



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGIA

**ANÁLISIS DE PROTEÓMICA COMPARATIVA EN LA VARIEDAD RESISTENTE DE  
*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ BAJO LA INFECCIÓN DE *ENTEROBACTER*  
*CLOACAE*.**

**Trabajo Especial de Grado**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la **Br. Ana Carolina Fiol Fernandes**, como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

**Tutora:** Dra. Nardy Diez García.

**Asesor académico:** Dr. Alexander Laurentin.

CARACAS, VENEZUELA

OCTUBRE-2011

## **Agradecimientos**

A Dios y a la Virgen del Valle, por guiarme en el camino de la vida. A mis padres, a quienes agradezco de todo corazón su apoyo, amor, comprensión en mis buenos y malos momentos, por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo, son el camino para conseguir con éxito mis metas. A mi Papá, gracias por estar a mi lado siempre, espero ser tu orgullo. A mi Mamá, gracias por acompañarme, aconsejarme en todo momento, aquí está mi esfuerzo.

Agradezco profundamente a la casualidad de la vida que me llevo a querer conocer a la Fundación de Estudios Avanzados IDEA, donde conocí a mi tutora quien me ofreció la posibilidad de ser su tesista, la Dra. Nardy Diez, que con su orientación, dedicación y ayuda termine la realización de mi tesis. Así mismo, agradezco al IDEA por permitirme desarrollar mi tesis en sus laboratorios, al personal de Genómica y Proteómica por su disposición y ayuda brindada durante la realización de este trabajo, en especial a José, Carolina, María Alejandra, Leandro, Riward, Annamil, Iraima, Ainhoa, Maryulis, Pedro, gracias a todos.

A mi asesor académico Dr. Alexander Laurentin y a mis Jurados Dra. Ana Gomez y Dra. Leymaya Guevara, quienes con sus correcciones asertadas y su tiempo dedicado me ayudaron a mejorar mi tesis.

A la casa de estudio, mi gran Universidad Central de Venezuela UCV, que me abrió sus puertas y me permitió vencer las sombras, a todos los profesores de la Escuela de Biología que ayudaron a mi formación profesional y a mi elección de mención.

A toda mi familia, en especial a mi Padrino Carlos Freitas, mis primos Edward y Lissette Goncalves, por sus consejos y palabras de aliento en el momento preciso.

A mi novio Erick Moreira, mi gran amor, gracias por tu cariño, por ser tan especial, por demostrarme que en todo momento cuento contigo, por haberme apoyado y soportado cada uno de mis malos y buenos días.

La amistad es un tesoro invaluable y muy especial, por ello le agradezco a mi amiga Daymile Pérez por regalarme su amistad, sinceridad y palabras dadas en el preciso momento, desde nuestro primer laboratorio juntas, también agradezco el cariño de sus padres. A mis amigas Lily Bermúdez y María Luisa Merola, quienes han sido mis mejores amigas desde el Colegio y mis hermanas, gracias por escucharme y darme su apoyo. A mis amigos y compañeros de carrera Daniela Chame, Denis Molina y Antonio Zerpa, les agradezco su amistad incondicional, ocurrencias y vivencias, cada uno tiene un lugar especial en mi corazón, gracias por todo.

Y por último, deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable de mi vida, a mi misma.

