



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ (UACJ) —
ICB
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS |
SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN IV

Caracterización Bioquímica, Estructural y Cinética de Glutación S-Transferasa y Glutación Peroxidasa en Neltuma alba: Elucidación de su Mecanismo Catalítico

M. en C. Carlos Montejo Dávila

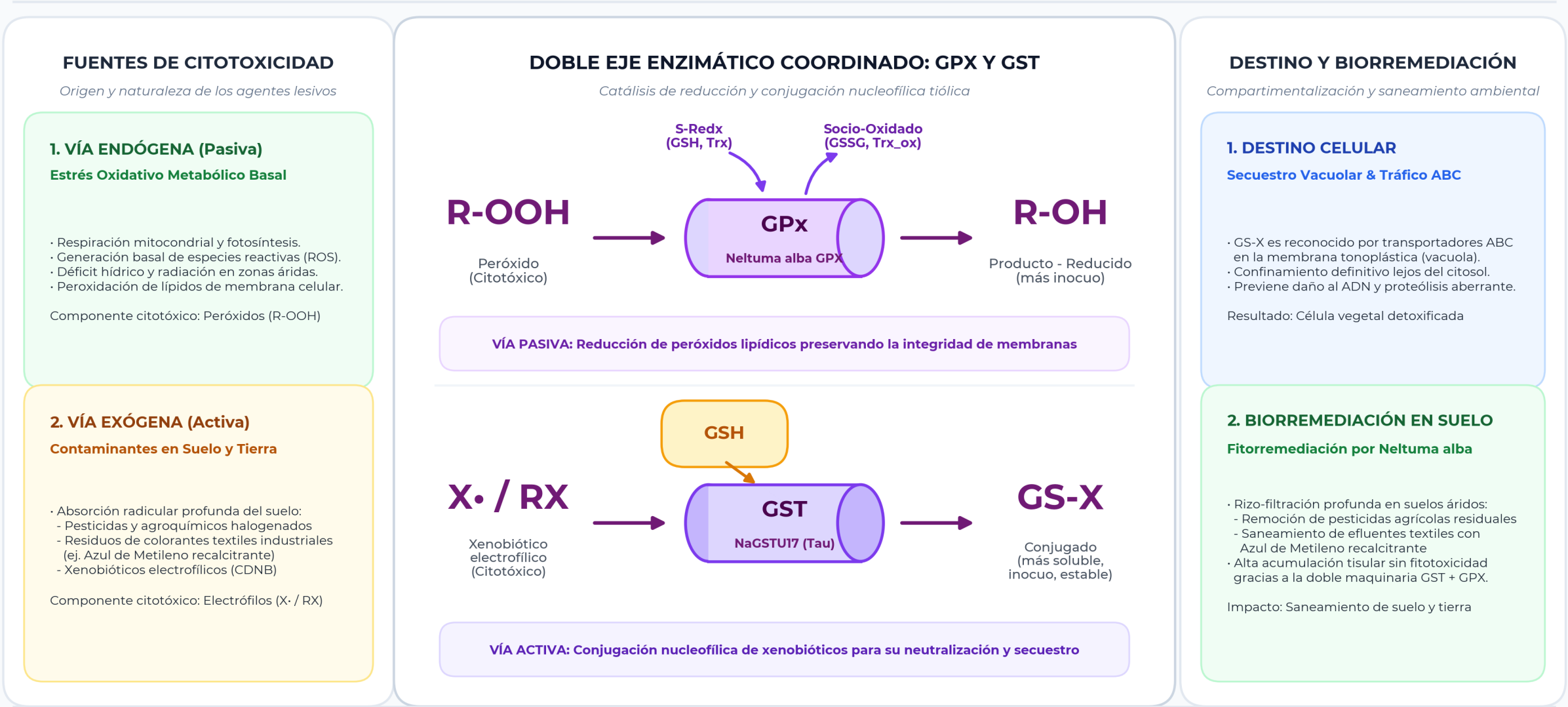
Codirectores de tesis:

Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez

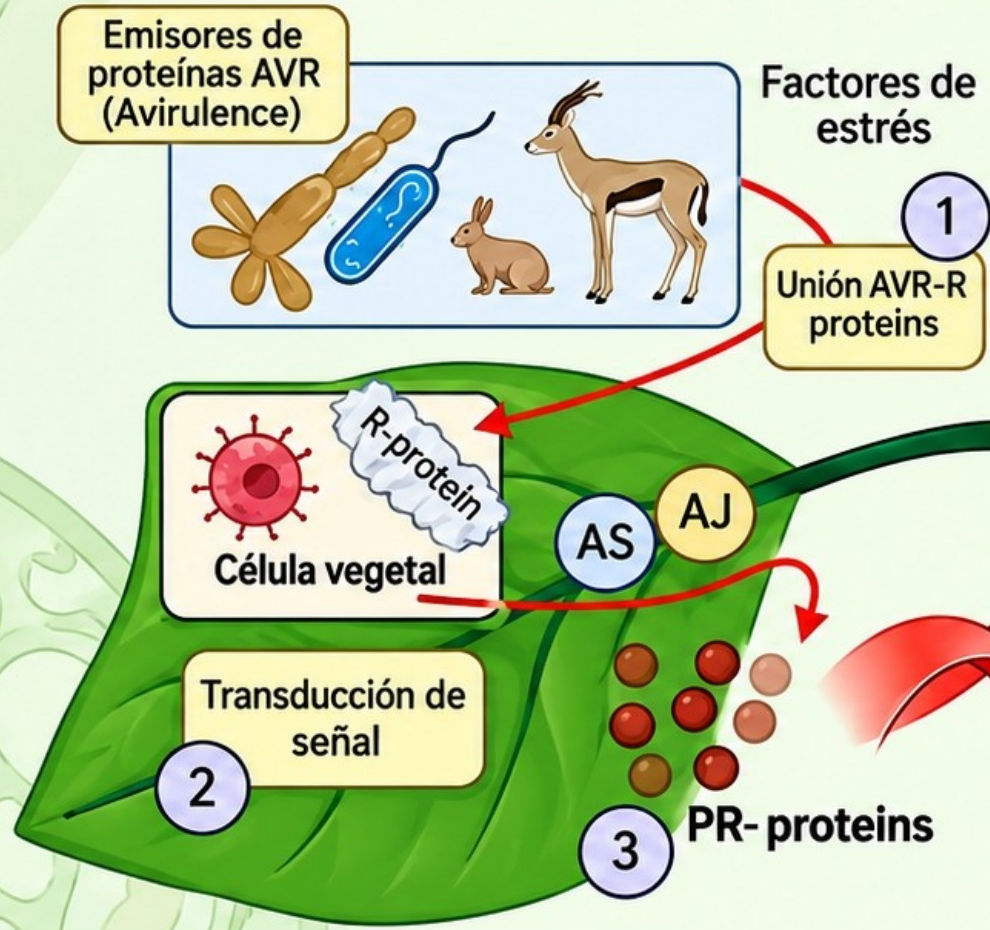
Dra. Lilian González Segura

Mecanismos Celulares de Biorremediación y Detoxificación: Doble Eje GPX y GST

Mitigación coordinada de estrés oxidativo metabólico (vía pasiva) y contaminantes en suelo y tierra (vía activa)



Resistencia Local



Vía de transducción de señal

4

Resistencia sistémica adquirida



Célula vegetal

Productos químicos de respuesta
ej. PR-proteínas

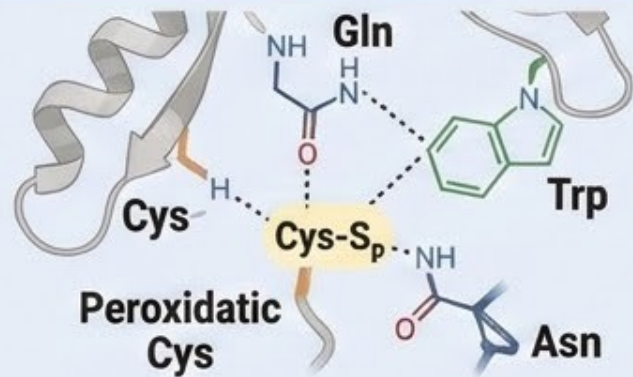
5

Productos químicos de respuesta

5'

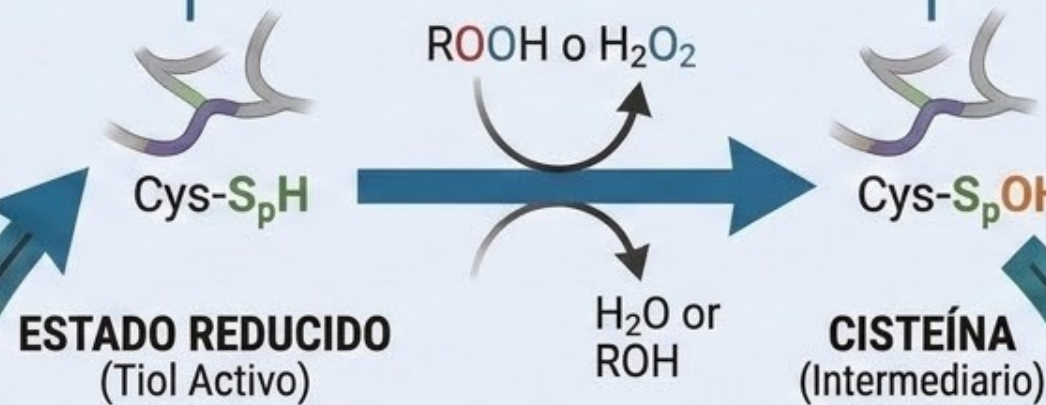
Función tradicional (Actividad Antioxidante)

Tétrada Catalítica: Cys, Gln, Trp, Asn



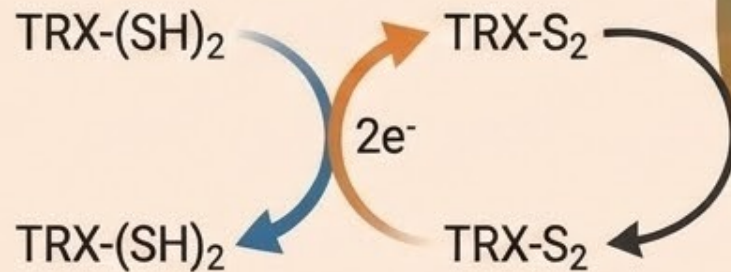
Los residuos Gln y Trp activan la Cys peroxidática (Cys-S_p) mediante puentes de hidrógeno, disminuyendo su pKa

Etapa 1: Peroxidación



La Cys-S_p reducida ataca al peróxido (H₂O₂ o ROOH), liberando agua o alcohol y transformándose en un intermediario de ácido sulfénico (Cys-S_pOH)

SISTEMA TIOREDOXINA (TRX)



REDUCCIÓN POR TIOREDOXINA (TRX), NO GLUTATIÓN.

El sistema TRX/NTR reduce el disulfuro para restaurar el estado activo; las plantas prefieren TRX porque carecen de los residuos de unión a GSH presentes en mamíferos

Etapa 3: Regeneración y Socio Redox



Etapa 2: Resolución

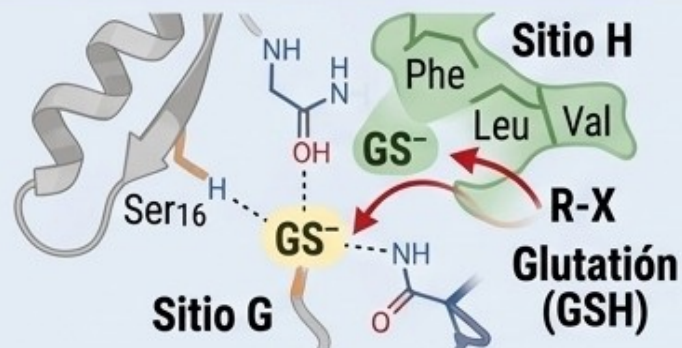


Una Cys de resolución (Cys-S_r) realiza un ataque nucleofílico sobre el ácido sulfénico, generando un enlace disulfuro intramolecular y el estado oxidado de la enzima

(Toppo et al., 2009)
(Navrot et al., 2006)

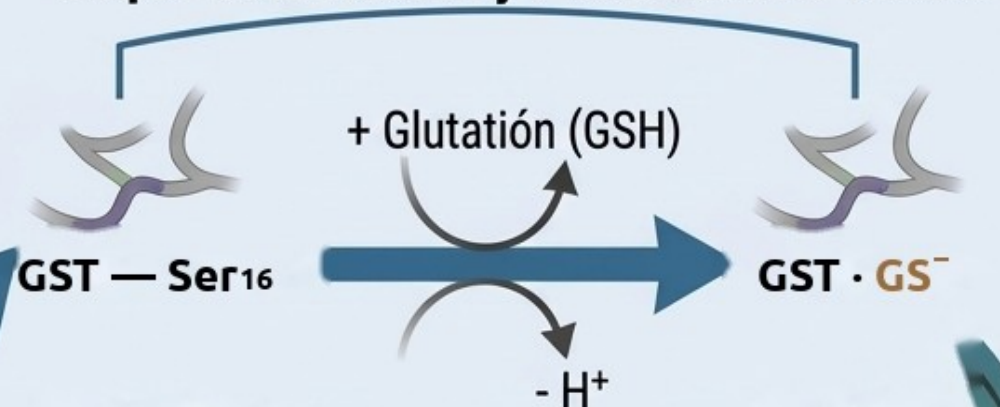
Función tradicional (Mecanismo de Detoxificación de GST)

Arquitectura Catalítica: Sitios G y H



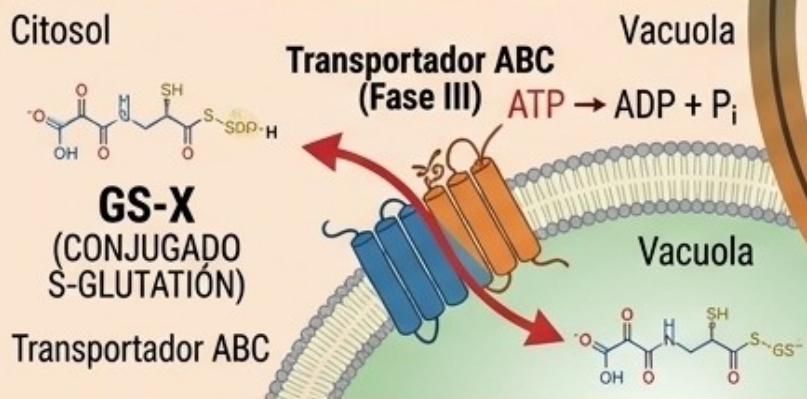
La Ser-16 forma puentes de hidrógeno con el tior del GSH, disminuyendo su pKa de ~9 a ~6.2 y generando el anión tiolato (GS⁻) altamente nucleofílico en el Sitio G, adyacente al Sitio H hidrofóbico donde se unen los xenobióticos electrofílicos para su conjugación.

Etapa 1: Activación y Formación de Tiolato



El glutatión se une al Sitio G, donde el Ser-16 estabiliza su anión tiolato (GS⁻) mediante un puente de hidrógeno, activándolo para el ataque nucleofílico.

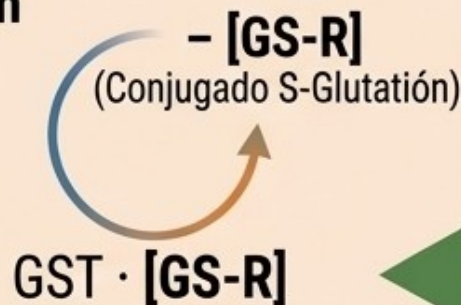
DESTINO METABÓLICO DEL CONJUGADO (GS-X)



CONJUGACIÓN COVALENTE IRREVERSIBLE, NO REDOX

El transportador ABC de Fase III utiliza ATP para transportar irreversiblemente el conjugado GS-X a la vacuola para su secuestro, detoxificando la célula sin requerir regeneración redox.

