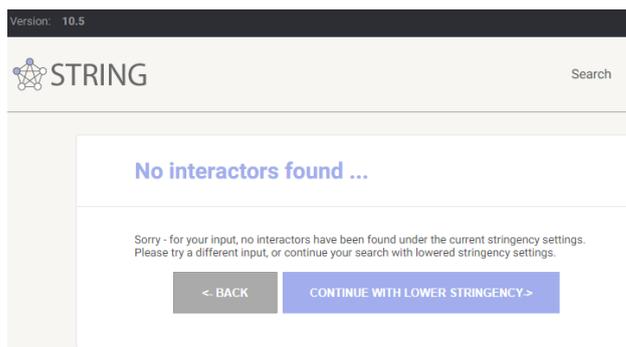
**Fuente:** ("TMHMM Server, v. 2.0,")

La figura 69-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje "x" corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje "y" a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa muestran altas probabilidades de estar en el exterior de la membrana.

### 3.9.6 Redes de interacción proteína-proteína

La enzima shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa no forma redes de interacción con otras proteínas.

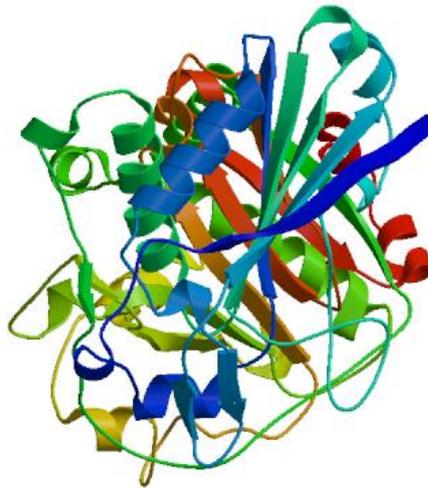


**Figura 70-3:** STRING de shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

**Fuente:** ("STRING: functional protein association networks,")

### 3.9.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

El portal SWISS- MODEL diseña un modelo tridimensional para la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina dioxigenasa, en base a la homología de ésta con otras de estructura ya conocida.



**Figura 71-3:** Estructura tridimensional de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | exJMhG |,” )

La estructura tridimensional predicha para la secuencia de aminoácidos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa corresponde a la de una proteína monomérica y su peso molecular estimado es de 49151.04 M. y su punto isoeléctrico de 5.70

### 3.9.9 Predicción de sitios de unión a ligandos

Ligand binding residues prediction for 10.-shimato   <a href="#">Help</a>
No binding residues predicted.

Model quality assessment is carried out using ModFOLDclust2:  
McGuffin, L. J. & Roche, D. B. (2010) Rapid model quality assessment for protein structure predictions using the comparison of multiple models without structural alignments. *Bioinformatics*, 26, 182-188. [PubMed](#)

**Figura 72-3:** Predicción de sitios de unión a ligandos de Shikimato o-hidroxicinamoiltransferasa

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,” )

La base de datos predeterminada para la identificación de sitios de unión a ligandos no detectó el sitio específico para la formación del complejo ligando-receptor.

### 3.10 Enzima Leucoantocianidina reductasa

#### 3.10.1 Secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina reductasa

```
GenomeNet  
>han:110917901 K13081 leucoanthocyanidin reductase [EC:1.17.1.3] | (RefSeq)  
MVATPSTERTSHVLIIGASGFMGHFIAQASLDSGQTTYVLTRSSALSSSKIKALHDNGA  
IILHRFLPSEFGHDVDRADPVEPGLSMYKEKRRVRQLVEESGIPYTYICCNISIASWPYHD  
NIHPSDALPPLDHFDIYGDGSIKAYFVAGSDIGKFTMKTINDTRTVNKVVHFRPLVNHNLN  
INELACLWEKKIQRTLPRRIVSESDLLKAASENIIPQSIVAFAFTHDIFFRGCQTFFSVSG  
TKDVEIGDLYPDECFRTMDECFEFLMKLKEKPVEGS
```

BLAST

**Figura 73-3:** Secuencia de 277 aminoácidos Leucoantocianidina reductasa

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

#### 3.10.2 Interpretación biológica de la enzima

Al analizar la información correspondiente a la enzima Leucoantocianidina dioxigenasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo, en la base datos KEGG.

**Tabla 15-3:** Características de la enzima Leucoantocianidina reductasa

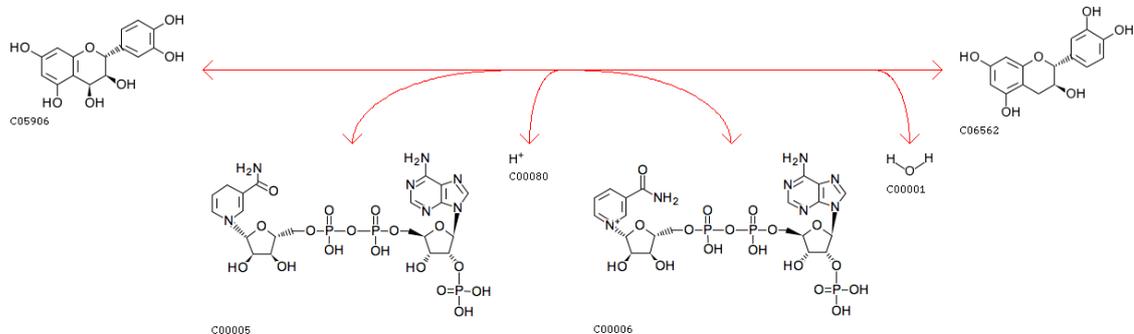
Código de accesoión KEGG	110917901
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Nombres	Leucoantocianidina reductasa Leucocianidina reductasa
Reacción (IUBMB)	(2R, 3S) -catequina + NADP <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O → 2,3-trans-3,4-cis-leucocianidina + NADPH <sup>+</sup> + H <sup>+</sup>
Substrato	(2R, 3S) –catequina NADP <sup>+</sup> H <sub>2</sub> O
Producto	4-coumaroilshikimato CoA

Ruta metabólica	Biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de flavonoides
-----------------	--

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza. 2018

**Fuente:** (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.10.3 Reacción de catálisis de Leucoantocianidina reductasa



**Figura 74-3:** Reacción IUBMB de Leucoantocianidina reductasa

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R06532,”)

La enzima leucoantocianidina reductasa cataliza la biosíntesis de catequina, leucoantocianidina, flavan-3-oles (flavanoles) y galocatequinas, los cuales a su vez son monómeros iniciadores de la biosíntesis de proantocianidinas poliméricas vegetales o llamados también taninos condensados. (Nemesio-Gorriz et al., 2016, p. 3) La enzima actúa sobre grupos CH o CH<sub>2</sub> con NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como aceptor pero la reacción de oxidación se lleva a cabo más lentamente. (Zhou et al., 2015, pp. 5–6)

### 3.10.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina reductasa



**Figura 75-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (277 letters),”)

En la figura 76-3 se observa el porcentaje de homología de la secuencia de 277 aminoácidos de Leucoantocianidina reductasa con otras enzimas homólogas.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

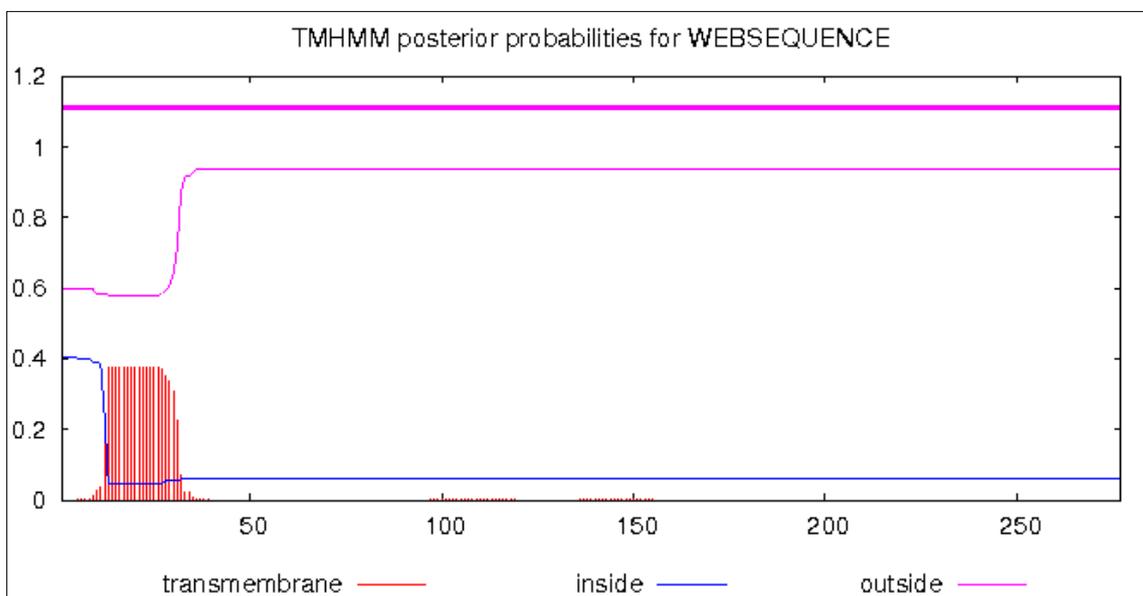
[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">leucoanthocyanidin reductase-like isoform X1 [Helianthus annuus]</a>	578	578	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_022018037.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">leucoanthocyanidin reductase-like isoform X2 [Helianthus annuus]</a>	558	558	100%	0.0	85%	<a href="#">XP_022018044.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">isoflavone reductase-like protein [Helianthus annuus]</a>	180	180	92%	1e-54	34%	<a href="#">XP_022028376.1</a>