## Resumen

*Manihot esculenta* Crantz, es un rubro que representa un alimento importante en la dieta del venezolano, por lo tanto es indispensable encontrar soluciones a problemas relacionados con este rubro y seleccionar el mejor material adaptado a las necesidades del país. Los estudios realizados en yuca, se han centrado en las proteínas de embriones somáticos, plántulas, raíces tuberosas y fibrosas, sin ningún tipo de estrés biótico ni abiótico. En nuestro caso el estudio se centra en el análisis de proteómica comparativa de las proteínas que durante la infección frente al patógeno su expresión no varía, considerando que su interés radica en el papel que juegan dichas moléculas en el mantenimiento de la planta, bajo la condición de infección con *Enterobacter cloacae*. Desde la extracción de proteínas, la muestra es preparada para su mejor separación en la electroforesis bidimensional. Se realizaron electroforesis bidimensionales en un gradiente de 8-15% de poliacrilamida. Luego de obtener los geles bidimensionales las proteínas fueron visualizadas mediante la tinción con plata, se obtuvo imágenes de estos, los cuales fueron analizados mediante el programa Phoretix™2D, se caracterizaron las masa moleculares y punto isoeléctrico de 15 *spots* siempre presentes en el perfil proteico de la variedad resistente de *Manihot esculenta* Crantz, antes y después de la infección. Se identificaron las proteínas seleccionadas basándonos en la herramienta de la bioinformática, obteniendo tres grupos: Un primer gran grupo de proteínas asociadas al metabolismo y energía (60%) donde se encuentran proteínas asociadas a la fotosíntesis, al metabolismo de carbohidratos y proteínas relacionadas al procesamiento de proteínas, el segundo grupo asociado a la defensa de la planta (26,7%) como la producción del estrés oxidativo y proteínas relacionadas a la patogenicidad y por último un grupo de proteínas no identificadas (13,3%).

## Índice General

Página

Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas.....	8
Lista de Abreviaturas .....	9
Introducción.....	10
Antecedentes .....	13
Objetivos.....	22
OBJETIVOS GENERALES.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Extracción de proteínas de las hojas de <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	23
Cuantificación de proteínas por medio del método de Bradford.....	23
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) .....	24
Electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) .....	25
Digitalización y análisis de las proteínas en los geles 2D a través del software Phoretix 2D V2004 .....	29
Identificación de las proteínas mediante Espectrometría de masas (MALDI-TOF) .....	30
Análisis bioinformático de la huella peptídica .....	32
Resultados y Discusión.....	34
Perfiles proteicos.....	35
Selección de las proteínas invariablemente presentes.....	38

<b>Identificación de las proteínas invariablemente presentes .....</b>	<b>43</b>
<b>Proteínas asociadas al metabolismo y energía .....</b>	<b>45</b>
Fotosíntesis.....	45
Metabolismo de carbohidrato.....	46
Síntesis y procesamiento de proteínas.....	48
<b>Defensa .....</b>	<b>50</b>
Estrés oxidativo.....	51
Proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR).....	53
<b>Proteínas no identificadas .....</b>	<b>54</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## Índice de Figuras

## Página

<b>Figura 1.</b> Detección de las $\alpha$ - y $\beta$ -esterasas en hojas jóvenes sin expandir de los cultivares de <i>Manihot esculenta</i> Crantz (Izquierda). Movilidad electroforética y sustratos específicos (Derecha). Carril 1 y 2 Fibra, carril 3 y 4 Branca de Santa Catarina, carril 5 y 6 IAC-12829, carril 7 y 8 IAC-13. Carril 3 y 8 infectados con <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. manihotis, donde se observa la expresión de la Est-7, la cual puede ser utilizada como marcador de patogenicidad. Obtenido de Pereira y col. 2001. ....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Geles en segunda dimensión de las proteínas totales extraídas de las raíces fibrosas (Izquierda) y tuberosas de yuca (Derecha). Obtenida Sheffield y col. 2006. ....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> La clasificación funcional y distribución de las 383 proteínas identificadas en el cultivo SC8 de yuca. Obtenida Li y col. 2010. ....	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Partes de un gel SDS-PAGE. ....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Modelo del soporte de canales. Vista superior .....	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Modelo de la parte interna del equipo Amersham Ettan IPGphor 3. Vista superior	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Modelo de la montura del gel para la segunda dimensión. Vista de frente .....	<b>28</b>
<b>Figura 8.a.</b> 2D-PAGE de las proteínas totales de las hojas de yuca de la variedad resistente (22), del perfil proteico sin inocular y inoculado después de 12 horas .....	<b>36</b>
<b>Figura 8.b.</b> 2D-PAGE de las proteínas totales de las hojas de yuca de la variedad resistente (22), del perfil proteico inoculado después de 24 y 48 horas .....	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> <i>Spots</i> coincidentes en los perfiles de las hojas de yuca resistente sin inocular, con cada perfil proteico inoculado por separado, realizado con el programa Phoretix 2D-V2004 .....	<b>40</b>