Etapa 3: Liberación y Regeneración



La enzima regenera su estado libre simplemente liberando el conjugado GS-X del sitio activo, lista para otro ciclo sin necesidad de sistemas redox externos.

ANIÓN TIOLATO (Tior Activado)

Etapa 2: Ataque y Conjugación



Un xenobiótico electrofílico (R-X) entra en el Sitio H y sufre el ataque nucleofílico del anión tiolato (GS⁻), desplazando al grupo saliente (X⁻) y formando el complejo conjugado transitorio con la enzima.

(Armstrong, 1997)
(Deponte, 2013)

El Cambio de Paradigma: De la Señalización Redox al Enigma en *Neltuma alba*

Planta Modelo (*Arabidopsis thaliana*)

Transición conceptual de la función redox en el estoma

Transición Conceptual de la Función Redox

- **Modelo Clásico:** 'Limpieza' pasiva de ROS ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$)
- **Nuevo Paradigma:** Sensores e interruptores redox moleculares

Evidencia Experimental en Células Oclusivas



Estoma Abierto

Condición Óptima • Transpiración



Estoma Cerrado

Estrés Hídrico • Señal por GPX

Descubrimiento Clave en Arabidopsis:

- Las isoformas GPX operan como transductores de señal redox.
- Modulan las células oclusivas para inducir el cierre rápido ante sequía.

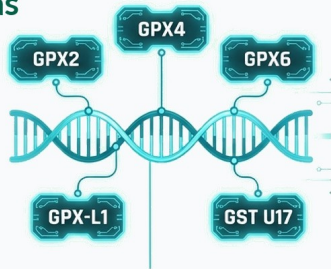
Evidencia científica: Flores et al. (2023); Gómez & Díaz (2024).

Traslación → ¿Opera este mecanismo en árboles del desierto?

Árbol Xerófilo (*Neltuma alba*)

Repertorio de isoformas y adaptación al desierto

Isoformas Clave Identificadas



5 Isoformas: GPX2 • GPX4 • GPX6 • GPX-L1 • GST U17

PREGUNTA CENTRAL DE INVESTIGACIÓN:

¿Mera detoxificación antioxidante o sensores moleculares que regulan el estoma bajo estrés extremo?

Desafío Xerófilo y Especialización



- **Ambiente Extremo:**
Radiación $>1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y calor $>45^\circ\text{C}$
- **Hipótesis de Trabajo:**
Especialización funcional no redundante: control estomático vs. detoxificación profunda.

Siguiente → *Neltuma alba*: Modelo Biológico de Resiliencia Extrema

Neltuma alba: Un Modelo Biológico de Resiliencia Extrema



Supervivencia en estrés hídrico y térmico.



Maquinaria bioquímica especializada.



Enigma: Homeostasis bajo presión oxidativa.
(Zia et al., 2021)

Hipótesis Central

Las isoformas de la **Glutación Peroxidasa (GPX 2, 4, 6 y L1)** y la **Glutación S-Transferasa U17 (GST U17)** de *Neltuma alba* poseen **arquitecturas tridimensionales** y funciones catalíticas que determinan la **adaptabilidad vegetal** al estrés abiótico sistemático mediante la regulación de la **capacidad antioxidante y la apertura/cierre de estomas**.

OBJETIVOS

General

Analizar la **estructura y funcionalidad** de las isoformas **GPX 4, GPX L1 y GST U17** en respuesta al **estrés abiótico** en plantas de ***Neltuma alba***

Específicos

1. Obtener las **isoformas recombinantes**.
2. Obtener **información estructural** de dichas isoformas de *N. alba*.
3. Estimar los **parámetros cinéticos** de la reacción catalizada por las isoformas recombinantes de **GPX y GST**.
4. Valorar la **expresión de las isoformas GPX/GST** en plantas de *N. alba* sometidas a estrés vía **qPCR**.
5. Correlacionar la expresión de las isoformas de GPX/GST con los **parámetros bioquímicos** y la **dinámica de los estomas** en *N. alba* durante el estrés abiótico.

MÉTODOS Y RESULTADOS



1. IN SILICO
(Estructura 3D)



2. BIOPROCESO
(Expresión e IMAC)



3. CINÉTICA
(FLUOstar Omega)

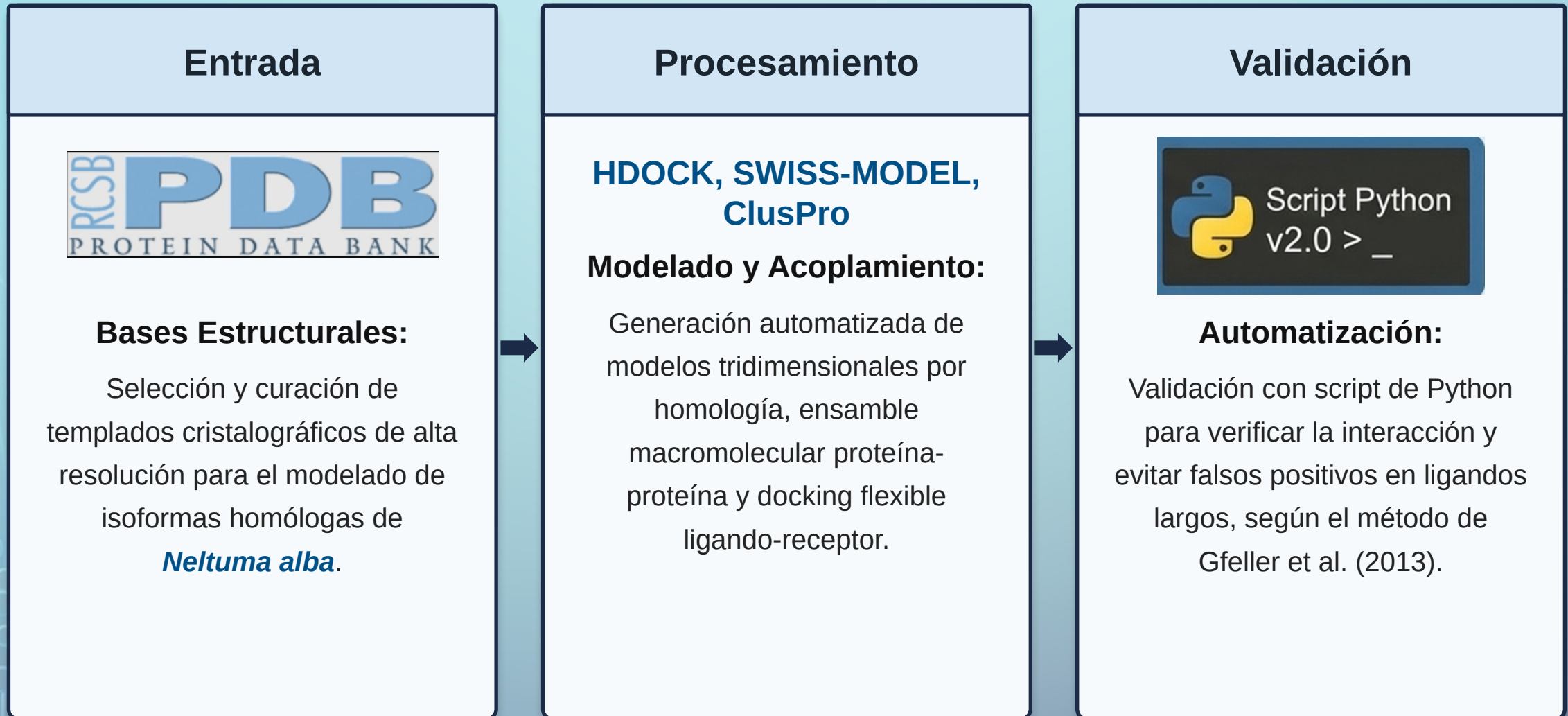


4. qPCR
(Expresión *In Vivo*)

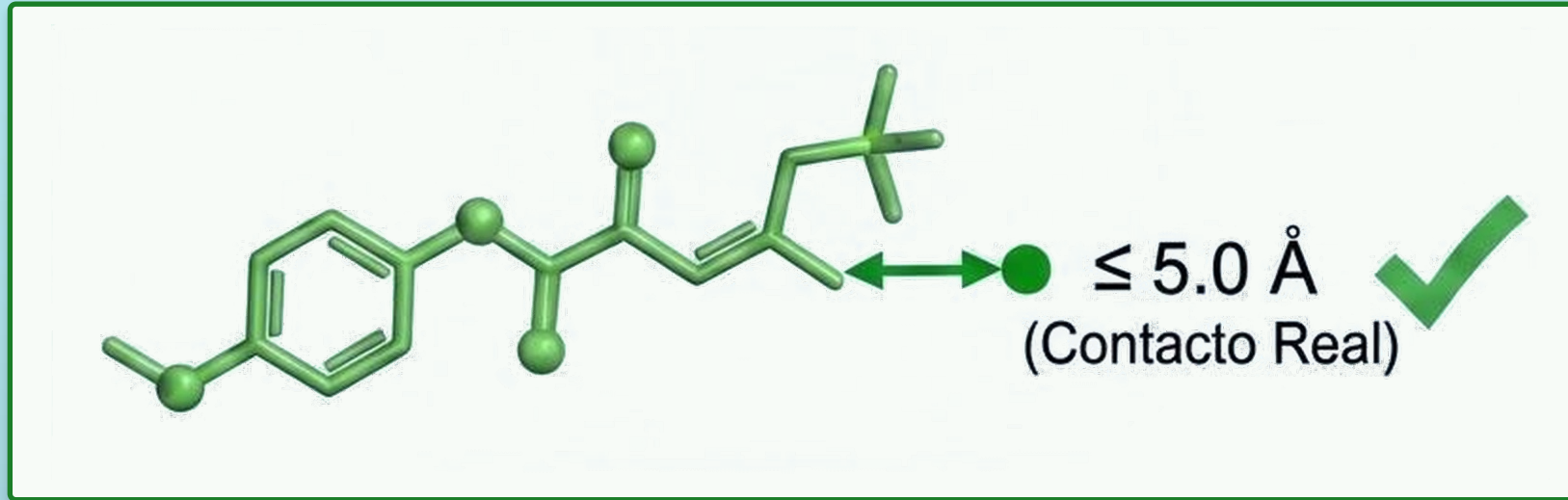


5. INTEGRACIÓN
(Resistencia Redox)

Elucidar la estructura y los parámetros in silico de las GPX y GST



Algoritmo para Verificación de Contacto Real entre Proteína-Ligando



Scripts en Python miden la distancia atómica real entre el ligando y el sitio activo. Este método es más preciso para ligandos elongados que los cálculos basados en centroides, usando un umbral de $5.0 \text{ \AA}$.

$$d = \sqrt{[(x - X_T)^2 + (y - Y_T)^2 + (z - Z_T)^2]}$$

Gfeller y colaboradores, 2013

Criterio de Éxito: Interacción atómica real $\leq 5.0 \text{ \AA}$ con el residuo Serina 16.

Localizar Residuo: -- Seleccionar residuo --

Cartoon

Sticks

Superficie

Color

Auto-Rotar

Medir Distancia (Å)

Reset

PNG

PDB

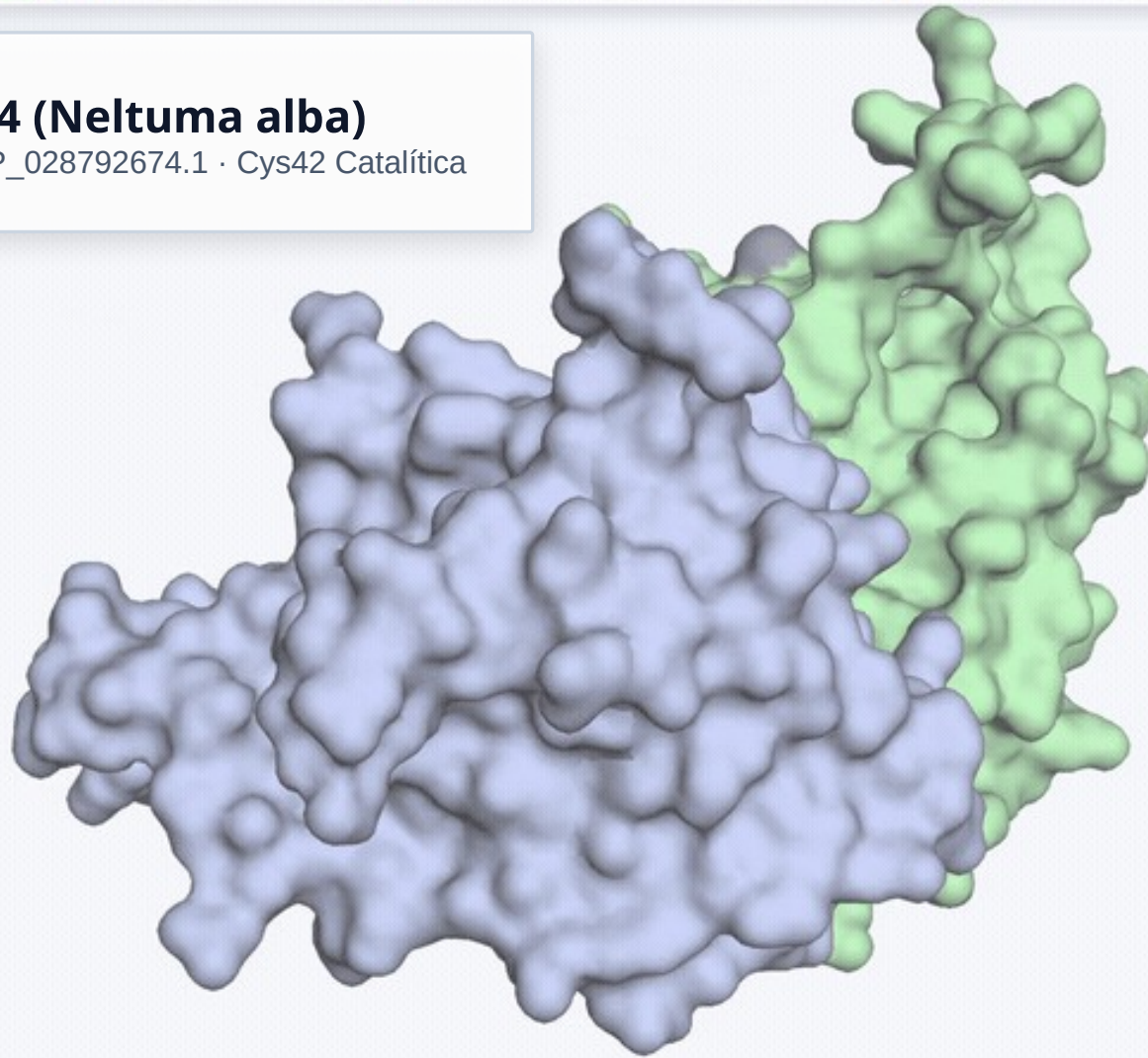
FASTA

GSH (Cys42)

TrxH

ISOFORMA GPX 4 (Neltuma alba)

Homología 3D · NCBI: XP_028792674.1 · Cys42 Catalítica



Plataforma Interactoma
Modular

Localizar Residuo: -- Seleccionar residuo --

Cartoon

Sticks

Superficie

Color

Auto-Rotar

Medir Distancia (Å)