**Figura 76-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Leucoantocianidina reductasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (277 letters),”)

### 3.10.5 Hélices transmembrana de Leucoantocianidina reductasa



**Figura 77-3:** Predicción de hélices transmembrana de Leucoantocianidina reductasa

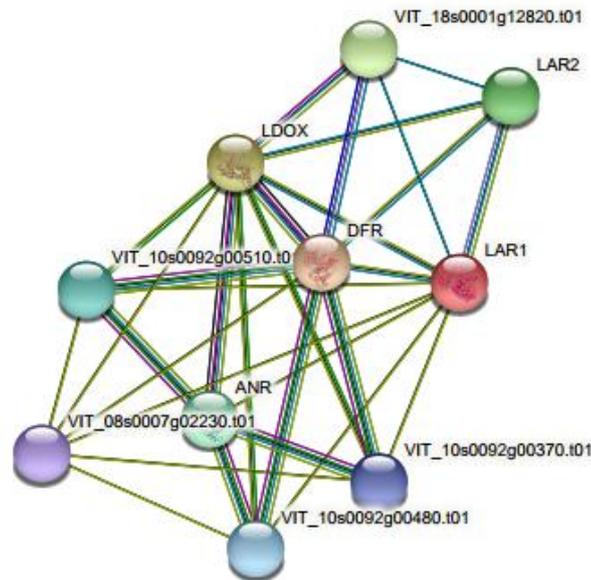
**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

La figura 77-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Leucoantocianidina reductasa muestran altas probabilidades de estar en el exterior de la membrana, con una porción específica de aminoácidos 20-40 de pertenecer a un dominio transmembrana.

### 3.10.6 Redes de interacción proteína-proteína

Al analizar la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina reductasa en la base de datos STRING, detecta interacción con proteínas funcionalmente similares de *Vitis vinifera*, pero la similitud de funciones no está detallada, ya que hasta el momento dichas proteínas no han sido caracterizadas.

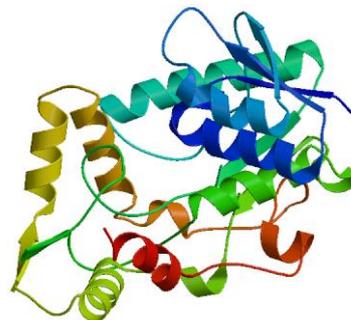


**Figura 78-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“LAR1 protein (*Vitis vinifera*) - STRING interaction network,”)

### 3.10.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Leucoantocianidina reductasa

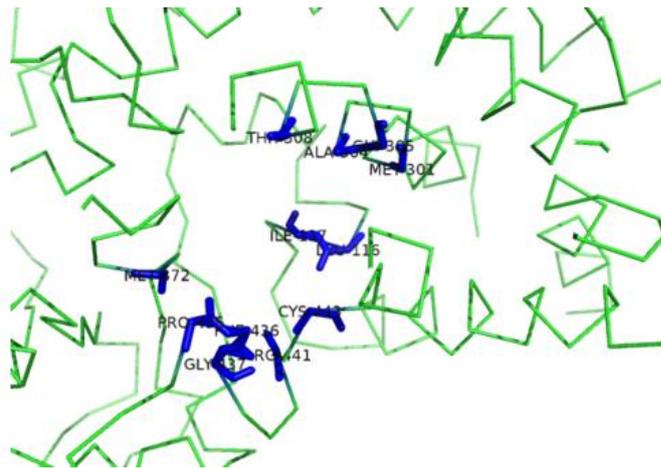
La estructura tridimensional propuesta para la secuencia de aminoácidos de Leucoantocianidina reductasa corresponde a una proteína monomérica, cuyo peso molecular estimado es de 31050.36M. y su punto isoeléctrico de 5.99.



**Figura 79-3:** Estructura tridimensional de Leucoantocianidina reductasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | exJMhG |,”)

### 3.10.8 Predicción de sitios de unión a ligandos



**Figura 80-3:** Sitios de unión a ligandos de Leucoantocianidina reductasa

Fuente: (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading.”)

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 80-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.

## 3.11 Enzima Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

### 3.11.1 Secuencia de aminoácidos Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

#### GenomeNet

```
>han:110865896 K09754 coumaroylquininate(coumaroylshikimate) 3'-monooxygenase [EC:1.14.13.36] |
MAAPLLLAIAIITPIIFYLLQSLYTRLRFKLPGRPLPIVGNLYDVKPKFRCYAEW
ARTYGPVIFSVYLDKLNIVNTSELAKEVLKENDQQQLADRHRNRATMSFSRGGKDLIAD
YGPYVYKVRKVCNLELFSKRLALRPIREDEVTAMVESIFKDSGLPDTREKGLVMRGYL
GSVAFNNITRLTFGKRFVNSEGGMDEQGKEFKGIVSNGIRIGGKVFMAENIPWLRFLTG
ENDILLKHEQRRDRLTKAIMAEHDLARKKNGAQEHFIDALHTLQKQYDLSDDTIIGLLWD
MITAGMDTTSISAEWAMAELVKNPRVQKKAQEELDRVVGTDRISETDISKLPYLQSIK
EALRLHPPTPLMLPHKANSNVKLGGYDVPKGGIVHVVWMAIARDPAIWKNPDEFRPERFF
EEDVDVKGHDFRLLPFGAGRRVCPGAQLAINLVTSMGLHLLHFFEWTPPAGVKPEEVDLT
ENPGMVTYMKNP LQAVATPRLPNPLYKRVPV
```

BLAST

**Figura 81-3:** Secuencia de 511 aminoácidos Leucoantocianidina dioxigenasa

Fuente: (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),”)

### 3.11.2 Interpretación biológica de enzima

Al analizar la información correspondiente a Leucoantocianidina dioxigenasa se encontró características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo, en la base datos KEGG.

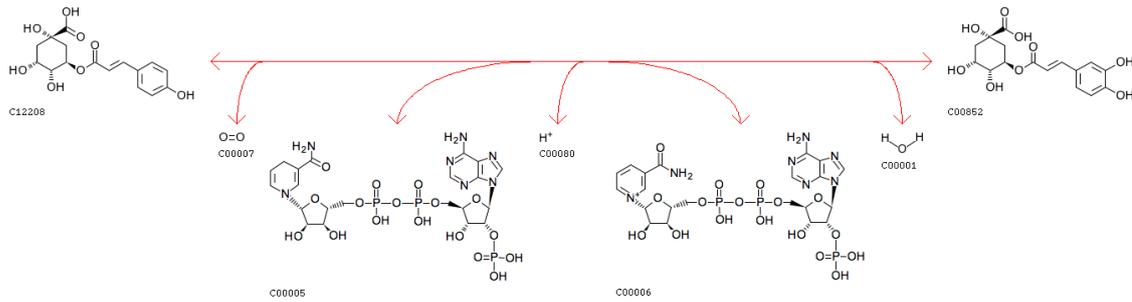
**Tabla 16-3:** Características de la enzima Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

Código de accesoión KEGG	110865896
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Oxidoreductasa
Nombres	Citocromo P450 98 <sup>a</sup> 3 Cumaril shikimato 3'monooxigenasa 5-o-(4-cumaril)-D-quinato 3'-monooxygenase 5-o-(4-cumaril)-D-quinato/shikimato 3'-hidroxilasa
Reacción (IUBMB)	trans-5-o-(4-cumaril)-D-quinato + NADPH <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> + O <sub>2</sub> → cafeoil-D-quinato + NADP <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O
Substrato	Trans-5-o-(4-cumaril)-D-quinato NADPH H <sup>+</sup> O <sub>2</sub>
Producto	Trans-5-o-cafeoil-D-quinato NADP <sup>+</sup> H <sub>2</sub> O
Ruta metabólica	Biosíntesis de fenilpropanoides Biosíntesis de flavonoides Biosíntesis de estilbenoides, diarilheptanoides, gingeroles Biosíntesis de metabolitos secundarios Vías metabólicas