<b>Figura 10.</b> Spots coincidentes en los perfiles de las hojas de yuca resistente inoculado después de 12 horas con cada perfil proteico inoculado por separado, realizado con el programa Phoretix 2D-V2004.....	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b> Spots coincidentes en los perfiles de las hojas de yuca resistente inoculado después de 24 horas con el perfil proteico inoculado después de 48 horas, realizado con el programa Phoretix 2D-V2004 .....	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Clasificación funcional de las 15 proteínas constantemente presentes en las hojas de la variedad resistente de <i>Manihot esculenta</i> Crantz (22). .....	<b>45</b>
<b>Figura 13.</b> Sistema que se compone de dos enzimas glioxalasa, la glioxalasa I (Lactoilglutacion liasa) y la glioxalasa II (Hidroxiacilglutación hidrolasa), la metilgioxal y gioxal forman un intermediario hemitioacetal y la glioxalasa I cataliza la formación de S-D-Lactoilglutación. La gioxalasa II cataliza la hidrólisis de la S-D-Lactoilglutación a D-Ácido Láctico y glutatión (Lee y col. 2004). .....	<b>48</b>
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de dos isómeros cis y trans entre el enlace peptídico prolina y otro aminoácido (P1). La ciclofilina cataliza la interconversión entre ambas conformaciones (Wang y Heitman, 2005) .....	<b>50</b>
<b>Figura 15.</b> Ciclo de cooperación con la regeneración de ácido ascórbico, lo que permite peroxidas/ fenoles recoger las altas cantidades de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Un compuesto fenólico se oxida en un radical fenólico por la acción de la peroxidasa, que a su vez oxida al ácido ascórbico a monodeshidroascorbato, la cual puede interactuar de forma espontanea para producir ácido ascórbico + ácido deshidroascórbico, que puede ser reducido por una ácido deshidroascórbico reductasa citosólica (Ferrerres y col., 2011).....	<b>51</b>
<b>Figura 16.</b> Representación de la acción de la proteína ascorbato peroxidasa (APX3). Donde el ácido ascórbico actúa como reductor, oxidándose a la forma deshidroascórbico por la enzima APX3 y liberando agua. ....	<b>52</b>



## Índice de tablas

	Página
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de <i>spots</i> presentes en los diferentes geles. ....	<b>38</b>
<b>Tabla 2.</b> Cantidad de <i>spots</i> coincidentes presentes entre las diferentes comparaciones de los perfiles proteicos .....	<b>39</b>
<b>Tabla 3.</b> Valores de pI y MM de las 15 proteínas constantemente presentes en los perfiles proteicos de las hojas de yuca de la variedad resistente (22) sin inocular e inculados. ....	<b>42</b>
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los parámetros MM (KDa) y pI, experimentales y teóricos identificados en el trabajo de Baba y col., 2008, con los parámetros MM (KDa) y pI obtenidos en este trabajo.	<b>44</b>

## Lista de Abreviaturas

- AFLP:** Técnica de amplificación de fragmentos de polimorfismo.
- APS:** persulfato de amonio.
- DDT:** Dicloro-Difenil-Tricloroetano.
- 2D-PAGE o 2DE:** Electroforesis bidimensional.
- EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético.
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- LC-ESI-MS/MS:** cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray.
- MALDI-TOF:** Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz con Tiempo de Vuelo.
- PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa.
- RFLP:** Técnica de restricción de los fragmentos de polimorfismo.
- SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio.
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes.
- TTSS:** Sistema de secreción tipo III.

## Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo importante debido a su alto contenido de almidón en sus raíces, es considerado un alimento de primera necesidad para más de 500 millones de personas, sobre todo en los países del trópico y subtropical de África, Asia y Latinoamérica. La yuca ocupa el cuarto lugar como la fuente más importante de alimentos a nivel mundial, después del arroz, caña de azúcar y maíz. Tanto sus raíces como sus hojas son adecuadas para el consumo humano; las primeras son fuente de hidratos de carbono y las segundas de proteínas, minerales y vitaminas, particularmente carotenos y vitamina C. (FAO, 2008).