Reset

PNG

PDB

FASTA

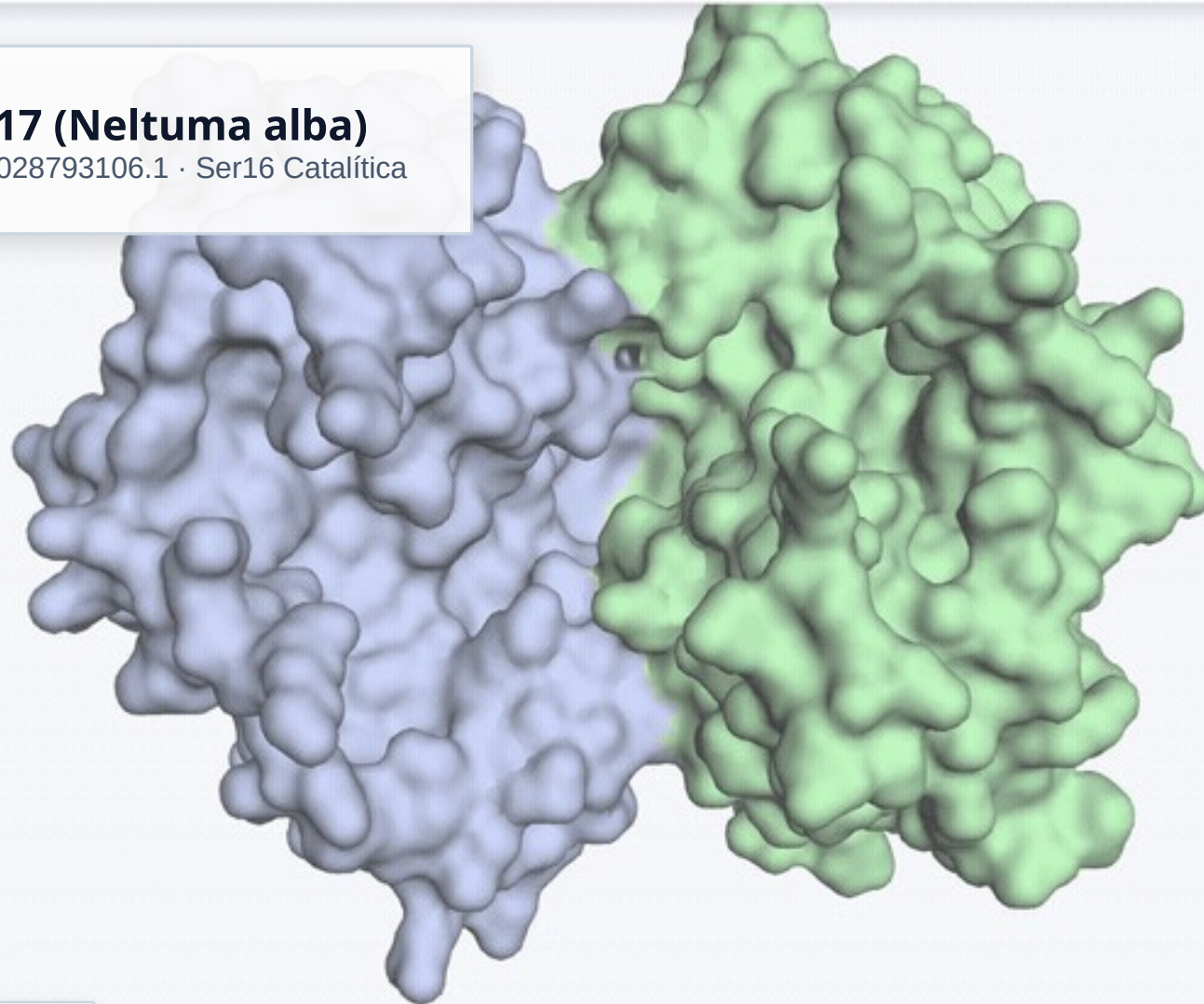
GSH (Sitio G)

GS-DNB (Sitio H)

TrxH (control -)

ISOFORMA GST U17 (Neltuma alba)

Homología 3D · NCBI: XP_028793106.1 · Ser16 Catalítica



Plataforma Interactoma
Modular

Ligando Acoplado: -- Seleccionar ligando --

Avances In Silico: Arquitectura Estructural 3D del Sitio

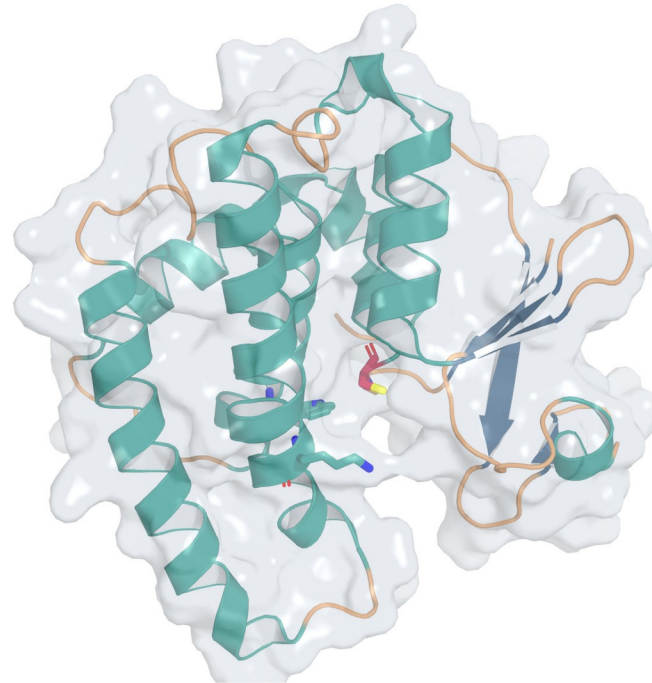
H

Comparativa Estructural 3D Tripartita: Procariota Extremófilo vs Bacteriano Heterótrofo vs Eucariota Vegetal

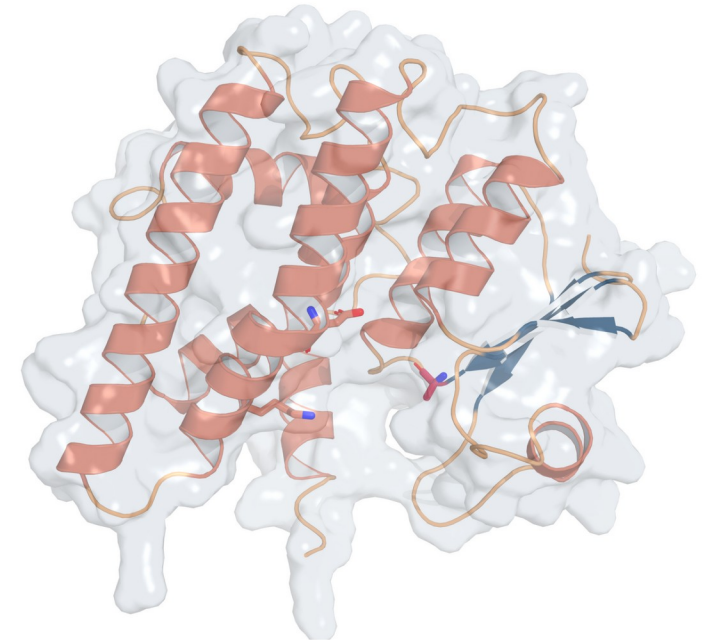
A) *Arthrospira platensis* (ApGST_01)
Superfamilia GHR | Cys81 Activa
Cavidad Expansiva: 1,140 Å³



B) *Escherichia coli* (EcGST_Beta 1N2A)
Modelo Christian Muñoz | Cys10 Activa
Cavidad Compacta: 680 Å³



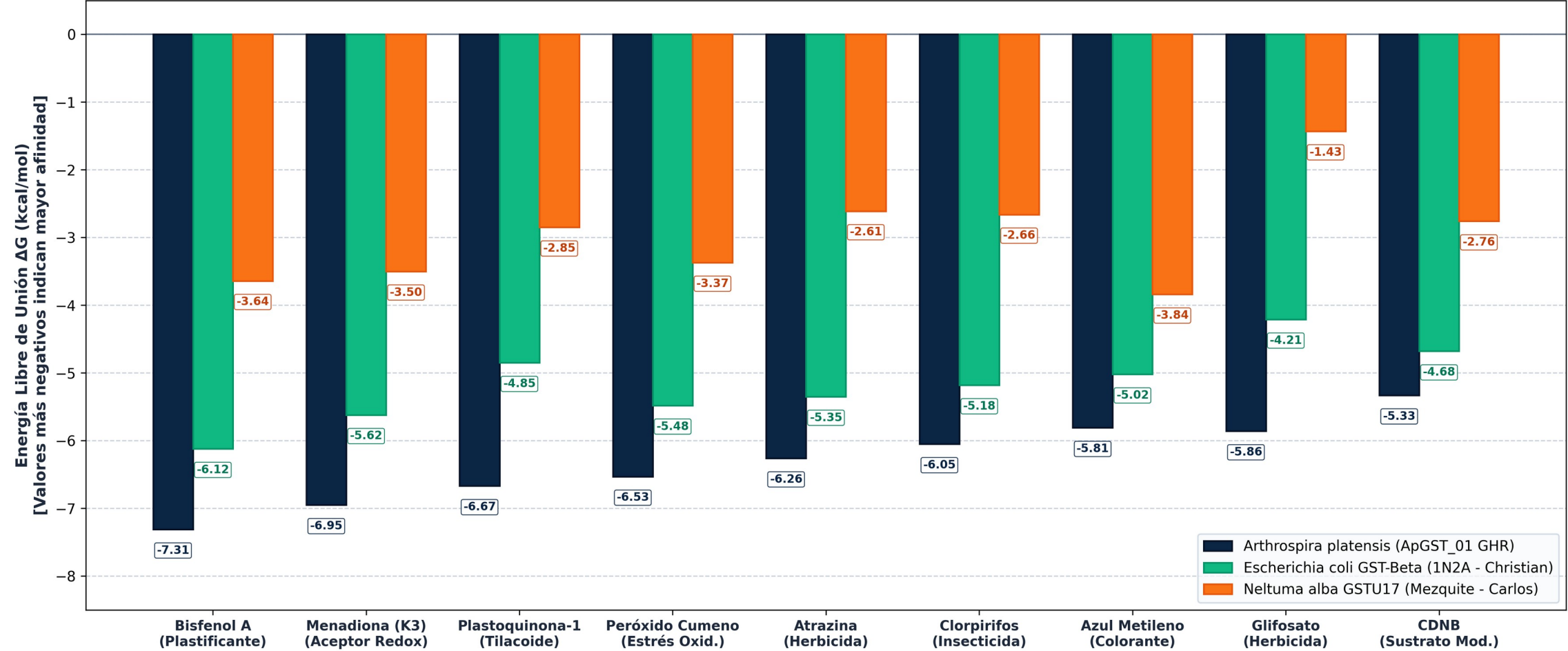
C) *Neltuma alba* (NaGSTU17 Mezquite)
Outgroup Vegetal Carlos Montejo | Ser13 Activa
Cavidad Estrecha: 412 Å³



Afinidad Química y Capacidad de Biorremediación

Multiligando

Figura: Ranking Comparativo de Afinidad de Docking Molecular Tripartito
Arthrospira platensis (GHR) vs. Escherichia coli (GST-Beta) vs. Neltuma alba (GSTU17)



PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN BACTERIANA:

Inserción del Plásmido en *E. coli* BL21 (DE3) mediante Choque Térmico

1. MEZCLA EN HIELO



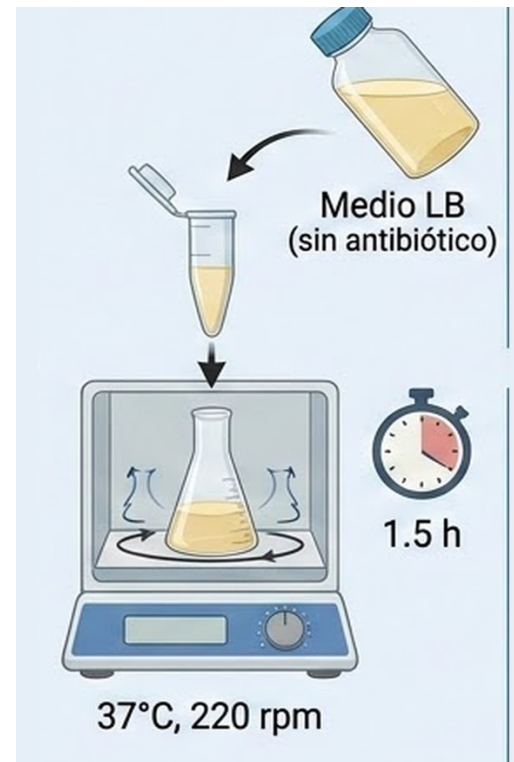
Incubar mezcla (plásmido + células) en hielo por **20 min.**
Agitar suavemente.

2. CHOQUE TÉRMICO (42°C) - CRÍTICO



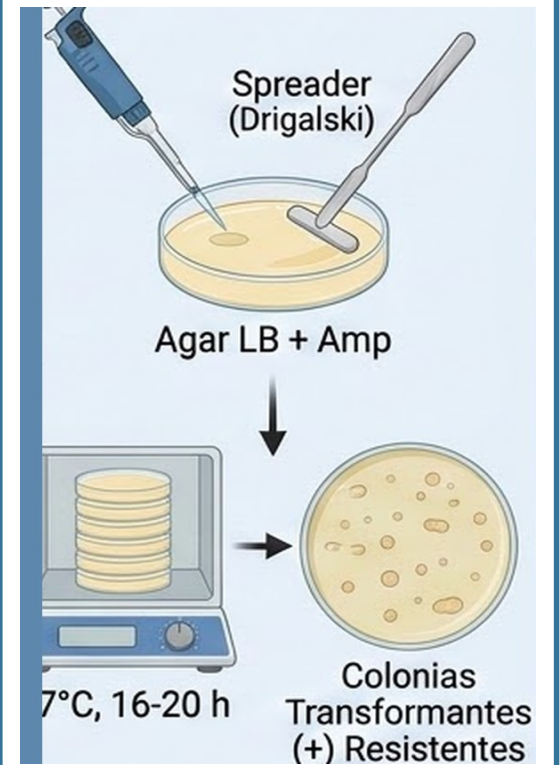
Transferencia rápida: 42°C por **EXACTAMENTE 30 s**, luego retorno inmediato al hielo.

3. RECUPERACIÓN (OUTGROWTH)



Añadir medio LB. Incubar con agitación a **37°C, 220 rpm** para expresión de resistencia.