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** ("KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),")

### 3.11.3 Reacción de catálisis de *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*



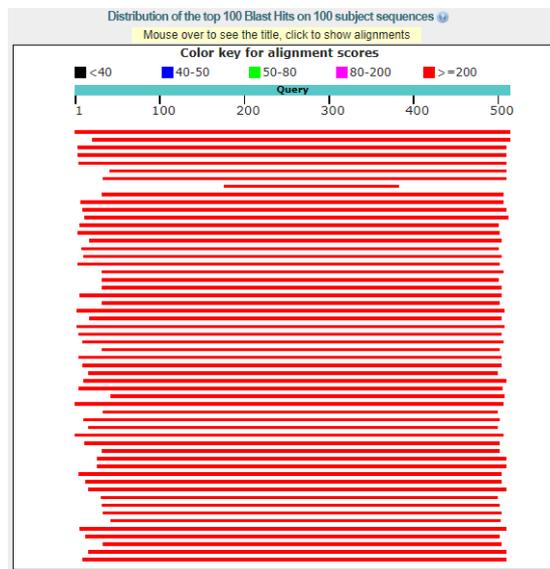
**Figura 82-3:** Reacción IUBMB de *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*

**Fuente:** (“KEGG REACTION: R04342,”)

La enzima *cumaril shikimato 3'-monooxigenasa* cataliza la reacción de formación del ácido clorogénico (C00852) el cual es un intermediario en la biosíntesis de la lignina. El NADPH (C00006) actúa como donante en la reacción. (Cheng et al., 2013, p. 2)

### 3.11.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 83-3:** Nivel de homología de la secuencia

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (511 letters),”)

En la figura 84-3 se observa el porcentaje de homología de la secuencia de 511 aminoácidos de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa con otras enzimas homólogas.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

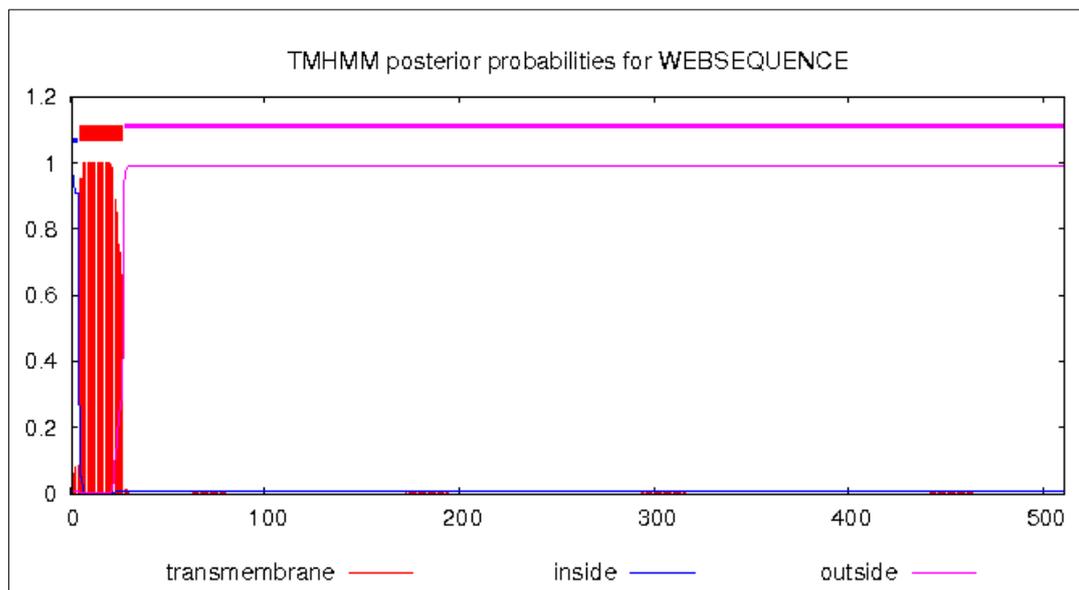
Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> cytochrome P450 98A3-like [Helianthus annuus]	1055	1055	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021970929.1</a>
<input type="checkbox"/> cytochrome P450 98A2-like [Helianthus annuus]	796	796	96%	0.0	75%	<a href="#">XP_021998815.1</a>
<input type="checkbox"/> flavonoid 3'-monooxygenase-like isoform X1 [Helianthus annuus]	328	328	98%	2e-106	37%	<a href="#">XP_021978269.1</a>

**Figura 84-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("NCBI Blast:Protein Sequence (511 letters),")

### 3.11.5 Hélices transmembrana de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa



**Figura 85-3:** Predicción de hélices transmembrana de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

**Fuente:** ("TMHMM Server, v. 2.0,")

La figura 85-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje "x" corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje "y" a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa muestran altas probabilidades de estar en el exterior de la membrana, con una porción específica de aminoácidos 1-20 de pertenecer a un dominio transmembrana.

### 3.11.6 Redes de interacción proteína-proteína

Según el STRING a la secuencia de aminoácidos de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa interactúa dinámicamente con varias enzimas de la especie *Arabidopsis thaliana*, pueden formar conexiones funcionales ya que catalizan reacciones de una misma ruta metabólica.

**Tabla 17-3:** Interacciones funcionales de Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa

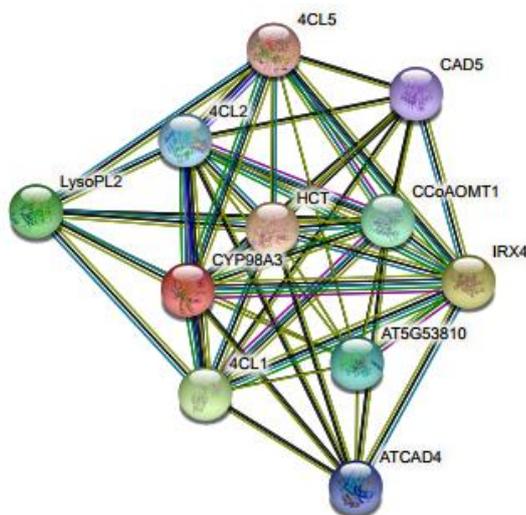
Enzima	Función	Puntaje de confianza
HCT	Hidroxicinamoil-CoA shikimato / quinato hidroxicinamoil transferasa; Aciltransferasa implicada en la biosíntesis de la lignina. Acepta Cafeoil-CoA y p-cumaroil-CoA como sustrato y transfiere acilo en ambos aceptores shikimato y quinato (433 aa).	99.7 %
IRX4	Cinamoil CoA reductasa 1; interviene en las últimas etapas de la biosíntesis de lignina. Cataliza una de las etapas de la biosíntesis de monolignol, la conversión de Cinamoil-CoA en sus cinamaldehídos correspondientes. (344 aa).	95.0 %
4Cl1	4-cumarato-CoA ligasa 1; produce tioésteres CoA de una variedad de ácido cinámicos hidroxí y metoxi-sustituido, que se utilizan para sintetizar varios compuestos fenilpropanoides derivados, incluyendo antocianinas, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, lignina, suberina y tiene compuestos fenólicos unidos a la pared. (561aa).	94.0 %
LysoPL2	Lisofosfolipasa 2; esterasa implicada en la biosíntesis de lignina. Cafeoilshikimato mediante hidrólisis da lugar a shikimato y cafeico. Junto con 4-cumarato-CoS ligasa (4CL), actúa sobre una reacción alternativa para la formación de cafeoil-CoA y no pasa por la segunda reacción de shikimat O-hidroxixinamoiltransferasa (HST). También acepta 4-cumaroilshikimato como sustrato, pero con una menor actividad. (332 aa)	92.5 %
CCoAOMT1	Cafeoil CoA O-metiltransferasa 1; metila Cafeoil a feruoil-CoA. Tiene una actividad muy baja con ácido cafeico y esculetina. Implicados en la biosíntesis de escopoletina en las raíces de las plantas. (259 aa).	80.4 %
AT5G52810	Familia de las O-metiltransferasas (378 aa).	80.3 %
4Cl2	4-cumarato-CoA ligasa; Produce tioésteres CoA de una variedad de ácidos cinámicos hidroxí y metoxi sustituidos. Que se usan para sintetizar compuestos derivados del fenilpropanoide, incluyendo antocianinas, flavonoides,	77.7 %

	isoflavonoidea, cumarinas, lignina, suberina y con compuestos fenólicos unidos a la pared (556 aa).	
ATCAD4	Cinamil alcohol deshidrogenasa 4; implicada en la biosíntesis de lignina en el tallo floral. Cataliza el paso final en la producción de monómeros de lignina. Cataliza la reducción dependiente de NADPH de coniferaldehídos, 5-hidroxiconiferalheído, sinapaldehído, en sus respectivos alcoholes. (365 aa)	73.1 %
CAD5	Cinamoil alcohol deshidrogenasa 5; implicada en la biosíntesis de lignina en el tallo floral. Cataliza el paso final en la producción de monómeros de lignina. Cataliza la reducción dependiente de NADPH de coniferaldehídos, 5-hidroxiconiferalheído, sinapaldehído, en sus respectivos alcoholes. (357 aa)	69.3 %
4CL5	4-cumarato-CoA ligasa; Produce tioésteres CoA de una variedad de ácidos cinámicos hidroxí y metoxi sustituidos. Que se usan para sintetizar compuestos derivados del fenilpropanoide, incluyendo antocianinas, flavonoides, isoflavonoidea, cumarinas, lignina, suberina y con compuestos fenólicos unidos a la pared (570 aa).	69.2 %