La planta de yuca contiene altas cantidades de almidón en sus raíces, este tubérculo es usado como alimento humano cuando su contenido de cianógenos es bajo o en pienso para animales y harinas. El manejo del cultivo requiere de mínimos cuidados para su producción debido a su gran tolerancia al estrés abiótico. Las plantas de yuca presentan una alta eficiencia en el uso del agua, debido a su mecanismo fisiológico, en el que se cierran los estomas en presencia de estrés hídrico. Aunque su sistema de raíces es escaso en comparación a otros cultivos, pueden penetrar 2m por debajo del suelo, permitiéndole al cultivo explorar en la profundidad del suelo la disponibilidad del agua. La yuca carece de la anatomía Kranz, aunque presenta una elevada actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, pero un amplio rango de los valores de Km (CO<sub>2</sub>) para la enzima fotosintética Rubisco indica la posibilidad de una mayor afinidad con el CO<sub>2</sub> y por consiguiente una mayor tasa fotosintética (Mabrouk, 2004).

Los fitopatógenos son una de las principales causas de pérdida de la producción de cultivos vegetales. Las plantas de yuca se ven afectadas principalmente por hongos y bacterias, las

cuales conllevan a grandes pérdidas en la producción agrícola. Una vez que el fitopatógeno penetra la planta, desencadena la defensa basal (o resistencia), un mecanismo genérico, que consiste en el engrosamiento de la pared celular de la planta, el depósito de papila, la acidificación del apoplasto, transducción de señales y la transcripción de genes de defensa (Mehta y col., 2008).

Asociado a la defensa basal, algunas variedades de plantas que expresan proteínas de resistencia, desencadenan una respuesta específica, genéticamente definida como una respuesta hipersensible y posterior muerte celular programada. La función de la respuesta hipersensible es contener el patógeno, y se caracteriza por diferentes cambios bioquímicos, conocidos como cambios en los flujos de iones, hiper-peroxidación de lípidos, fosforilación de proteínas, generación de óxido nítrico e incremento en las especies reactivas de oxígeno y compuestos antimicrobianos. Esta respuesta rápida pone fin a la invasión de patógenos y evita el desarrollo de la enfermedad (Mehta y col., 2008).

La bacteriosis más común descrita en esta planta es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (Ortega y Velásquez, 2005), aunque hoy en día se han reportado una gran cantidad de nuevos fitopatógenos nunca antes descritos para una gran cantidad de especies de plantas. En el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Simón Bolívar, una nueva especie de bacteria capaz de infectar a la yuca, que en un principio se pensó que era una nueva especie de *Xanthomonas*, pero con una serie de ensayos bioquímicos y moleculares se indentificó como *Enterobacter cloacae* (Santana y col. En imprenta). Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae del género *Enterobacter*, cuya presencia es indicativo de contaminación. Son bacilos gramnegativos móviles, anaerobios facultativos, no producen esporas, reducen nitratos a nitritos y fermentan la glucosa con producción de ácido

Las bacterias secretan diversas proteínas para colonizar y superar las defensas de las plantas. Cinco sistemas de secreción (tipo I-V) se han reportado en las bacterias. El sistema de secreción principalmente utilizado por las bacterias durante la infección es el sistema de secreción tipo III (TTSS), que participa en algunas de las enfermedades más devastadoras en los animales y las plantas. Este sistema permite a las bacterias inyectar directamente las proteínas, llamados efectores o factores de virulencia, en la célula huésped y subvertir los procesos celulares. TTSS es esencial para la patogenicidad y se conserva entre las bacterias gramnegativas (Mehta y col., 2008).