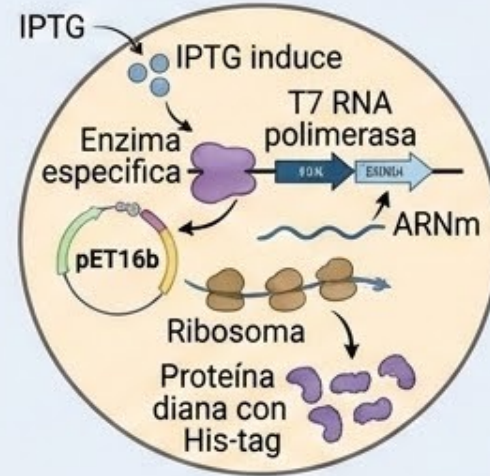
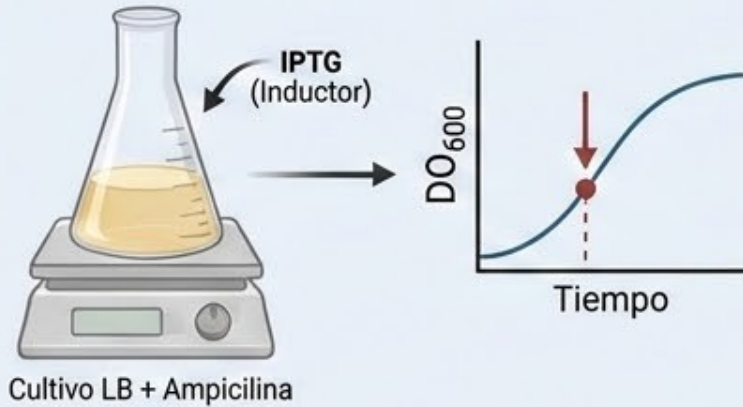
4. SELECCIÓN CON AMPICILINA



Sembrar en placa selectiva. Las colonias visibles a **37°C (16-20 h)** han incorporado el plásmido.

PROTOCOLO DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MEDIANTE EL SISTEMA pET E IMAC (Basado en Studier y colaboradores, 1990).

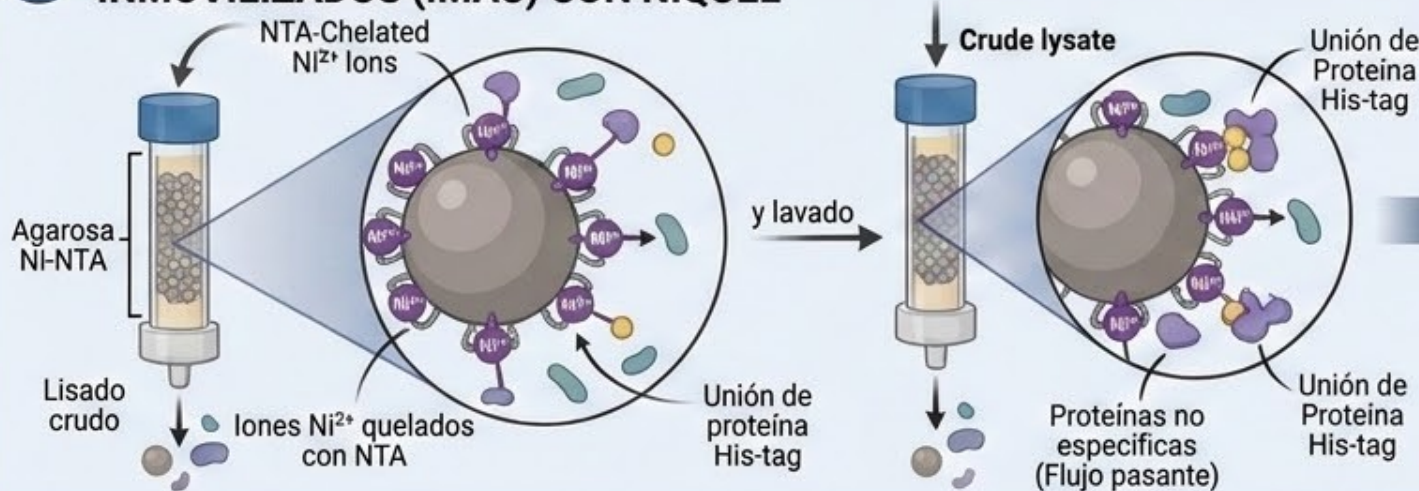
1 INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE



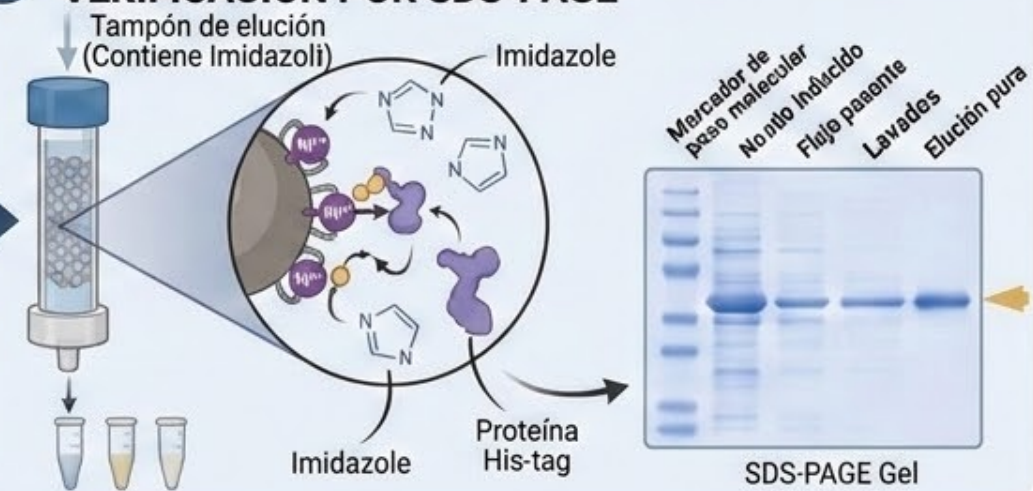
2 LISIS CELULAR Y CLARIFICACIÓN DEL LISADO



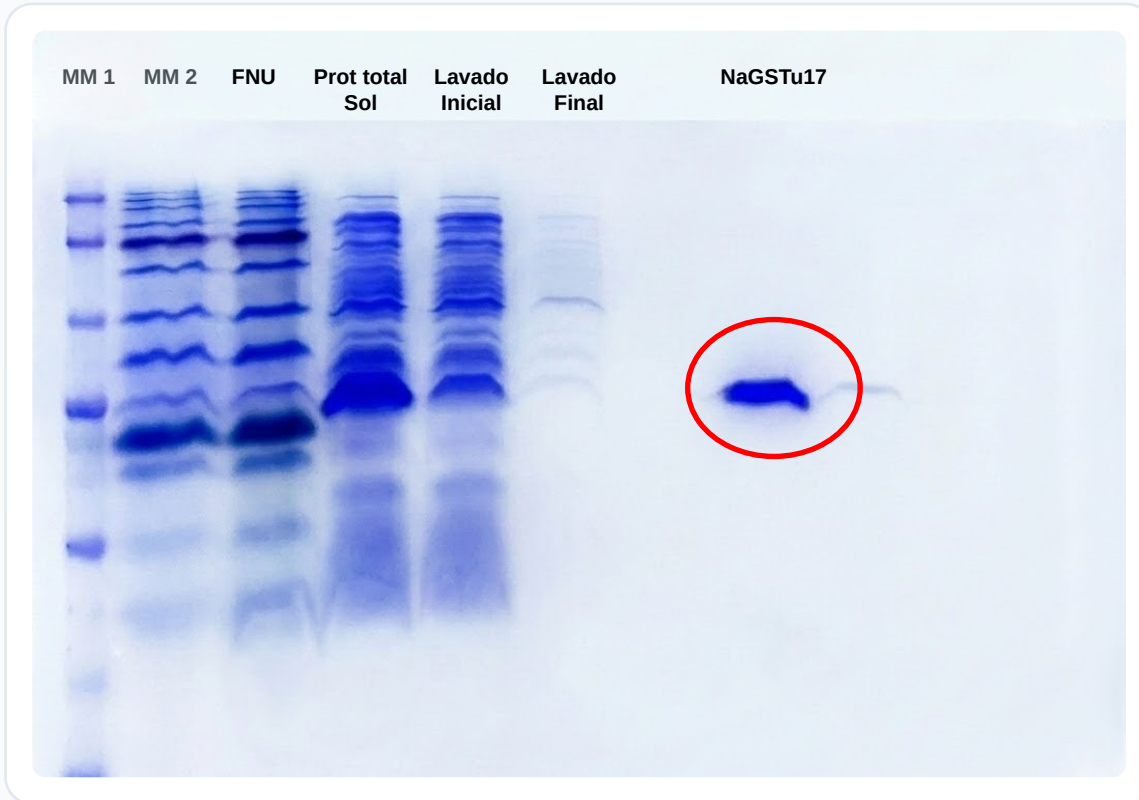
3 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METÁLICOS INMOVILIZADOS (IMAC) CON NÍQUEL



4 ELUCIÓN DE LA PROTEÍNA Y VERIFICACIÓN POR SDS-PAGE

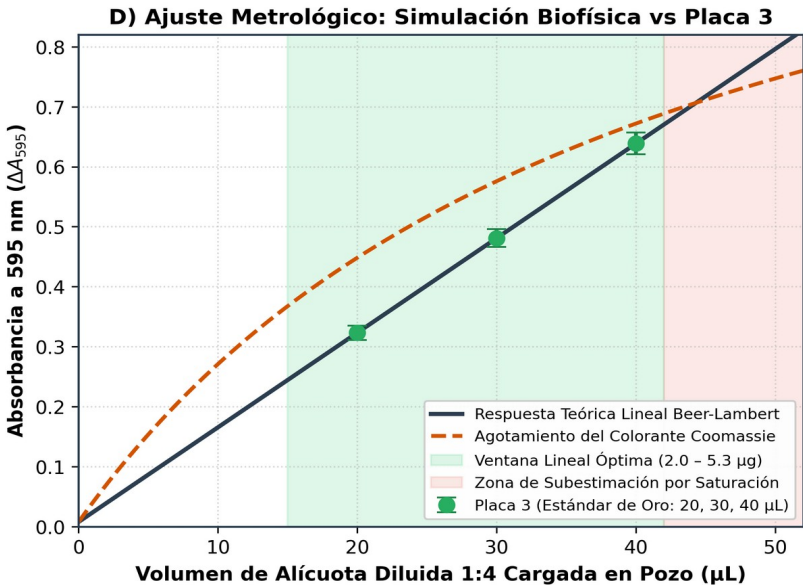
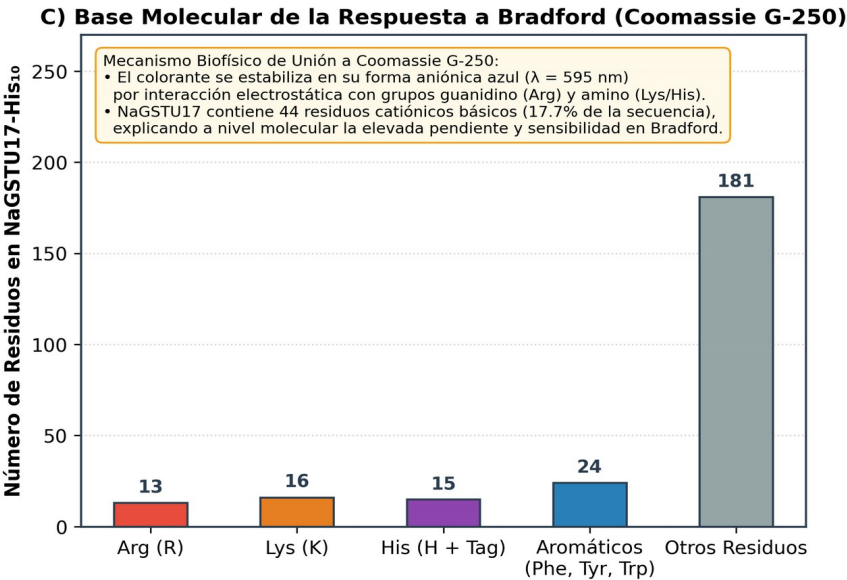
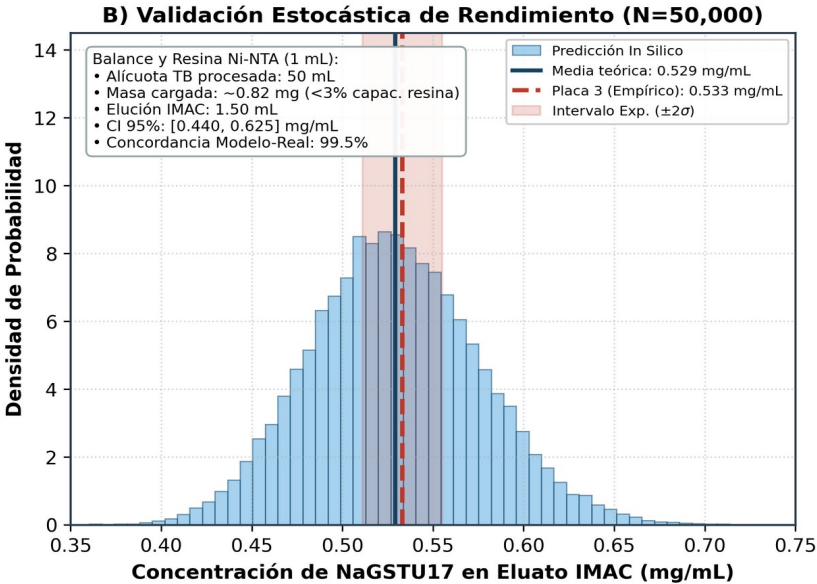
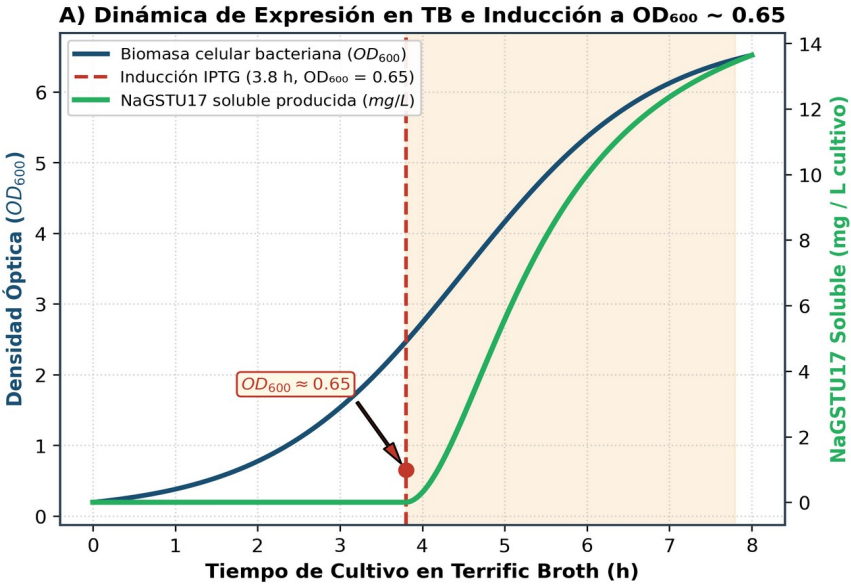