**Realizado por:** Jesenia Tipanquiza.2018

**Fuente:** (“CYP98A3 protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,”)

Las redes de interacción proteína-proteína detalladas en la tabla anterior, pueden visualizarse en la imagen 86-3.

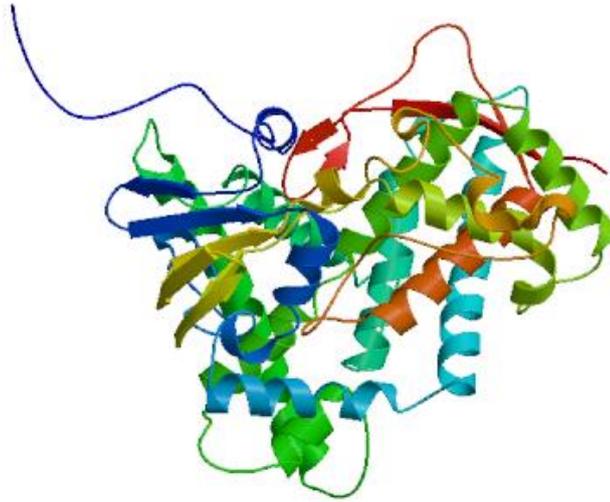


**Figura 86-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“CYP98A3 protein (*Arabidopsis thaliana*) - STRING interaction network,”)

### 3.11.7 Modelo estructural tridimensional predicho para *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*

El modelo tridimensional propuesto para la secuencia de aminoácidos de *cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*, corresponde a la de una proteína monomérica, su peso molecular estimado es de 57825.00 M. y su punto isoeléctrico es de 0.09.

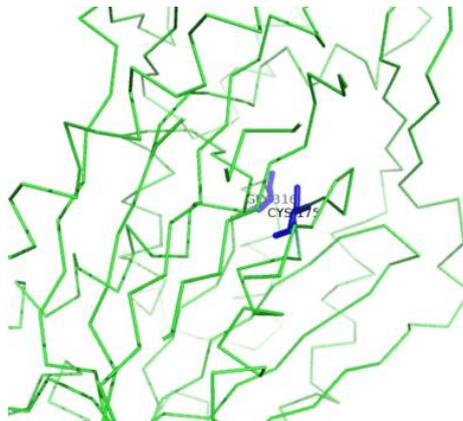


**Figura 87-3:** Estructural tridimensional  
Cumaril shikimato 3' monooxigenasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | fFt6gP |,” )

### 3.11.8 Predicción de sitios de unión a ligandos

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 88-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.



**Figura 88-3:** Sitios de unión a ligandos de *Cumaril shikimato 3'-monooxigenasa*

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,” )

### 3.12 Enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa

#### 3.12.1 Secuencia de aminoácidos de cafeoil-CoA-metiltransferasa

## GenomeNet

```
>han:110866189 K00588 caffeoyl-CoA O-methyltransferase [EC:2.1.1.104] | (RefSeq)
MAAATGETQPAKHQEVGHKSLQSDALYQYILETSVYPREPQPMKELREVTAKHPWNLMT
TSADEGQFLNLLKLNKNTMEIGVYTGYSLLSTALALPEDGKILALDINRENYEIGLP
IIEKAGVAHKIDFREGPALPLLDQMVEDEKCHGSFDFIFVDADKDNYLNYHKRLIDLVKI
GGVIGYDNTLWNGSLVAPPDAPLRKYVRYRDFVLELNKALAVDPVEICQLPVGDGITL
CRRIS
```

### BLAST

#### Figura 89-3: Secuencia de 245 aminoácidos Cafeoil-CoA-metiltransferasa

Fuente: (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

#### 3.12.2 Interpretación biológica de enzima

Al analizar la información correspondiente a la enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa, se encontraron características que fueron reconocidas como similares, con otras enzimas de su tipo existentes en la base de datos KEGG.

**Tabla 18-3:** Características de la enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa.

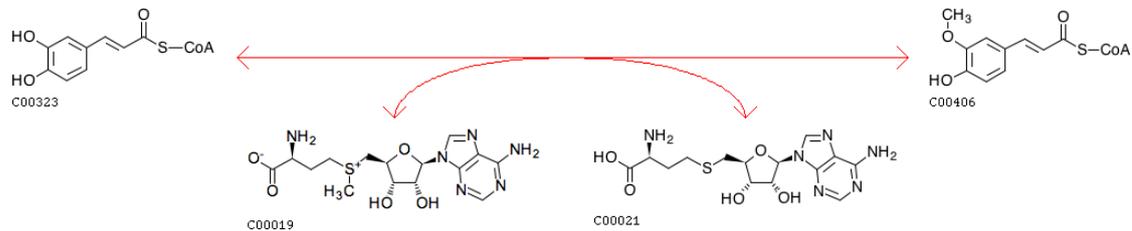
Código de accesoión KEGG	110866189
Organismo	<i>Helianthus annuus</i>
Clase	Transferasa Metiltrasferasa
Nombres	Cafeoil-CoA O-metiltransferasa Cafeoil coenzima A metiltransferasa Cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa Trans-Cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa
Reacción (IUBMB)	S-adenosil-L-metionina + Cafeoil-CoA → S-adenosil-L-homocisteina + feruloil-CoA
Substrato	S-adenosil-L-metionina Cafeoil-CoA
Producto	S-adenosil-L-homocisteina feruloil-CoA

Ruta metabólica	Metabolismo de la fenilalanina Biosíntesis de fenilpropanoides Biosíntesis de flavonoides Biosíntesis de estilbenoides, diarilheptanoides, gingeroles Biosíntesis de otros metabolitos secundarios
-----------------	--

Realizado por: Jesenia Tipanquiza. 2018

Fuente: (“KEGG PATHWAY: Flavonoid biosynthesis - *Helianthus annuus* (common sunflower),” )

### 3.12.3 Reacción de catálisis de Cafeoil-CoA-metiltransferasa.



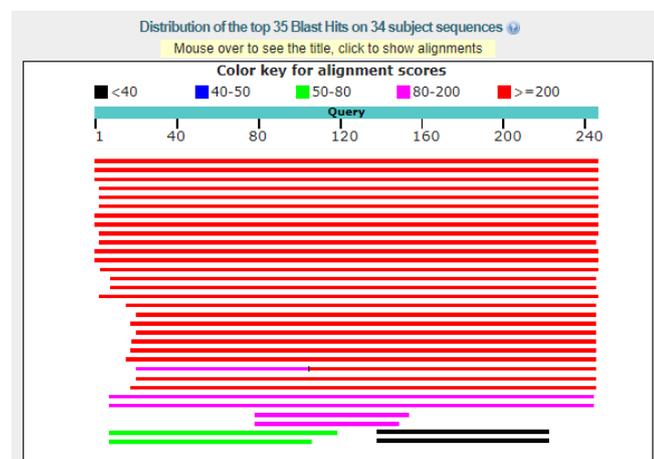
**Figura 90-3:** Reacción IUBMB de Cafeoil-CoA-metiltransferasa

Fuente: (“KEGG REACTION: R01942,”)

Para llevar a cabo la reacción descrita en figura 90-3 se requiere de la presencia de Fe<sup>2+</sup> como cofactor. La enzima Cafeoil-CoA-metiltransferasa transfiere grupos metilo de un carbono a otro, así como también permite la incorporación de fermentos del tipo monolignol para la obtención de lignina en plantas superiores. (Schmid et al., 2014, p. 7)

### 3.12.4 Alineamiento tipo local de la secuencia de aminoácidos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa

Tras la alineación de la secuencia de aminoácidos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa, con las disponibles en la base de datos BLAST protein-protein se arrojaron los siguientes resultados:



**Figura 91-3:** Nivel de homología de la secuencia

Fuente: (“NCBI Blast:Protein Sequence (245 letters),” )

En la figura 92-3 se observa el porcentaje de homología de la secuencia de 245 aminoácidos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa con otras enzimas homólogas.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

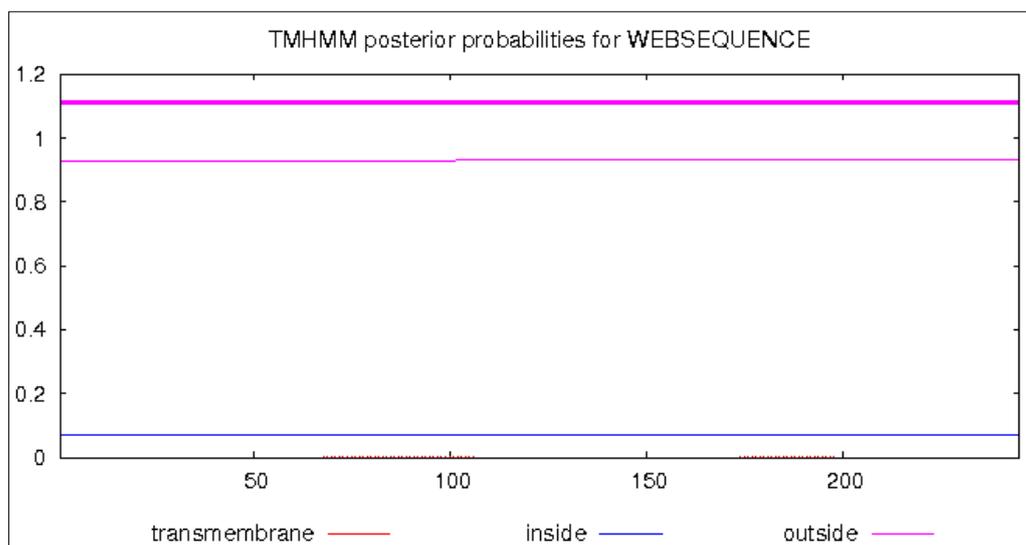
Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">caffeoyl-CoA O-methyltransferase [Helianthus annuus]</a>	506	506	100%	0.0	100%	<a href="#">XP_021971163.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like [Helianthus annuus]</a>	505	505	100%	0.0	99%	<a href="#">XP_022010257.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like [Helianthus annuus]</a>	504	504	100%	0.0	99%	<a href="#">XP_022026045.1</a>

**Figura 92-3:** Enzimas con alto porcentaje de homología con Cafeoil-CoA-metiltransferasa

**Fuente:** (“NCBI Blast:Protein Sequence (245 letters),”)

### 3.12.5 Hélices transmembrana de Cafeoil-CoA-metiltransferasa



**Figura 93-3:** Predicción de hélices transmembrana de Cafeoil-CoA-metiltransferasa

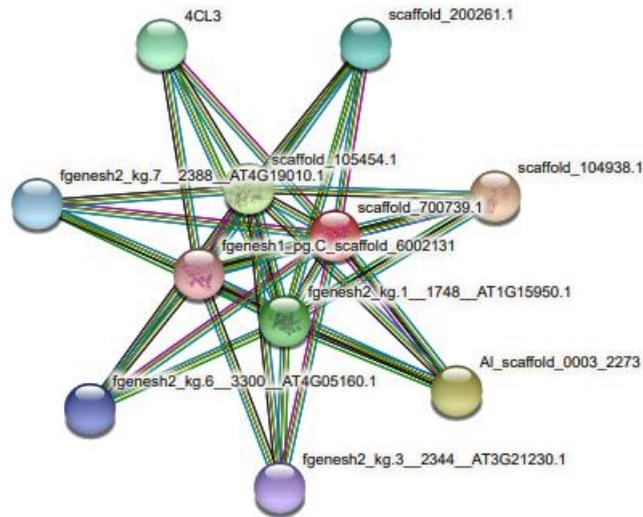
**Fuente:** (“TMHMM Server, v. 2.0,”)

La figura 93-3 muestra la probabilidad de que fragmento de la secuencia, pertenezca al hélice transmembrana (línea roja), exterior (línea violeta) o interior (azul); en el eje “x” corresponde a la secuencia de aminoácidos, el eje “y” a la probabilidad.

Los residuos de hélice transmembrana de Cafeoil-CoA-metiltransferasa muestran altas probabilidades de estar en el exterior de la membrana.

### 3.12.6 Redes de interacción proteína-proteína

Al analizar la secuencia de aminoácidos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa en la base de datos STRING, detecta interacción con proteínas funcionalmente similares de *Arabidopsis lyrata*, pero la similitud de funciones no está detallada, ya que hasta el momento dichas proteínas no han sido caracterizadas.



**Figura 94-3:** Socios de interacción con puntuación más alta.

**Fuente:** (“scaffold\_700739.1 protein (*Arabidopsis lyrata*) - STRING interaction network,”)

### 3.12.7 Modelo estructural tridimensional predicho para Cafeoil-CoA-metiltransferasa

El modelo tridimensional propuesto para la secuencia de aminoácidos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa, corresponde a la de una proteína monomérica, su peso molecular estimado es de 27529.63 M. y su punto isoeléctrico es de 5.30

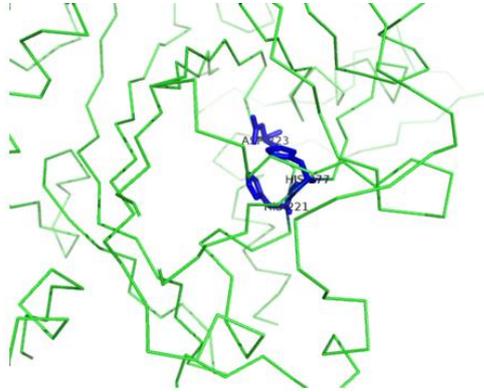


**Figura 95-3:** Estructura tridimensional de Cafeoil-CoA-metiltransferasa

**Fuente:** (“SWISS-MODEL | Workspace | Models | exJMhG |,”)

### 3.12.8 Predicción de sitios de unión a ligandos

Los segmentos específicos de la estructura para la formación del complejo ligando receptor, se puede observar en la figura 96-3 los cuales determinan la afinidad y selectividad para las interacciones.



**Figura 96-3:** Sitios de unión a ligandos de Cafeoil-CoA-metiltransferasa

**Fuente:** (“Bioinformatics Web Servers - University of Reading,”)

### 3.13 Factores de regulación de la biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus*.

Los mecanismos de regulación de la ruta biosintética de los flavonoides ya sido descrito en varias especies durante los últimos años; en el caso de *Helianthus annuus* no se ha estudiado esta mecánica, pero el análisis genético de esta especie ha servido para el conocimiento del proceso evolutivo que sufren los genes con el paso de los años y los procesos de adaptación.

La identificación *in silico* de las enzimas que participan en el proceso de biosíntesis de flavonoides determinó las especies con las que *Helianthus annuus* exhibe una estrecha relación genética; sus interacciones físicas y asociaciones funcionales anteriormente detalladas lo ratifican.

La descripción de la mecánica de regulación de los procesos de biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus* se basó en las similitudes de ésta con *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis lyrata*, las cuales los procesos de regulación han sido estudiados experimentalmente bajo técnicas de Biología Molecular.