En este trabajo se pretende utilizar el análisis mediante proteómica comparativa, que no es más que un conjunto de herramientas que nos permitirán el estudio y caracterización del proteoma, en los diferentes estados en que se encuentren las células de la planta, esperando encontrar perfiles proteicos diferentes. Los estudios de proteómica realizados en yuca, se han centrado en las proteínas de embriones somáticos, plántulas, raíces tuberosas y fibrosas, sin ningún tipo de estrés biótico ni abiótico (Sheffield y col., 2006; Li y col., 2010). En nuestro caso el estudio se centra en las proteínas que durante la infección frente al patógeno su expresión no varía, considerando que su interés radica en el papel que juegan dichas moléculas en el mantenimiento de la planta bajo la condición de infección, siendo este trabajo complementario de un proyecto en el que se evaluaron las proteínas cuya expresión varían en presencia del fitopatógeno.

## Antecedentes

La principal enfermedad de la yuca en todo el mundo, incluyendo Venezuela es la bacteriosis o añublo bacterial, según Ortega y Velásquez, 2005. Esta enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*, ocasiona la pérdida total de las plantas en los cultivares muy susceptibles. Se considera una enfermedad endémica en la zona oriental de Venezuela y se ha detectado su presencia en otras regiones del país. En décadas pasadas, en los programas de expansión del cultivo se llegó a seleccionar materiales sin calidad fitosanitarias adecuadas, lo cual ocasiono la diseminación de la enfermedad. Hay factores abióticos como la humedad relativa, la lluvia, la temperatura, capacidad de retención de agua por los suelos y la fertilidad de los suelos, que influyen en la infección, desarrollo y severidad de la bacteriosis, observándose en periodos lluviosos un mayor desarrollo de la enfermedad que en periodos de sequía. Las pérdidas que causa la bacteriosis se pueden reducir cuando se emplean buenas prácticas agrícolas, utilizando materiales de plantación limpios, erradicando los focos de infección, mediante la combinación de la resistencia genética con medidas de control biológico y sanitario.

Hoy en día, se han reportado nuevos fitopatógenos nunca antes descritos para una gran cantidad de especies de plantas, tal es el caso de la asociación de *Enterobacter cloacae* con la putrefacción de rizomas de jengibre comestibles en Hawaii, reportado por Nishijima y col., 2004. La especie *E. cloacae* es la más frecuentemente aislada de las especies de *Enterobacter* en el hombre y los animales, además se encuentra comúnmente en los insectos, plantas y muchas fuentes de nuestro entorno (como el agua, drenaje, suelo, vegetales recién cosechados). En ese trabajo se identifico y caracterizo las cepas *E. cloacae* aisladas de rizomas de jengibre por medio de características bioquímicas y fisiológicas. Los estudios de patogenicidad de las cepas bacterianas

se realizaron con las cepas B193-3 y KN1-19 aisladas de los rizomas enfermos de jengibre, las cuales difieren en la forma de la colonia, y la cepa Dd-18 aislada de la mosca de la fruta. Las inoculaciones de las cepas se realizaron en: plántulas de jengibre de cultivos de tejidos asépticos en tubos de ensayo; rebanadas del rizoma de jengibre en capsulas de Petri; los segmentos de rizoma de jengibre almacenados tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas; y plantas jóvenes de jengibre, papaya y bulbos de cebolla amarilla cultivadas en macetas en el invernadero. No hubo diferencia en la incidencia o severidad de los síntomas entre las cepas mucoides y no mucoides en el jengibre (B193-3 y KN1-19, respectivamente), aunque en la cebolla, los síntomas eran ligeramente más severos con KN1-19 que con B193-3. Las cepas B193-3, KN1-19 y Dd-18 ocasionan diferentes respuestas tanto en el jengibre y la cebolla, pero no hubo diferencias de tensión en tres cultivares de papaya. Las respuestas varían con la cepa Dd-18 en el jengibre (plántulas, rodajas o segmentos), sugiriendo que Dd-18 es un patógeno débil para el jengibre. Los tejidos maduros parecen ser más susceptibles a la infección por *E. cloacae* que los tejidos jóvenes, las tasas de infección en rodajas de jengibre adultos, fueron significativamente mayores que en rodajas de jengibre joven. Las cepas de *E. cloacae* no causan síntomas de la enfermedad tanto en las cebollas jóvenes como en las papayas jóvenes, pero si causa una pudrición interna en las cebolla madura y una infección interna con coloración amarillenta en la papaya madura. Las cepas de *E. cloacae* fueron aisladas de los rizomas de jengibre sanos y enfermos. En jengibre enfermos, *E. cloacae* fue aislado, junto con otras bacterias. Cuando solo se inocula *E. cloacae* produce síntomas de necrosis en los rizomas y hojas del jengibre y otros frutos, lo que indica que *E. cloacae* puede actuar de forma independiente bajo ciertas condiciones de susceptibilidad del huésped, pero puede depender también de la expresión de otras enfermedades sobre huésped, lo que demuestra el carácter oportunista de esta bacteria. *E. cloacae* puede existir como un endófito en rizomas de jengibre saludable, similar a su aparición en otras monocotiledóneas como el maíz,