Análisis de la GST U17 de *Neltuma alba* por SDS-PAGE

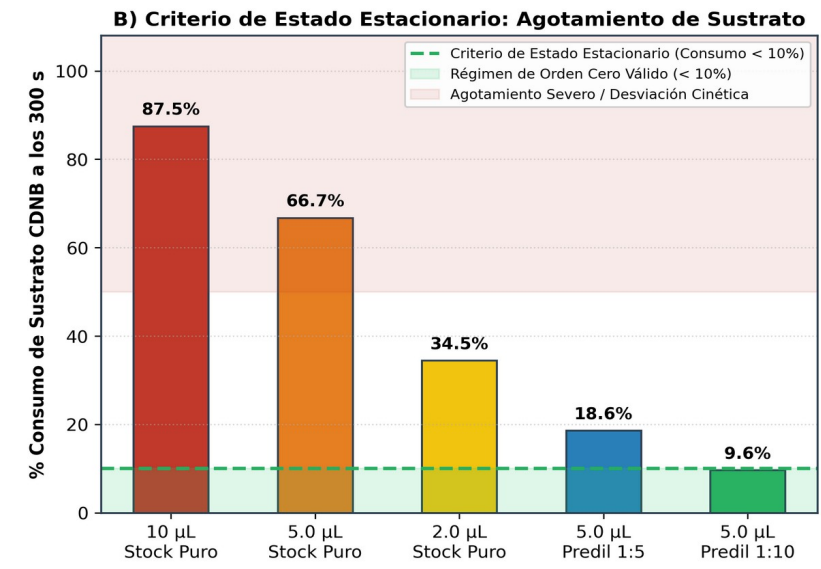
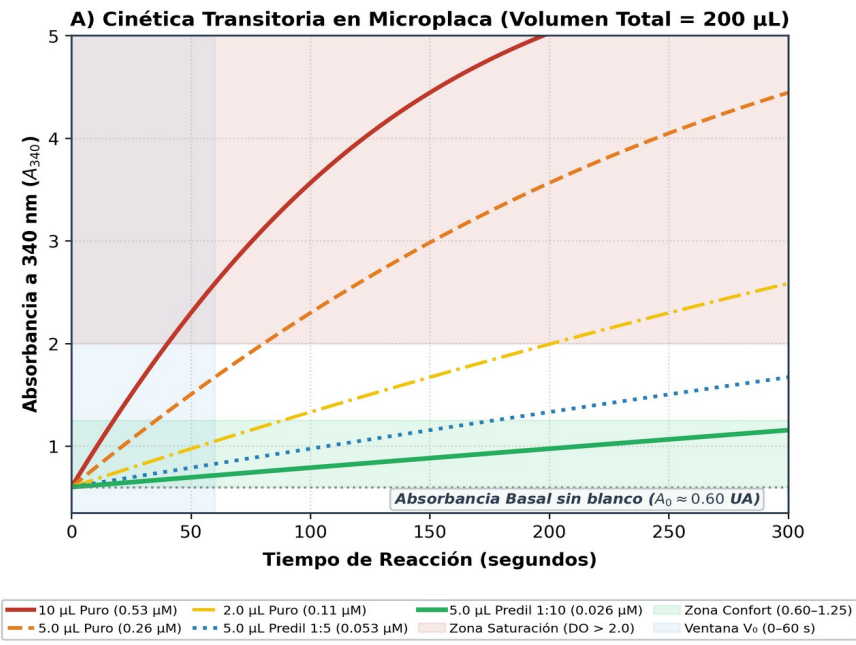


La proteína **NaGSTu17** presenta **229 aminoácidos**, un peso molecular teórico de **25.34 kDa** y un **pI teórico de 5.98**.

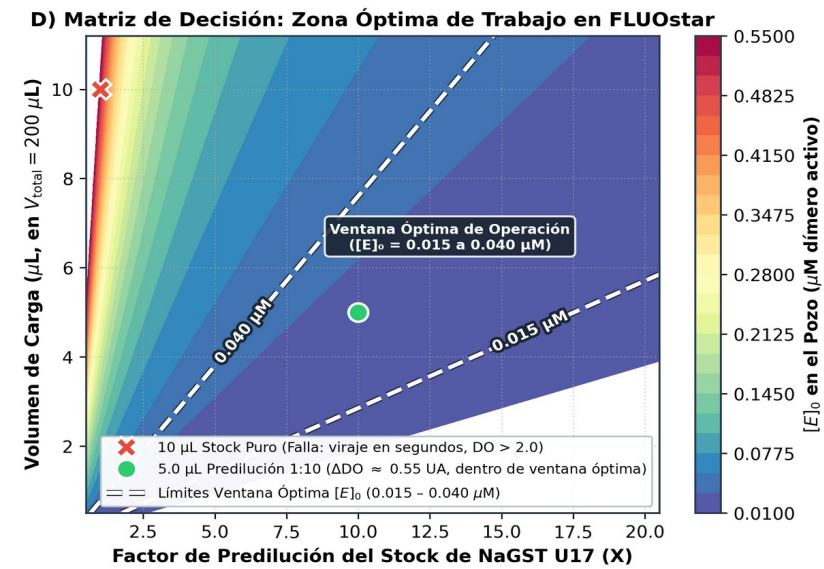
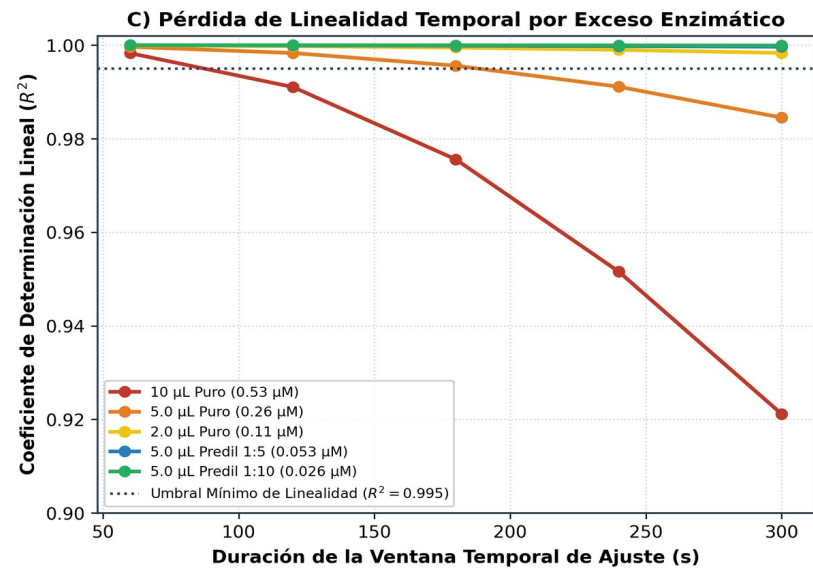
MODELADO IN SILICO DEL BIOPROCESO Y VALIDACIÓN BIOFÍSICA DE BRADFORD
Expresión de NaGST U17 en E. coli BL21(DE3) (50 mL TB, IPTG 0.25 mM) y Elución IMAC



MODELADO IN SILICO DE PROGRESIÓN TEMPORAL Y OPTIMIZACIÓN DE $[E]_0$ (200 μ L)
Ventana Óptica Experimental: Absorbancia Basal $A_0 \approx 0.60$ UA y Límite Lineal $A_{340} \leq 2.00$ UA



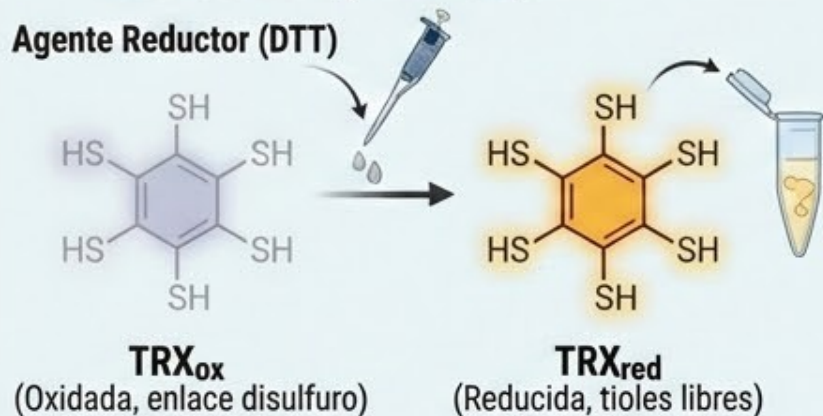
Diagnóstico del Viraje Prematuro y Rango Óptimo de DO (0.60 a 2.00 UA) :
• Sin blanco previo: $A_0 \approx 0.60$ UA (buffer + CDNB + fondo del pozo). • 10 μ L puro: 87.5% consumo, DO > 2.0 en < 55 s (viraje prematuro).
• 5.0 μ L Predilución 1:10: consumo de solo 9.6% ($\Delta A \approx 0.55$ UA; $A_{\text{final}} \approx 1.15$ UA, régimen lineal estable y alta fidelidad).



Determinación de la Cinética de la GPX Vegetal

(Martínez y colaboradores, 2023)

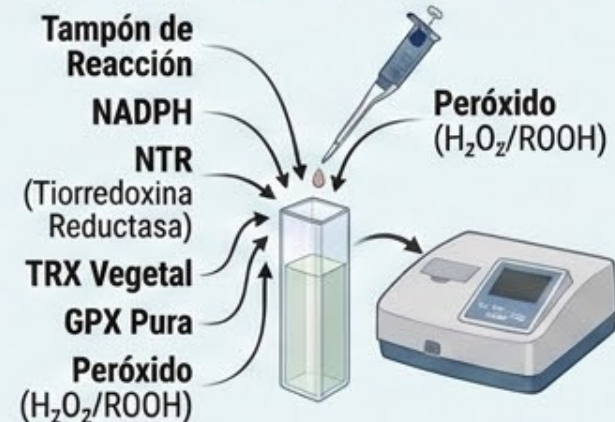
1 PREPARACIÓN DE TIORREDOXINA REDUCIDA (TRXred).



2 MECANISMO CATALÍTICO DE GPX-TRX.



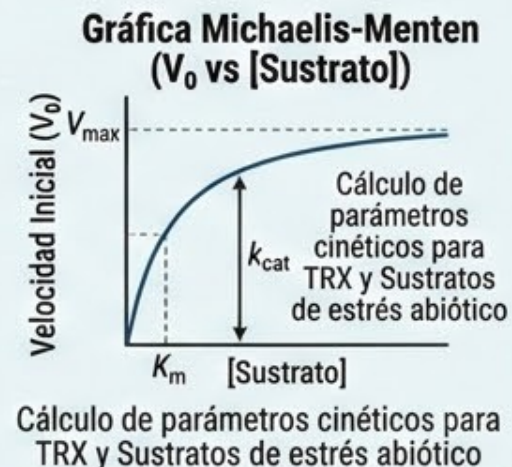
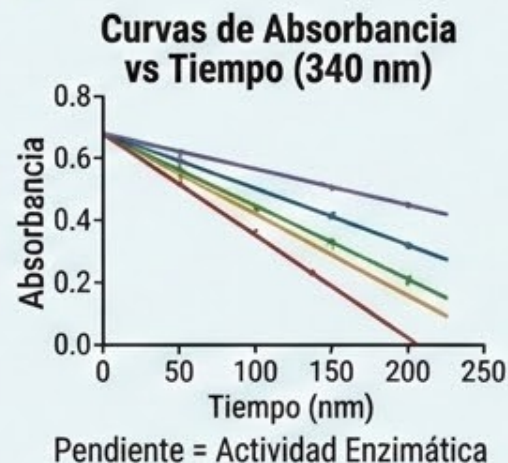
3 MONTAJE DEL ENSAYO CINÉTICO ACOPLADO.



4 PRINCIPIO DE MEDICIÓN DE NADPH.



5 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y PARÁMETROS.

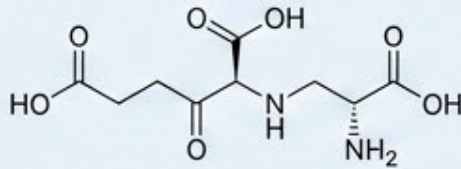


Cinética de la GST vegetal (García y colaboradores, 2023)

1

PREPARACIÓN DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)

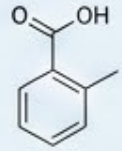
Pesaje y Disolución de GSH



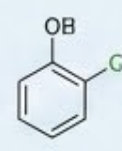
GSH disuelto en Tampón (pH ~6.5)

2

MECANISMO DE LA CONJUGACIÓN DE LA GST CON EL CDNB



GSH



CDNB



GST

El conjugado DNP-GSH tiene un máximo de absorbancia a 340 nm.

El conjugado DNP-GSH tiene un máximo de absorbancia a 340 nm

3

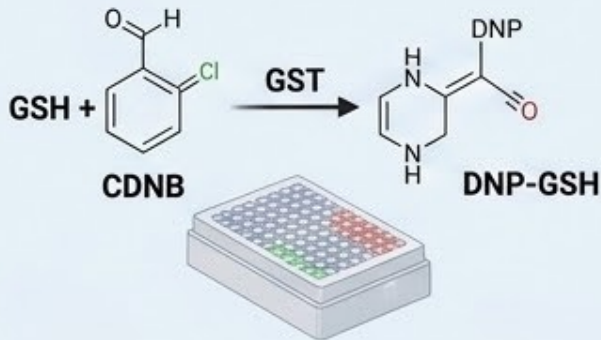
MONTAJE DEL ENSAYO CINÉTICO DIRECTO

- **Tampón de Reacción** (p. ej., tampón fosfato 100 mM, pH 6.5).
- **Muestra Enzimática** (que contiene GST).
- **Muestra de GSH** (Sustrato nucleofílico, 1-10 mM final)
- **Muestra de CDNB** (Sustrato electrofílico, 0.5-2 mM en Etanol/Metanol)
- **Agua (H₂O)** (para ajustar el volumen).



4

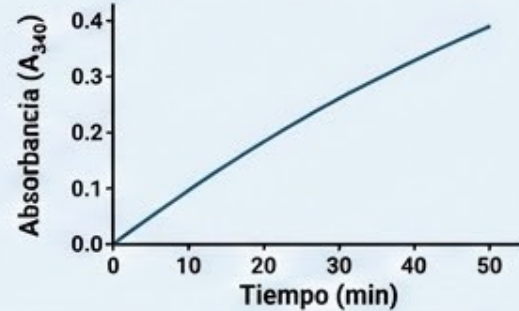
PRINCIPIO DE MEDICIÓN DE LA FORMACIÓN DE PRODUCTO



CDNB

DNP-GSH

Formación del DNP-GSH a 340 nm



Tasa de formación de DNP-GSH (aumento de A₃₄₀) es proporcional a la actividad de la GST.

5

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y PARÁMETROS

Curvas de formación del DNP-GSH frente al tiempo

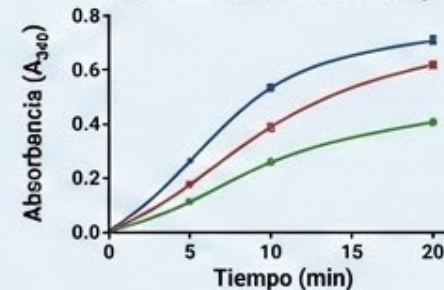
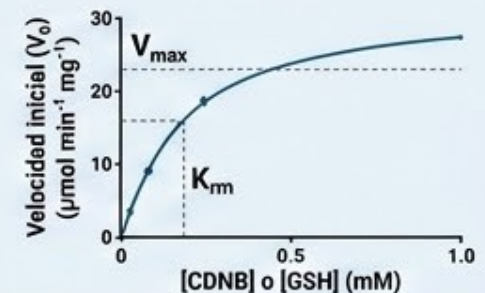


Gráfico de Michaelis-Menten



Cálculo de parámetros cinéticos (K_m, V_{max}, k_{cat}) para GST con CDNB y GSH.

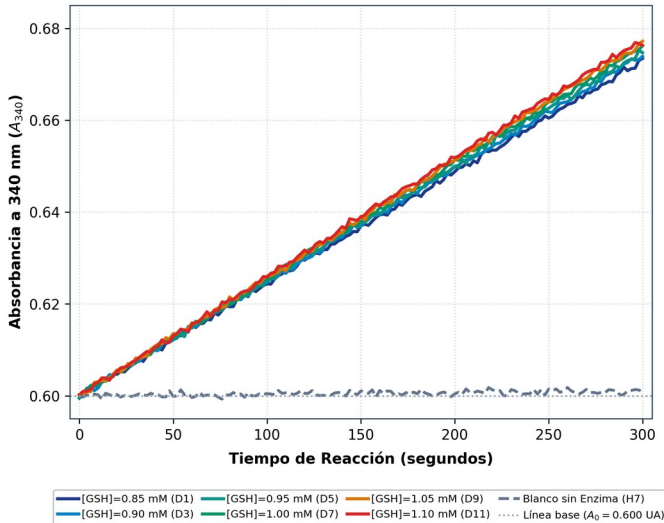
Cálculo de Actividad Específica (U/mg) usando el coeficiente de extinción del DNP-GSH ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Velocidad = Pendiente ($\Delta A_{340}/\text{min}$).