La característica de diversidad y facilidad de tratamiento de los flavonoides, los constituyen como el mejor modelo para una amplia variedad de análisis tipo genéticos, epigenéticos y descripción de procesos evolutivos. (Xu et al., 2015, p. 176)

Los flavonoides son uno de los grupos de metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en la naturaleza, van desde los espermatofitos hasta los musgos. Su estructura, diversidad y capacidad antioxidante permiten desempeñar roles fisiológicos importantes en la interacción de las plantas con los ambientes abióticos y bióticos. (Grotewold, 2006, p. 23)

### ***3.13.1 Regulación transcripcional de la biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus****

La regulación de la vía se rige por 6 genes que codifican la regulación transcripcional, TT2 (MYB123), TT8 (bHLH042), TTG1 (familia WDR), TT16 (ABS/AGL32, ), TT1 (WIP1/Zn) y TTG2 (DSL1/ WRKY44); éstos forman el llamado complejo MBW. (Xu et al., 2015, p. 179)

El MYB-TT16 es un complejo activo localizado en el endotelio de la célula productora de flavonoides, regula la actividad de la enzima DFR (Di-hidro flavonol-reductasa) y LDOX (Leucoantocianidina-dioxigenasa), evitando la hiperproducción de flavonoides, especialmente flavonoles. (Yan et al., 2015, p. 14)

La regulación de la biosíntesis de antocianidinas se lleva a cabo por el complejo MYB5, en tejidos vegetales que involucran la producción de pigmentos, es decir antocianidinas. A altas temperaturas y poca luz, se produce una acumulación de antocianidinas en las hojas como respuesta a este estrés. (Pandey et al., 2015, p. 15)

La sacarosa actúa como inductor de genes que producen hiperproducción de flavonoides del tipo antocianidinas, y como mecanismo de restricción la planta genera etileno, mediante la supresión del complejo TT8. (Xu et al., 2015)

### ***3.13.2 Regulación fisiológica de la biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus****

La síntesis de flavonoides en respuesta a fluctuaciones ambientales del medio y cambios fisiológicas de la planta constituyen un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo, el cual puede estar inducido por infección de patógenos, radiaciones UV, temperaturas bruscas, sequía, salinidad, niveles de C, N, P, C. (Xu et al., 2015, p. 178)

El complejo encargado de la regulación fisiológica de la síntesis de flavonoides es el MYB, el cual se activa ante concentraciones elevadas de flavonoides, inhibiendo la producción en los tejidos. (Zhai et al., 2016, pp. 3–4)

La deficiencia de Nitrógeno y el desbalance de Carbono en las raíces de la planta desencadenan acumulación de flavonoides, especialmente a temperaturas bajas. (Pandey et al., 2015, p. 11)

Ciertas moléculas pueden actuar como inductores en el proceso de biosíntesis, tales como el ácido abscísico (ABA) y las citoquinas (JA); por el contrario el ácido gibérelico (GA) y el etileno (BR) como represores; a este proceso se le conoce como regulación hormonal de la biosíntesis. (Grotewold, 2006, p. 165)

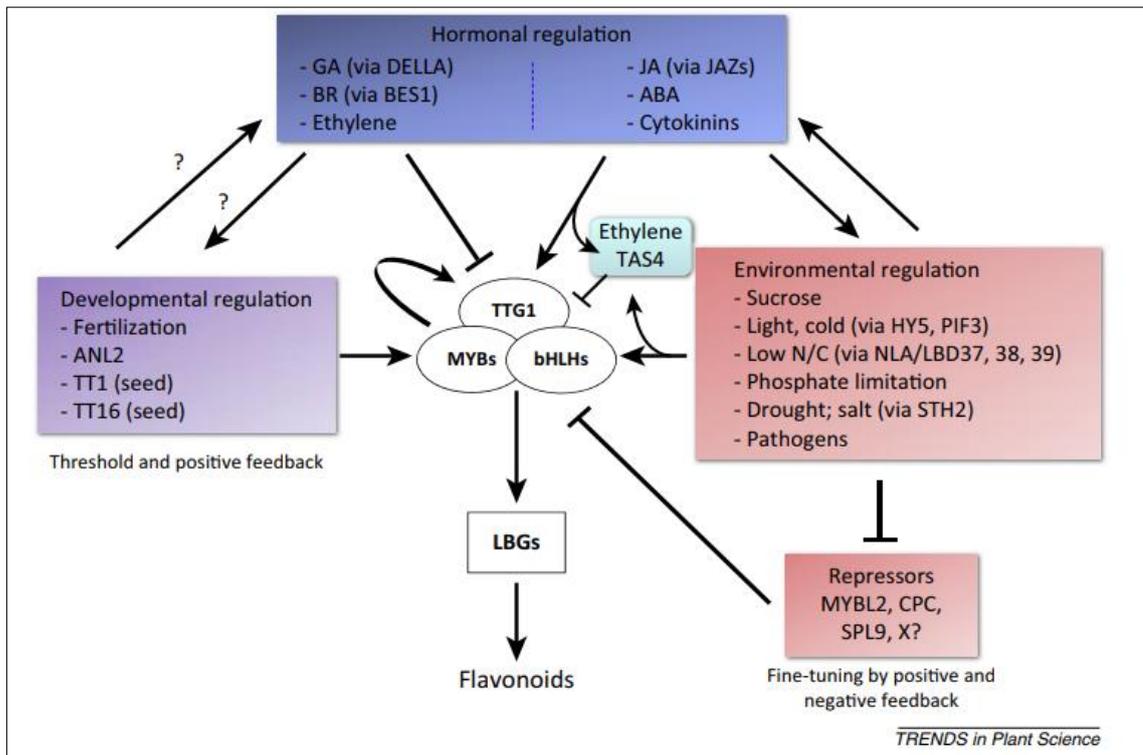
#### *3.13.2.1 Retroalimentación positiva*

La regulación del desarrollo está expresada en tejidos específicos de producción de flavonoides, tales como el fruto, flores, hojas; involucra un ciclo retroalimentación positiva. Ha nivel genético se habla de una elevación de producción de genes localizados en la cubierta de las semillas. (Zhai et al., 2016, p. 5)

#### *3.13.2.2 Retroalimentación negativa*

La regulación de las respuestas fisiológicas y estímulos ambientales para la producción de flavonoides, demandan de una retroalimentación negativa.

Un tipo de proteína MYB100 puede inhibir la normal actuación de las enzimas Chalcona sintasa (CH) y Chalcona isomerasa (CHI) en estudios llevados a cabo en plantas transgénicas; estos hallazgos determinan a dicha proteína como un regulador negativo de la biosíntesis de isoflavonoides. (Yan et al., 2015, p. 6)



**Figura 97-3:** Regulación de la biosíntesis de flavonoides.

**Fuente:** (Xu et al., 2015, p. 180)

En la imagen 96-3 se identifica que el complejo MYB está involucrado en la regulación de biosíntesis de flavonoides inducida como mecanismo de respuesta al estrés producido por factores bióticos o abióticos, mediante la activación de ciertos genes biosintéticos tardíos (LBGs). Como productos finales se obtiene los diferentes tipos de flavonoides.

En la regulación de la biosíntesis en nivel de tejidos específicos, involucra una retroalimentación positiva; en la regulación de ambiental implica mecanismos de retroalimentación negativa al reprimir genes a nivel de la transcripción.

## CONCLUSIONES

1. Las enzimas identificadas *in silico* que participan en el proceso de biosíntesis de flavonoides en *Helianthus annuus* son homólogas en diferentes especies, debido a que exhiben interacciones físicas y asociaciones funcionales; propias de éstas, al pertenecer a un mismo metabolon, de síntesis de flavonoides en plantas superiores.
2. El complejo multienzimático citosólico denominado metabolón flavonoide se activa de modo automático ante condiciones de estrés, desencadenando la ruta biosintética de flavonoides; en *Helianthus annuus* se determinó 4 enzimas que forman parte de dicho metabolón: Flavonoide 3'-monooxigenasa, Dihidroflavonol 4-reductasa, Leucoantocianidina dioxigenasa y Leucoantocianidina reductasa.
3. Las proteínas cuyos dominios abarcan la membrana celular proporcionan a la molécula sitios nucleación que permiten el autoensamblaje o unión de subunidades solubles; propiedad que comparten las enzimas del metabolón flavonoide.
4. La decodificación del código genético de una especie, junto a la aplicación de técnicas bioinformáticas permite al mundo contemporáneo manipular a conveniencia este fragmento de vida, convirtiendo al genoma en algo más que una colección de letras y dígitos; lo cual requiere estrictamente la mayor ética profesional posible.
5. El tipo de regulación más importante de la biosíntesis de flavonoides es la transcripcional, puede estar sujeta a modificaciones por la mano del hombre, pudiendo ser modificadas genéticamente de manera estratégica para inferir en la calidad de los productos, incrementando el valor nutricional y la resistencia de las plantas a los factores bióticos y abióticos que producen estrés oxidativo.
6. La regulación fisiológica sobre la biosíntesis de flavonoides utiliza mecanismos de inhibición de enzimas involucradas en los procesos de estrés oxidativo que producen hiperproducción de flavonoides; involucra ciclos de retroalimentación positiva y negativa y sustancias químicas propias de la planta que agonizan o antagonizan los procesos biosintéticos.
7. Factores externos a la planta generan estrés oxidativo, los flavonoides se sintetizan como mecanismos de defensa ante temperaturas extremas, intensa radiación UV, infecciones

causadas por patógenos; son antioxidantes por excelencia y contribuyen al proceso de la polinización.

8. Las herramientas informáticas aplicadas al campo de la salud abre posibilidades al descubrimiento de nuevos fármacos, conocimiento del origen de patologías no resueltas, predicción de fenotipo y genotipo, descripción de rutas metabólicas y más.