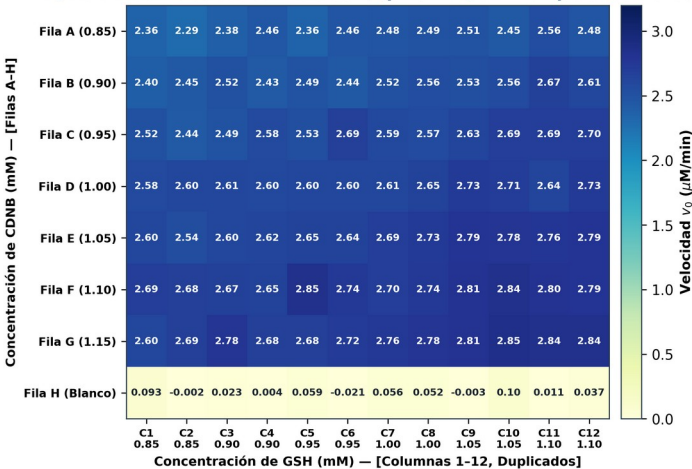
Simulación In Silico 96 Pozos y Análisis de Monte Carlo

MODELADO IN SILICO Y DISEÑO DE MICROPLACA DE 96 POZOS (NaGST U17 · 200 μ L)
Condición Estandarizada: Predilución 1:10 ($[E]_0 = 0.053 \mu\text{M}$ sitios activos) · Ventana Lineal $A_{340} \in [0.60, 1.25]$ UA

A) Curvas de Avance Continuo: Fila D ([CDNB] fijo = 1.00 mM vs. Blanco H7)
Gradiente de [GSH] (D1 a D11: 0.85 a 1.10 mM)

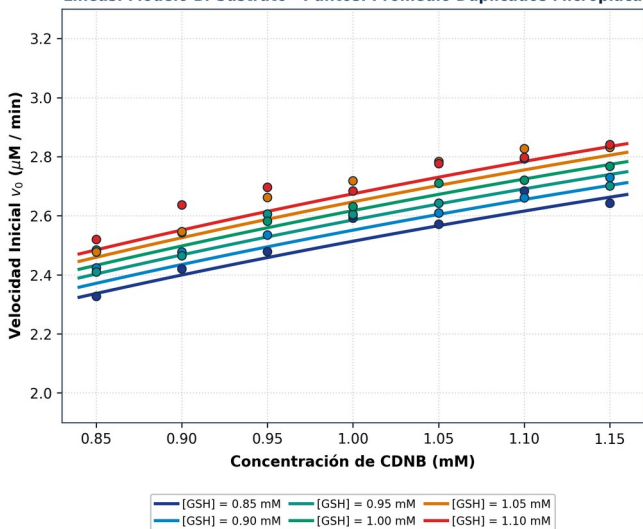


B) Matriz de Velocidades Iniciales v_0 ($\mu\text{M} / \text{min}$) en Microplaca 96 Pozos

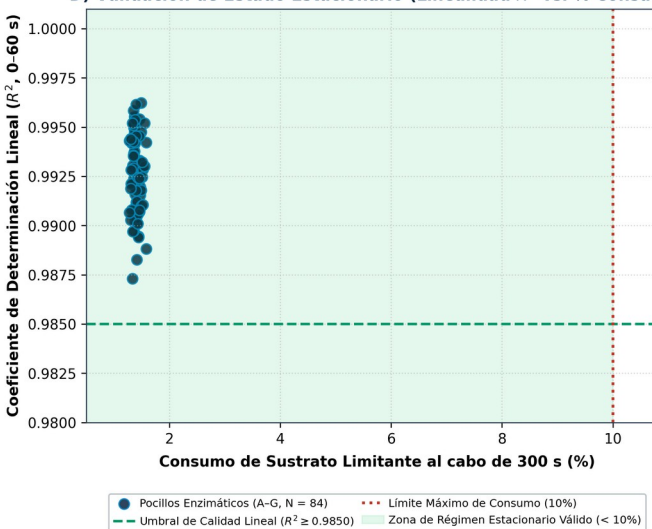


Distribución Espacial: Filas A-G = Cinética enzimática ($v_0 \in [2.10, 3.10] \mu\text{M}/\text{min}$, $\Delta A_{340} \approx 0.06 - 0.09$ UA en 300 s).
Fila H = 12 Blancos sin enzima (hidrólisis no enzimática espontánea, $v_{\text{spont}} \approx 0.035 \mu\text{M}/\text{min}$, $\Delta A_{340} \approx 0.001$ UA).

C) Cinética de Saturación vs. [CDNB] para las 6 Series de [GSH]
Líneas: Modelo Bi-Sustrato · Puntos: Promedio Duplicados Microplaca

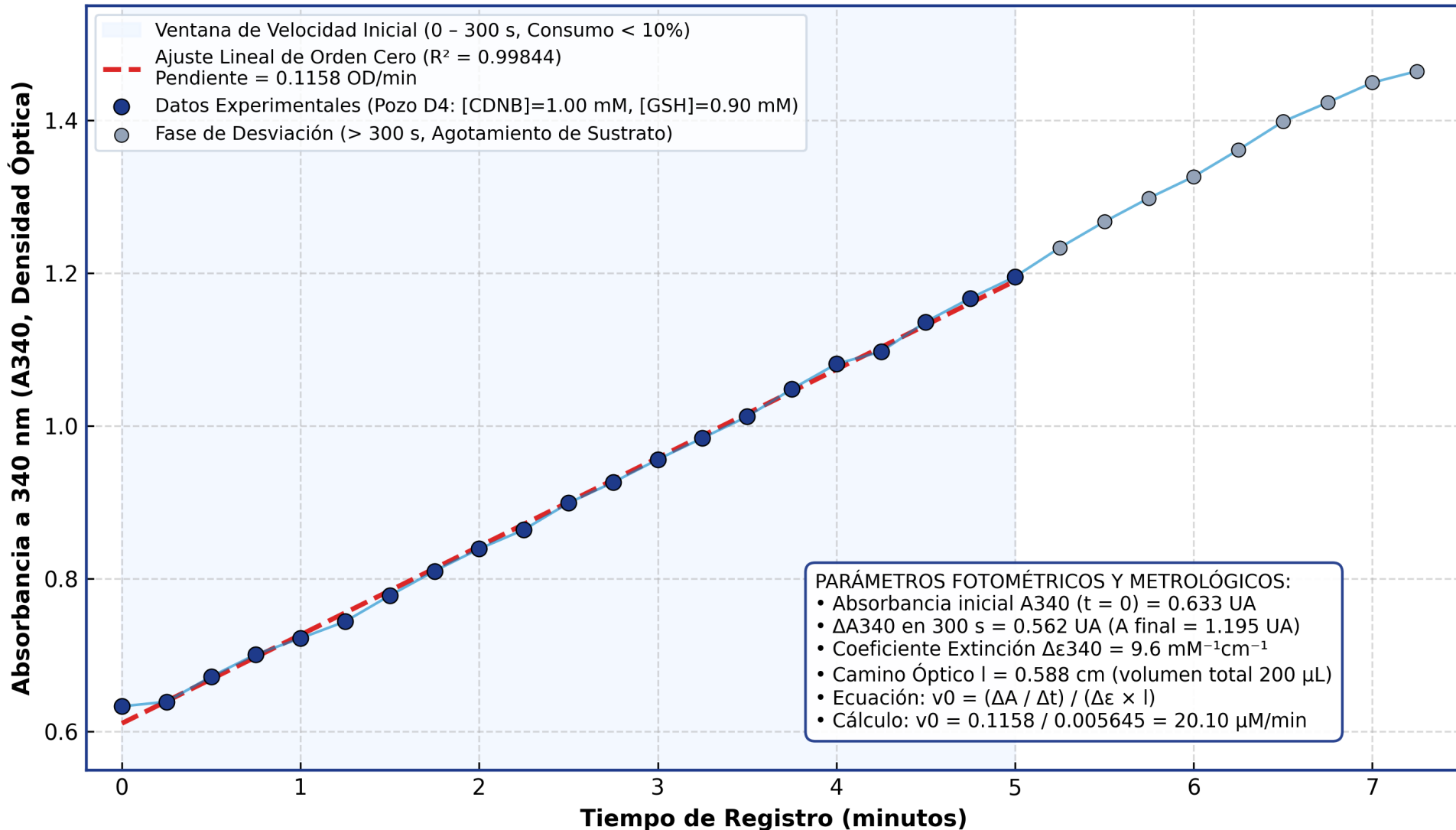


D) Validación de Estado Estacionario (Linealidad R^2 vs. % Consumo)



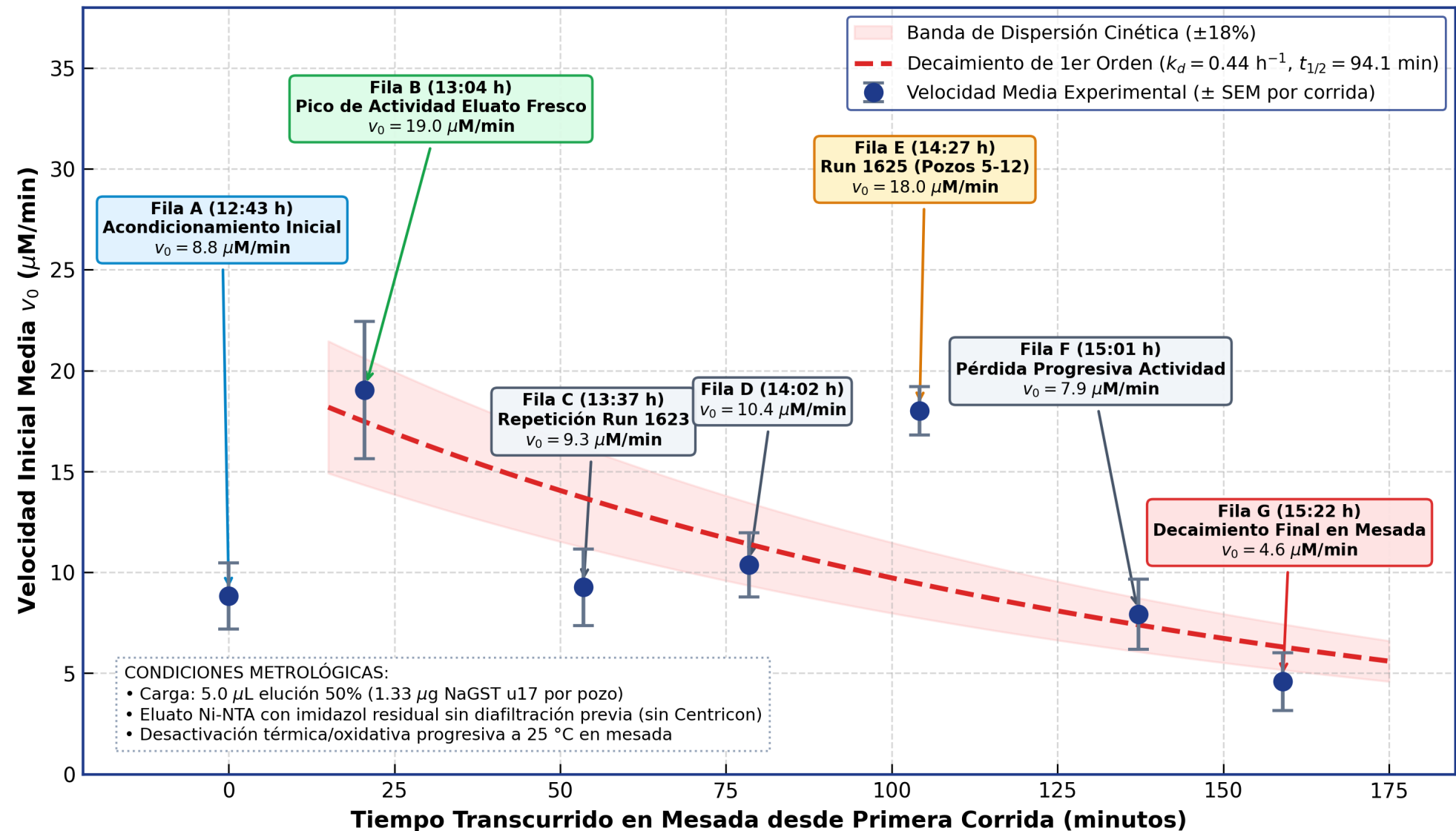
Cinética In Vitro: Monitoreo a 340 nm y Curado de Microturbidez

Curso Temporal Representativo de Avance Espectrofotométrico a 340 nm
(NaGST u17 en Microplaca de 96 Pozos, BMG FLUOstar Omega)



Estabilidad Temporal de NaGST u17 en Eluato Crudo (Mesada de Trabajo)

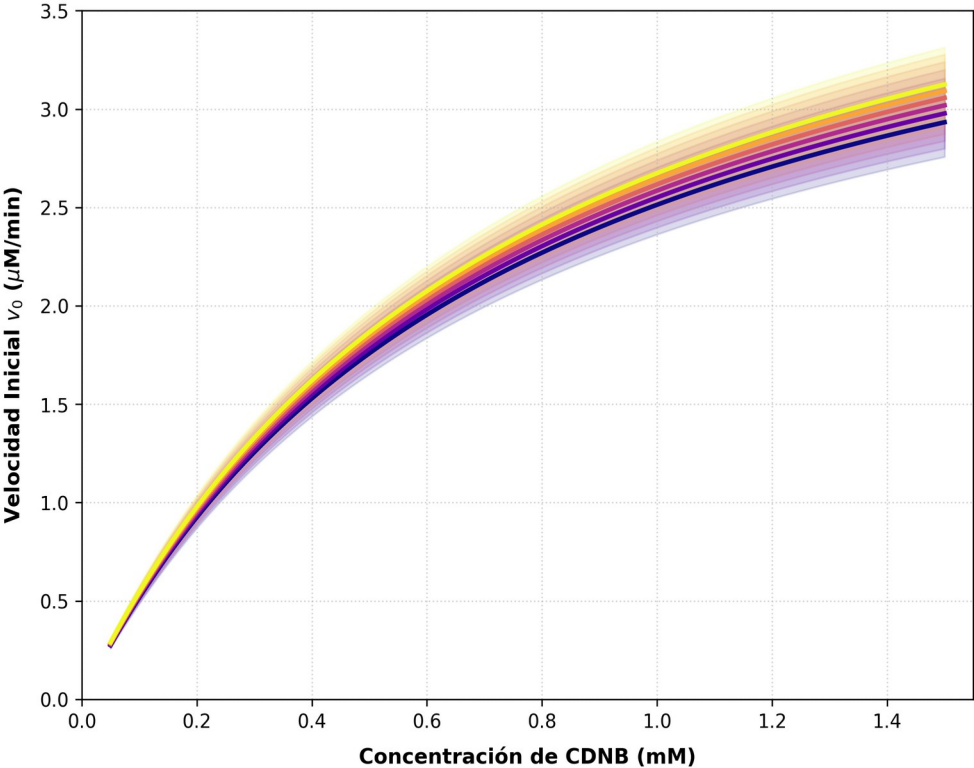
Estabilidad Temporal de NaGST u17 en Eluato Crudo (Mesada de Trabajo)



Validación Cruzada In Silico vs. In Vitro: Cinética Bi-Sustrato (CDNB y

Plantilla Receptora de Validación Cruzada: Modelo Predictivo Bi-Sustrato vs. Espectrofotometría
Familias de Curvas Continuas Primarias y Envoltentes de Tolerancia ($\pm 6\%$ CI 95%) para Acoplamiento con FLUOstar Omega

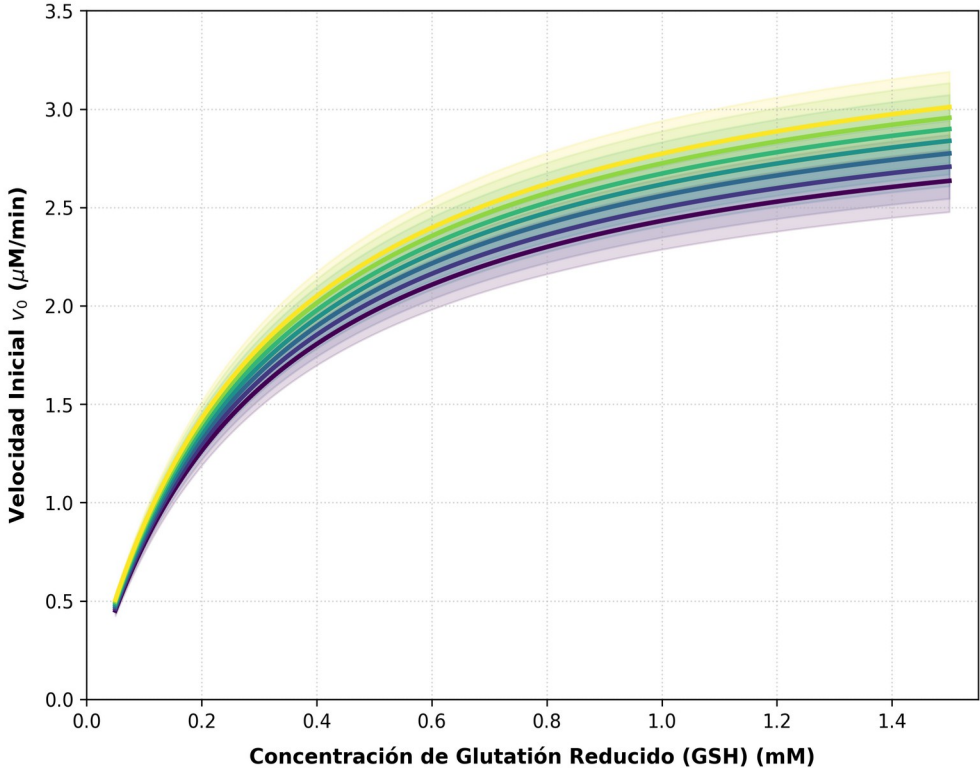
A) Saturación Primaria de CDNB (Sustrato Variable)
Series a diferentes [GSH] fijas (0.85 a 1.10 mM)



Series de Glutatión Reducido (GSH fijo)

[GSH] = 0.85 mM	[GSH] = 0.95 mM	[GSH] = 1.05 mM
[GSH] = 0.90 mM	[GSH] = 1.00 mM	[GSH] = 1.10 mM

B) Saturación Primaria de GSH (Co-Sustrato Variable)
Series a diferentes [CDNB] fijas (0.85 a 1.15 mM)



Series de CDNB (sustrato aromático fijo)

[CDNB] = 0.85 mM	[CDNB] = 0.95 mM	[CDNB] = 1.05 mM	[CDNB] = 1.15 mM
[CDNB] = 0.90 mM	[CDNB] = 1.00 mM	[CDNB] = 1.10 mM	

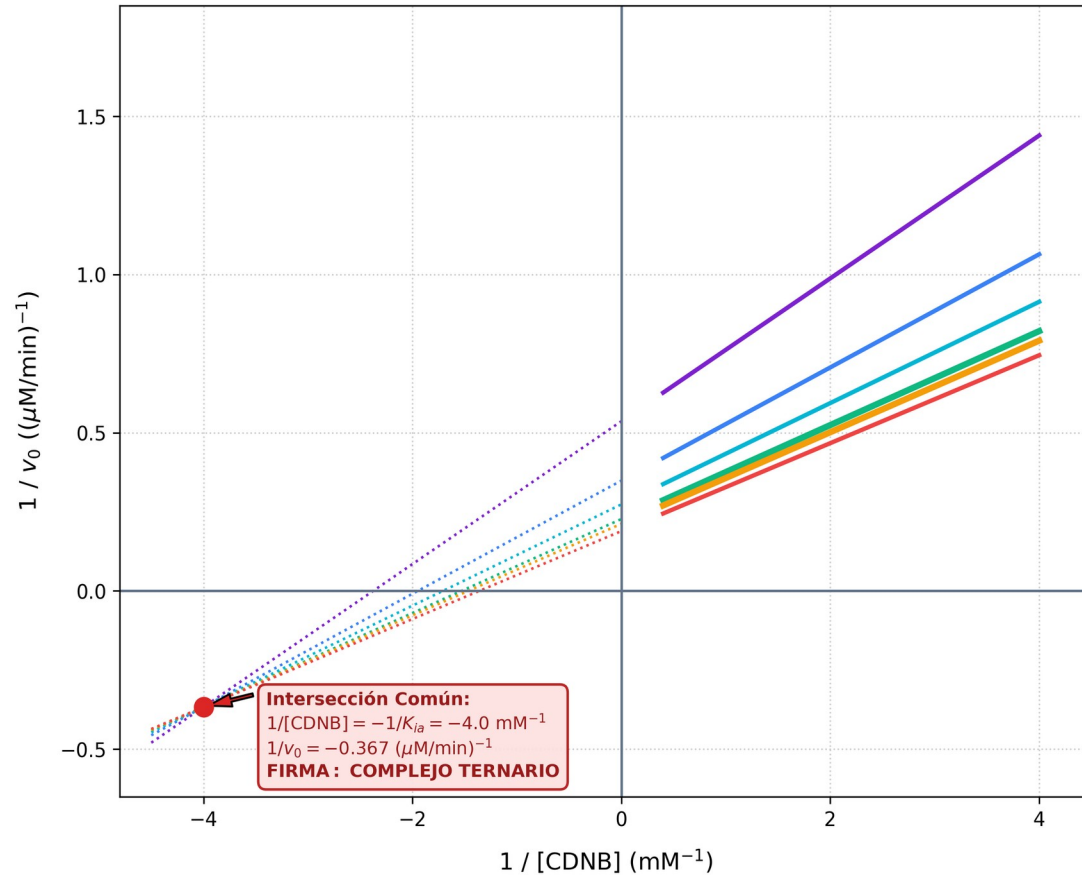
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN EXPERIMENTAL CRUZADA (WET – LAB vs. DRY – LAB):

- **Instrumento:** Lector BMG LABTECH FLUOstar Omega ($\lambda = 340$ nm, 300 s, lectura cada 2 s, 200 μ L/pozo en placa de 96 pozos UV-Star).
- **Condición de Reacción:** 5.0 μ L de predilución 1:10 (0.2665 μ g de enzima; $[E]_0 = 52.6$ nM sitios activos); tampón fosfato 100 mM pH 6.5 a 25 °C.
- **Diseño Bi – Sustrato:** Panel A mapea las Filas de la placa (CDNB variable a GSH constante); Panel B mapea las Columnas (GSH variable a CDNB constante).
- **Criterio de Aceptación:** Datos reales promedio ($\pm$ DE, $n = 2$ réplicas técnicas) dentro de la envoltura predictiva sombreada ($\pm 6\%$ CI 95%).

Diagnóstico Mecanístico Bi-Bi (Lineweaver-Burk)

Diagnóstico Mecanístico Bi-Sustrato: Análisis de Dobles Recíprocos de Lineweaver-Burk
Demostración Biofísica de Formación de Complejo Ternario Secuencial ($E \cdot \text{GSH} \cdot \text{CDNB}$) en NaGST U17

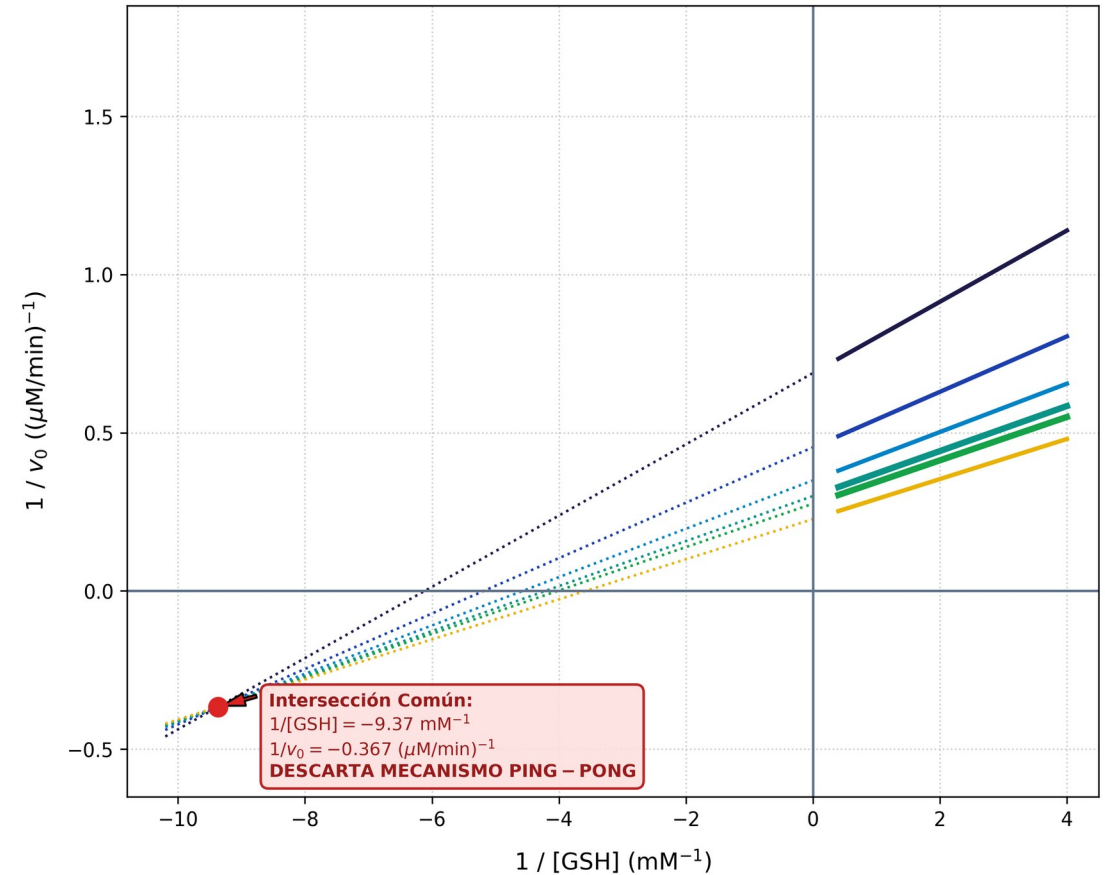
A) Dobles Recíprocos respecto a CDBN (Sustrato Variable)
Convergencia Obligada: Demostración de Complejo Ternario Secuencial



Series a diferentes [GSH] (★ = rango microplaca)

— [GSH] = 0.15 mM	— [GSH] = 0.85 mM ★ (Placa 96 pozos)
— [GSH] = 0.30 mM	— [GSH] = 1.10 mM ★ (Placa 96 pozos)
— [GSH] = 0.50 mM	— [GSH] = 2.00 mM

B) Dobles Recíprocos respecto a GSH (Co-Sustrato Variable)
Exclusión de Ping-Pong: Las Rectas Convergen (No son Paralelas)



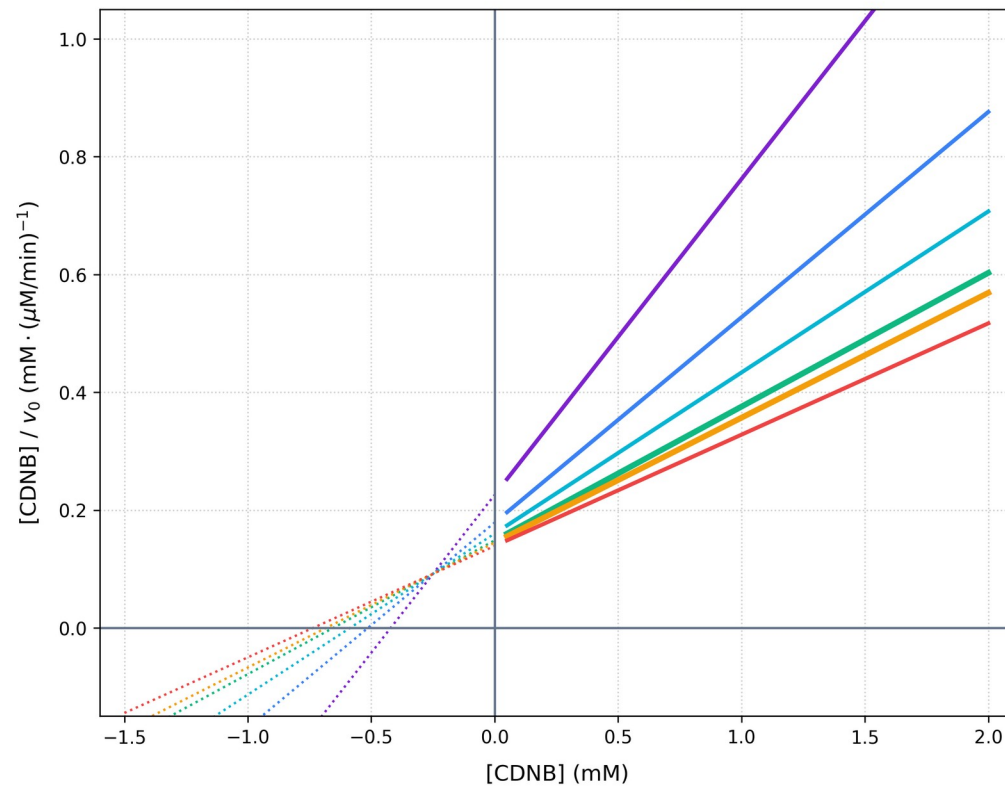
Series a diferentes [CDNB] (★ = rango microplaca)

— [CDNB] = 0.25 mM	— [CDNB] = 0.95 mM ★ (Placa 96 pozos)
— [CDNB] = 0.45 mM	— [CDNB] = 1.15 mM ★ (Placa 96 pozos)
— [CDNB] = 0.70 mM	— [CDNB] = 2.00 mM

Validación Ortogonal de Varianza Homogénea (Hanes-Woolf)

Diagnóstico Mecanístico Bi-Sustrato: Análisis Lineal de Hanes-Woolf ($[S]/v_0$ vs. $[S]$)
Alternativa Metrológica de Varianza Homogénea para Validación Cinética en NaGST U17