## RECOMENDACIONES

1. La bioinformática es una materia desconocida en nuestra carrera, al ser una herramienta útil para las investigaciones relacionadas a la biología molecular y con campo de aplicación a la bioquímica y la farmacia debería incluirse como tema de estudio en la malla curricular para la formación de un Bioquímico Farmacéutico.
2. La identificación *in silico* permite llevar a cabo investigaciones de tipo genético, ésta técnica de experimentación podría incluirse en el grupo de investigación Gipronaf con las plantas manejadas, buscando fortalecer y ampliar los resultados obtenidos.
3. La codificación genética de una especie, abre el campo a la experimentación con el genoma de la misma, en este sentido se debería estudiar las plantas endémicas del Ecuador, que poseen actividades farmacológicas que podrían ser mejoradas.
4. La experimentación *in silico* es aplicable a la predicción de efectos de la toxicidad sobre un organismo, por lo cual podría utilizarse como una alternativa a la experimentación con animales de experimentación de un bioterio.

## **GLOSARIO DE TÉRMINOS**

**Ácidos nucleicos:** Polímeros formados por nucleótidos, unidos por un enlace fosfórico.

**Algoritmo:** Reglas definidas que permiten llevar a cabo una actividades en procesos estructurados y ordenados.

**ADN recombinante:** Molécula de ADN artificial.

**Auxinas:** Fitohormonas, que regulan el crecimiento vegetal.

**Codificación:** Interpretación de la información genética

**Codón:** Es una unidad independiente de ARNm de tres bases.

**Cromosoma:** Orgánulo del núcleo celular que contiene el material genético.

**Dímero:** Complejo formado por dos macromoléculas.

**Elicitores:** Molécula capaz de inducir mecanismos de defensa en la planta.

**Espermatofito:** Conocidas también como fanerógamas, grupo del reino de las plantas.

**Exón:** Parte de un gen que no se separa durante el Splicing, contiene información para la construcción de proteínas.

**Expresión génica:** Proceso mediante el cual se transforma la información codificada en proteínas.

**Fenotipo:** Caracteres genéticos que se hacen visibles en un individuo

**Formato FASTA:** Formato informático basado en texto, utilizado para representar secuencias de ácidos nucleicos y péptidos; en el que los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra.

**Gen:** Es una porción de ADN con la información para sintetizar una proteína o una molécula de ADN.

**Genotipo:** Caracteres genéticos no visibles, que se encuentran en forma de información en el ADN.

**Herencia genética:** Información genética que pasa de progenitores a descendientes, que se almacena en forma de ADN.

**Homodímero:** Dos cadenas peptídicas iguales que forman una proteína.

**Intrón:** Región de ADN que no decodifica proteínas

**Ligando:** Molécula específica que se une a una región determinada de un receptor, para formar un complejo ligando-receptor.

**Metabolon:** Complejo estructural-funcional constituido por enzimas que catalizan una misma ruta metabólica.

**Monómero:** Molécula de poca masa molecular, que se encuentra unida a otros monómeros.

**Nucleótido:** Molécula orgánica formada por una pentosa, base nitrogenada y un grupo fosfato.

**Paralogue:** Uno de los dos genes que proceden de un mismo gen ancestral.

**Peso molecular:** Suma de la masa molecular de todos los átomos de una molécula.

**Punto isoelectrico:** pH a la cual la solubilidad de una sustancia es nula.

**Replicación de AND:** Proceso por el cual se genera una molécula idéntica de ADN, la doble hélice se abre y sirve como molde para la nueva.

**Ruta metabólica:** Conjunto de reacciones químicas sucesivas para formar un producto final.

**Splicing:** Proceso transcripcional de corte y empalme de ARN

**Telemedicina:** Servicios médicos a distancia.

**Transcripción:** Similar a la replicación de ADN, con polimerización de una de las hebras.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ARNOLD, K. et al.** "The Protein Model Portal". *Journal of Structural and Functional Genomics* [en línea], 2009, vol. 10(1), pp. 1–8. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1007/s10969-008-9048-5. ISSN 1345-711X. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10969-008-9048-5>
- **ARTIMO, P. et al.** "ExpASy: SIB bioinformatics resource portal". *Nucleic Acids Research*. [en línea], 2012. vol. 40(w1), pp. W597–W603. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1093/nar/gks400. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>
- **BADOUIN, H. et al.** "The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution Nature". *Nature* [en línea], 2017. vol. 546(7656), pp. 148–152. [consulta: 2018-02-20]. ISSN 0028-0836, 1476-4687. DOI 10.1038/nature22380. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature22380>
- **BASTLE, R. et al.** "In silico identification and in vivo validation of miR-495 as a novel regulator of motivation for cocaine that targets multiple addiction-related networks in the nucleus accumbens". *Molecular Psychiatry*. [en línea], 2018, vol. 23(2) pp. 434–443. [consulta: 2018-02-20]. DOI 10.1038/mp.2016.238. ISSN 1476-5578. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.238>
- **BORDOLI, L. et al.** "Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace". *Nature Protocols*. [en línea], 2008. vol. 4(1), pp. 1–13. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1038/nprot.2008.197. ISSN 1750-2799. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>
- **BURKE, J. et al.** "Structural Characterization of the Emergence and Evolution of Catalysis in the Chalcone Isomerase Family Fold". *The FASEB Journal*. [en línea], 2016. vol. 30(1), pp. Ib112-Ib112. [consulta: 2018-02-21]. DOI 10.1096/fasebj.30.1\_supplement.Ib112. ISSN 0892-6638. Disponible en: [https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1\\_supplement.Ib112](https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.Ib112)
- **CABRERA, J. et al.** "*Sistemas Informáticos (GRADO SUPERIOR)*". RA-MA S.A. Editorial y Publicaciones. [en línea], 2011. pp. 356. ISBN 978-84-9964-099-0.
- **CHENG, A. et al.** " Identification and expression analysis of key enzymes of the terpenoids biosynthesis pathway of a liverwort <Emphasis Type="Italic">Plagiochasma

appendiculatum</Emphasis> by EST analysis". *Acta Physiologiae Plantarum*. [en línea], 2013. vol. 35(1). pp. 107–118. [consulta: 2018-02-18] DOI 10.1007/s11738-012-1053-4. ISSN 0137-5881, 1861-1664. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1053-4>

- **CHOUDHURI, S.; KOTEWICZ, M.** "Bioinformatics for beginners: genes, genomes, molecular evolution, databases, and analytical tools". *Elsevier Bioinformatics for beginners*. 2014 (Amsterdam-Boston). p. 225. ISBN 978-0-12-410471-6
- **DIAS, T. et al.** "Phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of photomorphogenic mutant tomato". *Ciência Rural*. [en línea], 2015. vol. 45(5), pp. 782–787. [consulta: 2018-02-17]. DOI 10.1590/0103-8478cr20140098. ISSN 0103-8478. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140098>
- **EL MARSNI, Z. et al.** "Isolation of Bioactive Compounds from Sunflower Leaves (*Helianthus annuus* L.) Extracted with Supercritical Carbon Dioxide". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [en línea] 2015. vol. 63(28), pp. 6410–6421. [consulta: 2018-01-06]. DOI 10.1021/acs.jafc.5b02261. ISSN 0021-8561. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02261>
- **EUDES, A. et al.** "Exploiting the Substrate Promiscuity of Hydroxycinnamoyl-CoA: Shikimate Hydroxycinnamoyl Transferase to Reduce Lignin". *Plant and Cell Physiology*. [en línea], 2016. vol 57(3), pp 568-579. [consulta: 2018-02-18 13]. DOI 10.1093/pcp/pew016. ISSN 0032-0781. Disponible en: <https://academic.oup.com/pcp/article/57/3/568/2461033>.
- **FATUMO, S. et al.** "Computational Biology and Bioinformatics in Nigeria". *PLoS Computational Biology*. [en línea], 2014. vol. 10(4), pp.100-105. [consulta: 2018-02-15] DOI 10.1371/journal.pcbi.1003516. ISSN 1553-7358. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003516>
- **GROTEWOLD, E.** *The science of flavonoids*. Open WorldCat. New York. Springer, ISBN 978-0-387-28821-5. 2006, pp. 273
- **HEISER, C.B.** "Taxonomy of *Helianthus* and Origin of Domesticated Sunflower". *Soil Science Society of America*. [en línea], 1978. vol. 19. pp. 31–53. [consulta: 2018-01-15] Disponible en: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr19.c2>

- **JIMÉNEZ GARCÍA, L. et al.** *Biología celular y molecular*. Pearson Educación : Prentice Hall, México, 2003, pp. 16-18.
  