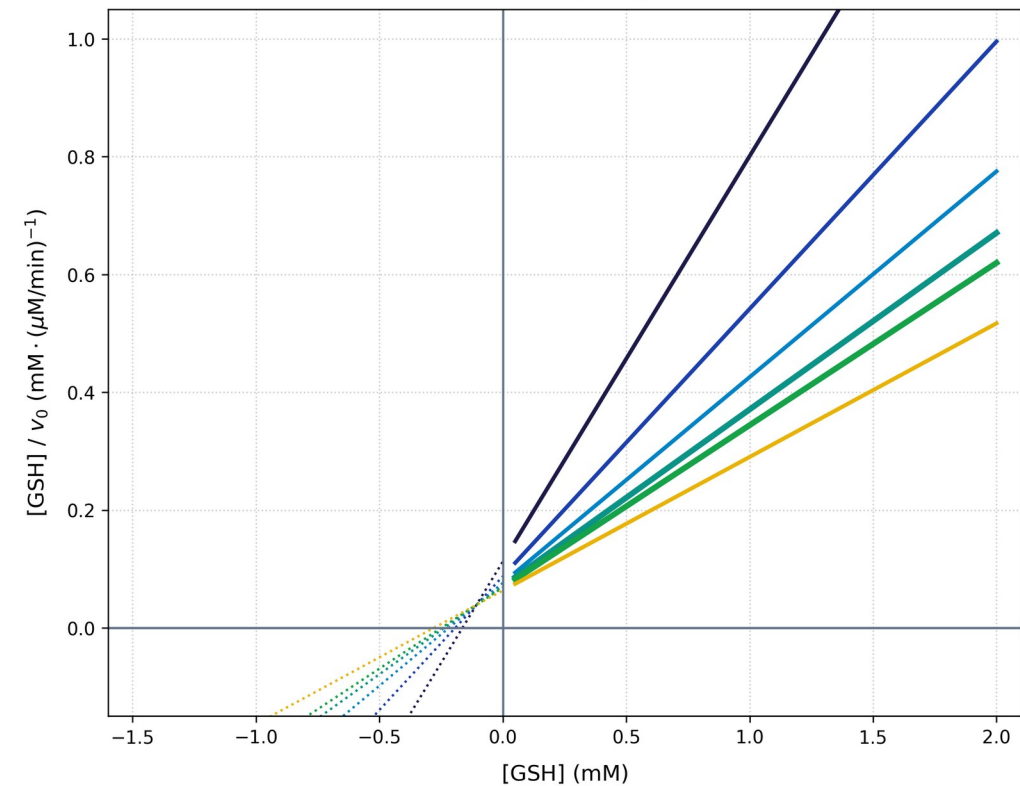
A) Representación de Hanes-Woolf respecto a CDNB (Sustrato Variable)
[CDNB] en Eje X sin Inversión: Distribución Homogénea de Varianza Residual



Series a diferentes [GSH] (★ = rango microplaca)

[GSH] = 0.15 mM	[GSH] = 0.85 mM ★ (Placa 96 pozos)
[GSH] = 0.30 mM	[GSH] = 1.10 mM ★ (Placa 96 pozos)
[GSH] = 0.50 mM	[GSH] = 2.00 mM

B) Representación de Hanes-Woolf respecto a GSH (Co-Sustrato Variable)
Pendiente = $1/V_{max}^{ap}$ e Intercepto = K_m^{ap}/V_{max}^{ap} : Evaluación de Pendientes



Series a diferentes [CDNB] (★ = rango microplaca)

[CDNB] = 0.25 mM	[CDNB] = 0.95 mM ★ (Placa 96 pozos)
[CDNB] = 0.45 mM	[CDNB] = 1.15 mM ★ (Placa 96 pozos)
[CDNB] = 0.70 mM	[CDNB] = 2.00 mM

Correlación *In Vivo*: Mecanismo de Señalización y Respuesta Estomática

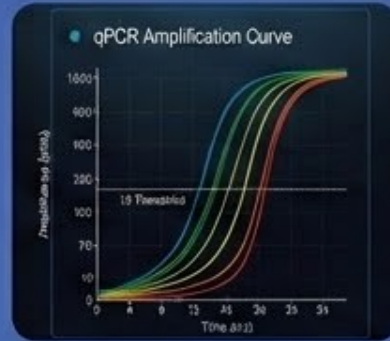
Vinculando la Expresión Génica con la Función Fisiológica en Hojas de *Neltuma alba*



N2
Muestreo

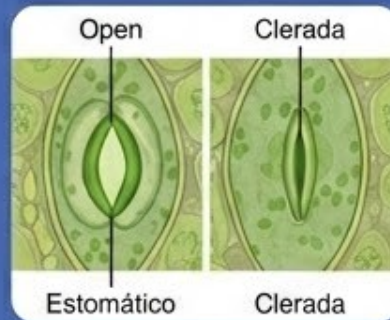
Paso 1: RT-qPCR de GPX y GST

Cuantificación de transcritos (ARNm) de las GST sometidas a estrés hídrico/luminico.



Paso 2: Microscopía de Estomas

Microscopía de Estomas histolólías para determinar porcentaje de estomas cerrados.



ANÁLISIS DE
CORRELACIÓN
ESTADÍSTICA E
INTERPRETACIÓN

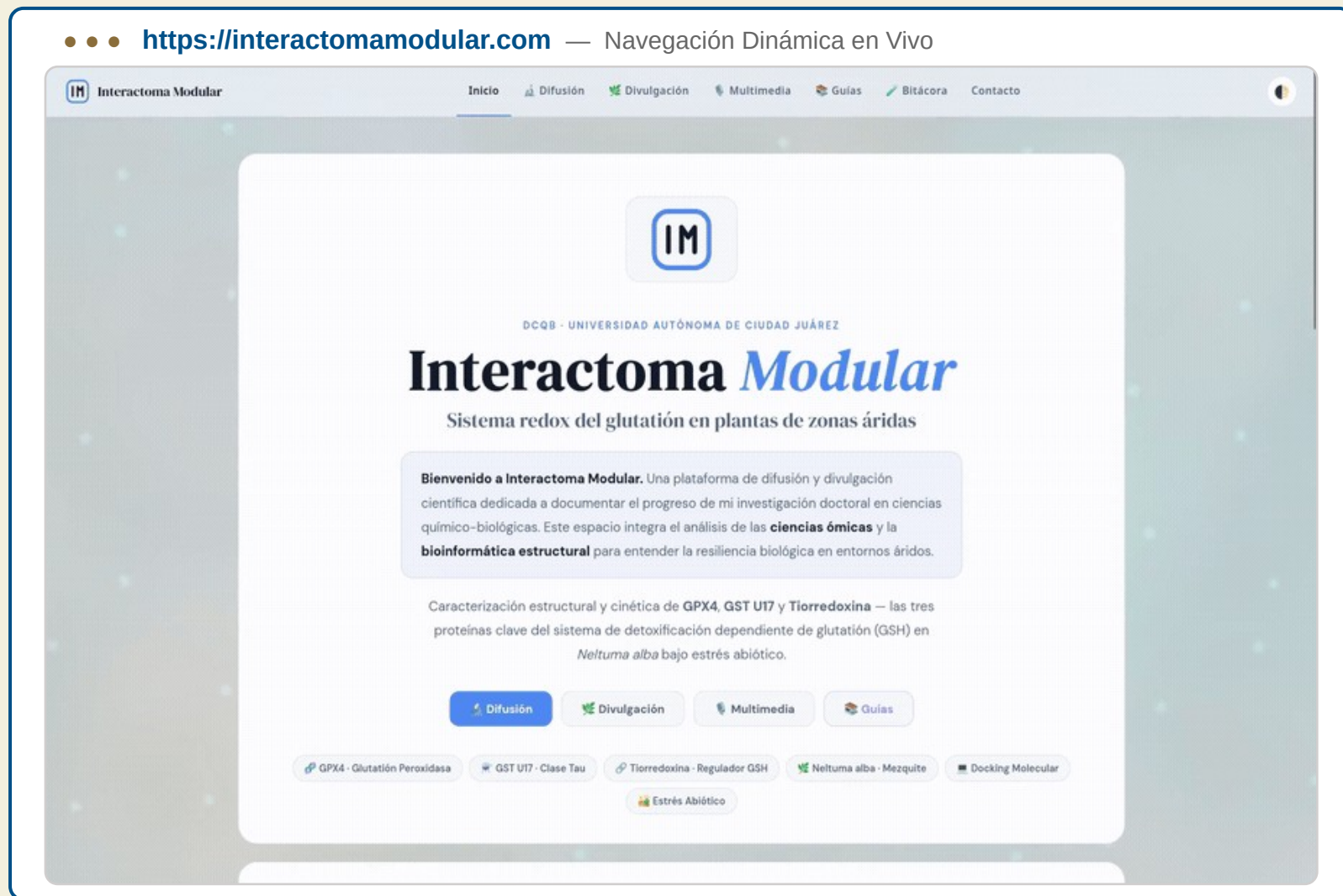


Interpretación Biológica de Resultados

El pico de sobreexpresión de la isoforma (qPCR) se asocia directamente con la magnitud del cierre estomático (Microscopía).

Esto interpreta una función de GPX/GST como señalizadores clave en la respuesta de defensa para regular la transpiración.

Plataforma Web Interactoma Modular (interactomamodular.com)



Acceso a página web

Escanea el código QR con tu dispositivo móvil

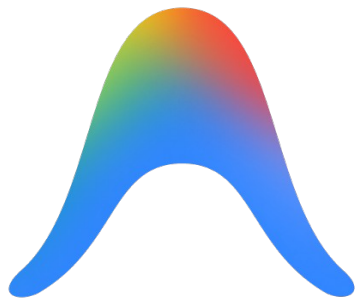


- **Divulgación y 3D:** Estructuras moleculares interactivas, docking y andamiajes de enzimas redox.
- **Recursos Académicos:** Protocolos y guías de laboratorio para licenciatura y posgrado.
- **Acceso Abierto:** Bitácora científica y datos reproducibles de la tesis doctoral.

Declaración sobre el Uso de Inteligencia Artificial

Google Antigravity

- **Entorno Científico Asistivo:** Empleo de agentes computacionales para la aceleración de tareas técnicas repetitivas.
- **Conformidad Normativa:** Alineación estricta con las políticas de ética académica de la UACJ y el CONAHCYT.
- **Integridad Intelectual:** La IA operó como herramienta de cálculo y procesamiento, sin sustituir la autoría ni el juicio crítico.



1. Minería y Curación Bioinformática In Silico

- **Recuperación de Datos Genómicos:** Asistencia en la extracción y comparación de secuencias homólogas (NCBI RefSeq, UniProtKB, AlphaFold DB).
- **Alineamientos Estructurales:** Verificación automatizada de conservación de andamiajes tioredoxina entre familias vegetales y cianobacterianas.

2. Automatización de Scripts y Cálculos Cinéticos

- **Flujo de Acoplamiento GPU:** Automatización y control de calidad de scripts de preparación para AutoDock Vina y análisis de poses.
- **Metrología Experimental:** Ajustes lineales de regresión para microplaca Bradford (BMG SPECTROstar Omega) y calibración de dilución a $[E] = 0.10 \mu\text{M}$.

3. Supervisión Humana y Validación Empírica Estricta

- **Criterio Científico del Investigador:** Las hipótesis, selección de dianas y diseño experimental son autoría directa de Carlos Montejo y codirectores.
- **Validación en Mesa de Laboratorio:** Toda inferencia in silico fue confirmada empíricamente mediante expresión en TB, purificación Ni^{2+} -NTA y cinética UV-Vis.

Referencias Bibliográficas Clave por Área Temática

BIOINFORMÁTICA & IN SILICO

ÁREA: MODELADO 3D • DOCKING • FILOGENIA

- **Trott, O. & Olson, A. J. (2010).** AutoDock Vina: improving speed & accuracy of docking. J. Comput. Chem., 31(2), 455–461. *[Dianas: Acoplamiento flexible en Sitio G (GSH) y Sitio H (CDNB).]*
- **Waterhouse, A., et al. (2018).** SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures. Nucleic Acids Res., 46(W1), W296–W303. *[Dianas: Modelado por homología 3D de NaGST U17 y tetramero GPX4.]*
- **Gfeller, D., Michielin, O. & Zoete, V. (2013).** SwissSidechain: molecular and structural database. Bioinformatics, 29(16), 2087–2089. *[Dianas: Validación conformacional y microentornos de interacción ligando-residuo.]*
- **Bouckaert, R., et al. (2019).** BEAST 2.5: advanced software platform for Bayesian analysis. PLoS Comput. Biol., 15(4), e1006650. *[Dianas: Inferencia filogenética bayesiana y divergencia evolutiva interespecífica.]*
- **Pettersen, E. F., et al. (2021).** UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers. Protein Sci., 30(1), 70–82. *[Dianas: Mapeo electrostático y caracterización del bolsillo catalítico.]*

ENZIMOLOGÍA REDOX & CATÁLISIS

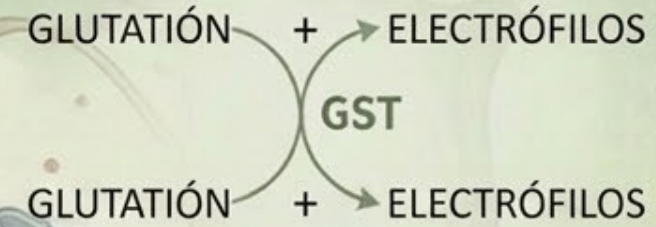
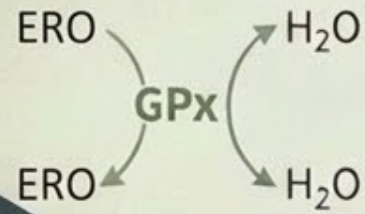
ÁREA: CINÉTICA ESTACIONARIA • TIOLATO • MECANISMO

- **Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974).** Glutathione S-transferases: first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249(22). *[Dianas: Estandarización del ensayo cinético con CDNB a 340 nm.]*
- **Deponte, M. (2013).** Glutathione catalysis and reaction mechanisms of GSH enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 1830(5). *[Dianas: Activación nucleofílica de glutatión y química redox del tiolato.]*
- **Dixon, D. P., Lapthorn, A. & Edwards, R. (2002).** Plant glutathione transferases. Genome Biol., 3(3), reviews3004.1–3004.10. *[Dianas: Arquitectura dimérica y caracterización de clases vegetales Tau y Phi.]*
- **Bela, K., et al. (2015).** Plant glutathione peroxidases: emerging role in stress responses. J. Plant Physiol., 176, 192–201. *[Dianas: Mecanismos catalíticos redox acoplados a tiorredoxina y peróxidos.]*
- **Axarli, I., et al. (2016).** Structural & functional characterization of plant GSTs. Biochemistry, 55(48), 6614–6628. *[Dianas: Determinantes moleculares de afinidad y especificidad hacia xenobióticos.]*

ESTRÉS ABIÓTICO & BIOPROCESO

ÁREA: FISIOLOGÍA • METROLOGÍA • APLICACIÓN

- **Chen, J.-H., et al. (2012).** Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis GST U17. Plant Physiol., 158(1), 340–351. *[Dianas: Respuestas adaptativas a sequía/salinidad mediadas por ortólogos GSTU17.]*
- **Bradford, M. M. (1976).** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein. Anal. Biochem., 72. *[Dianas: Cuantificación metrológica estandarizada en microplaca (BMG Omega).]*
- **Studier, F. W. (2005).** Protein production by auto-induction in high-density cultures. Protein Expr. Purif., 41(1), 207–234. *[Dianas: Optimización del bioproceso heterólogo en medio Terrific Broth (TB).]*
- **Bruneau, A., et al. (2021).** New higher-level classification of legume family (Leguminosae). PhytoKeys, 178, 1–114. *[Dianas: Reclasificación filogenética taxonómica del clado Neltuma (ex-Prosopis).]*
- **Distéfano, A. M., et al. (2017).** Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. J. Cell Biol., 216(2), 463–476. *[Dianas: Peroxidación lipídica, muerte celular regulada y rescate antioxidante.]*



¡MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN!

GLUTATIÓN