- **JØRGENSEN, K. et al.** "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products". *Physiology and metabolism*. [en línea], 2005, vol. 8(3). pp. 280–291. [consulta: 2018-02-25]. DOI 10.1016/j.pbi.2005.03.014. ISSN 1369-5266. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.014>
  
- **KANEHISA, M. et al.** "KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs". *Nucleic Acids Research*. [en línea], 2017. vol.45 (1), pp. D353–D361. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1093/nar/gkw1092. ISSN 0305-1048. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
  
- **KUMAR, S., PANDEY, A.K.** "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview". *The Scientific World Journal*. [en línea], 2013, vol.1 (2). pp. 1–16. [consulta: 2018-03-06]. DOI 10.1155/2013/162750. PMID 24470791. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
  
- **LELIEVELD, S. et al.** "Novel bioinformatic developments for exome sequencing". *Human Genetics*. [en línea], 2016. vol. 135(6), pp. 603–614. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1007/s00439-016-1658-6. ISSN 0340-6717, 1432-1203. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1658-6>
  
- **LI, H. et al.** "Regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis by *Medicago truncatula* bHLH transcription factor MtTT8". *New Phytologist*. [en línea], 2012. vol. 210(3). pp. 905-921. [consulta: 2018-02-19 16]. DOI 10.1111/nph.13816. ISSN 0028646X. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1061-2>
  
- **LOTKOWSKA, M. et al.** "The Arabidopsis transcription factor MYB112 promotes anthocyanin formation during salinity and under high light stress". *Plant Physiology*. [en línea], 2015. vol. (11). pp. 605-615. [consulta: 2018-02-18]. DOI 10.1104/pp.15.00605. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00605>
  
- **MADDEN, T.** *The BLAST Sequence Analysis Tool*. National Center for Biotechnology Information, USA, 2013, pp. 256-257.

- **MALACARNE, G.** "The grapevine VvibZIPC22 transcription factor is involved in the regulation of flavonoid biosynthesis". *Journal of Experimental Botany*. [en línea], 2016, vol. 67(11) pp. 3509-3522 [consulta: 2018-02-17] DOI 10.1093/jxb/erw181. ISSN 0022-0957, 1460-2431. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw181>
- **MAZZA, G.** This text is a comprehensive reference covering the chemistry, physiology, chemotaxonomy, biotechnology and food technology aspects of the anthocyanins. Topics discussed include types of anthocyanins, structural transformations, colour stabilization and intensification factors, biosynthesis and intensification factors, biosynthesis, analysis and functions of anthocyanins. An in-depth review of the literature discussing anthocyanins of fruits, cereals, legumes, roots, tubers, bulbs, cole crops, oilseeds, herbs, spices, and minor crops is included as well. [en línea] USA: CRC Press. ISBN 978-1-351-08660-8, 2018. [consulta: 2018-02-14]. Disponible en: <https://www.crcpress.com/Anthocyanins-in-Fruits-Vegetables-and-Grains/Mazza/p/book/9781315890609>
- **MIERZIAK, J. et al.** "Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment". *Molecules* [en línea], 2014. vol. 19(10), pp. 16240–16265. [consulta: 2018-02-20]. 10.3390/molecules191016240. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- **MULDER, N. et al.** "The development and application of bioinformatics core competencies to improve bioinformatics training and education". *PLOS Computational Biology*. [en línea], 2018. vol. 14(2), p. e1005772. [consulta: 2018-02-15]. DOI 10.1371/journal.pcbi.1005772. ISSN 1553-7358. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005772>
- **NEMESIO, M. et al.** "Different Alleles of a Gene Encoding Leucoanthocyanidin Reductase (PaLAR3) Influence Resistance against the Fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies*". *Plant Physiology*. [en línea], 2016. vol 171(4), pp. 2671–2681. [consulta: 2018-02-18]. DOI 10.1104/pp.16.00685. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.16.00685>
- **OHNO, S. et al.** "Post-transcriptional silencing of *chalcone synthase* is involved in phenotypic lability in petals and leaves of bicolor dahlia (*Dahlia variabilis*) ‘Yuino’". *Planta*. [en línea], 2018. vol. 247(2), pp. 413–428. [consulta: 2018-02-16]. DOI 10.1007/s00425-017-2796-3. ISSN 0032-0935, 1432-2048. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2796-3>

- **PANDEY, A. et al.** "Constitutive expression of *Arabidopsis* MYB transcription factor, *AtMYB11*, in tobacco modulates flavonoid biosynthesis in favor of flavonol accumulation". *Plant Cell Reports*. [en línea], 2015, vol. 34(9). pp. 1515-1528. [consulta: 2018-02-19]. DOI 10.1007/s00299-015-1803-z. ISSN 0721-7714, 1432-203X. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1803-z>
  
- **PETRUSSA, E. et al.** "Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses". *International Journal of Molecular Sciences*. [en línea], 2013, vol. 14(7). pp. 14950-14973. [consulta: 2018-02-25]. DOI 10.3390/ijms140714950. ISSN 1422-0067. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
  
- **SALINAS, J.; LISBONA, F.** *Manual de prácticas de Bioinformática*. Universidad Almería. España, 2016, pp. 25-27.
  
- **SCHMID, N. et al.** "Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in *Arabidopsis*". *Plant Physiology*. [en línea], 2014, vol. 164(1). pp. 160-172. [consulta: 2018-02-18 18]. DOI 10.1104/pp.113.228544. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.113.228544>
  
- **SZASZKÓ, M. et al.** "Identification of potential glutaminyl cyclase inhibitors from lead-like libraries by in silico and in vitro fragment-based screening". *Molecular Diversity*. [en línea], 2017, vol. 21(1), pp. 175-186. [consulta: 2018-02-20 07]. DOI 10.1007/s11030-016-9717-4. ISSN 1381-1991, 1573-501X. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11030-016-9717-4>
  
- **SZKLARCZYK, D. et al.** "The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible". *Nucleic Acids Research*. [en línea], 2017, vol. 45, pp. 362-368. [consulta: 2018-02-15 14]. DOI 10.1093/nar/gkw937. ISSN 0305-1048. Disponible: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
  
- **WANG, G. et al.** "Functional analysis of Flavonoid 3',5'-hydroxylase from Tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins". *BMC Plant Biology*. [en línea], 2014, vol. 14. p. 347. [consulta: 2018-02-17]. DOI 10.1186/s12870-014-0347-7. ISSN 1471-2229. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9437-5>
  
- **WATSON, J.D.** *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana. México, 2006, pp. 35.

- **WELLMANN, F. et al.** *Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from Citrus unshiu*. Eur. J. Biochem. España. 269, 2002, 45.
  
- **WESTON, L.A.; MATHESIUS, U.** "Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy Springer Link". *Journal of Chemical Ecology*. [en línea], 2013, vol. 39(2), pp. 283–297. [consulta: 2018-01-26]. DOI 10.1007/s10886-013-0248-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>
  
- **XU, W., DUBOS, C., LEPINIEC, L.** "Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes". *Trends in Plant Science*. [en línea], 2015, vol. 20(3), pp. 176–185. [consulta: 2018-02-19]. DOI 10.1016/j.tplants.2014.12.001. ISSN 13601385. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.001>
  
- **YAN, J. et al.** "The soybean R2R3 MYB transcription factor *GmMYB100* negatively regulates plant flavonoid biosynthesis". *Plant Molecular Biology*. [en línea], 2015, vol. 89(1), pp.35–48. [consulta: 2018-02-19 16]. DOI 10.1007/s11103-015-0349-3. ISSN 0167-4412, 1573-5028. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0349-3>
  
- **YANG, X. et al.** "Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities". *Trends in Food Science & Technology*. [en línea], 2015, vol. 44(1), pp. 93–104. [consulta: 2018-02-20]. DOI 10.1016/j.tifs.2015.03.007. ISSN 0924-2244. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.03.007>
  
- **ZHAI, R. et al.** "Two MYB transcription factors regulate flavonoid biosynthesis in pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)". *Journal of Experimental Botany*. [en línea], 2016, vol. 67(5), pp. 1275–1284. [consulta: 2018-02-19]. DOI 10.1093/jxb/erv524. ISSN 0022-0957. Disponible: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv524>
  
- **ZHOU, H. et al.** "Peach MYB7 activates transcription of the proanthocyanidin pathway gene encoding leucoanthocyanidin reductase, but not anthocyanidin reductase". *Frontiers in Plant Science*. [en línea], 2015, vol. 6, pp. 210-214. [consulta: 2018-02-18]. DOI 10.3389/fpls.2015.00908. ISSN 1664-462X. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00908>

- **ZORATTI, L. et al.** "Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits". *Frontiers in Plant Science*. [en línea], 2014, vol. 5, pp. 345-347. [consulta: 2018-02-17]. DOI 10.3389/fpls.2014.00534. ISSN 1664-462X. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00534>