arroz, y caña de azúcar. Sin embargo, en el jengibre maduro, cuando ciertas condiciones ambientales tales como alta temperatura, alta humedad relativa, y ambientes donde el oxígeno es bajo, la bacteria puede alcanzar grandes poblaciones y producir los síntomas de la enfermedad.

En el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Simón Bolívar se encontró por primera vez que la bacteria *Enterobacter cloacae* es capaz de infectar a las plantas de yuca (Santana y col. En imprenta).

Pereira y col., 2001. Realizaron una investigación sobre la expresión diferencial de las esterasas en hojas *Manihot esculenta* Crantz infectados con *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis. La  $\alpha$ - y  $\beta$ -Esterasas han sido ampliamente estudiadas en insectos, así como en los vertebrados y microbios. Sin embargo, la caracterización funcional de las esterasas, no se ha explorado en las plantas. Las esterasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces químicos, se distinguen cuatro clases: acetilesterasas, ariloesterasas, carboxiloesterasas y colinesterasas. El sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y junto a las pruebas de inhibición para la caracterización bioquímica de  $\alpha$ -y  $\beta$ -esterasas, basada principalmente en tres grupos de los inhibidores, los reactivos sulfhidrilo, organofosforados y eserín sulfato (Figura 1). Permitieron la detección de catorce isoenzimas esterasas en las hojas jóvenes de los cultivares de *Manihot esculenta*, donde la Est-9 se identificó como una ariloesterasa, además en las hojas jóvenes de *Manihot esculenta* infectadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. Manihotis, la Est-7  $\beta$ -esterasa muestra características de una  $\alpha/\beta$ -esterasa, indicando un cambio conformacional espacial que conduce a la preferencia de un sustrato específico de esta isoenzima, debe ser una consecuencia de las reacciones fisiológicas y bioquímicas de la planta infectada. Esta expresión diferencial de la



isoenzima Est-7 en hojas de plantas de yuca puede ser utilizado como un marcador de la patogénesis después de una infección con *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis.

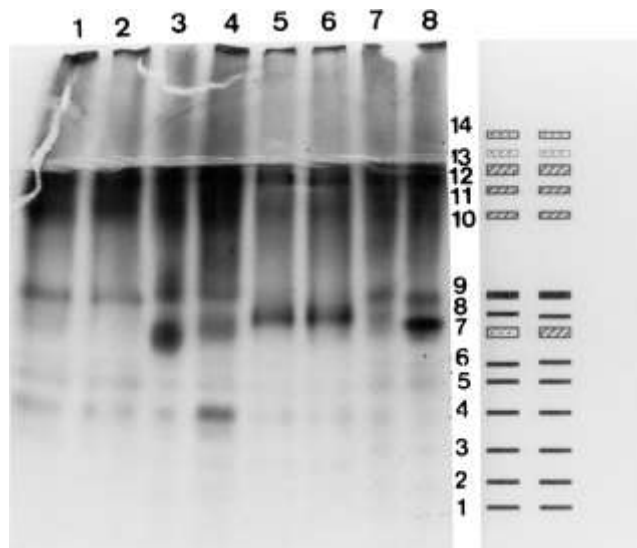


Figura 1. Detección de las  $\alpha$ - y  $\beta$ -esterasas en hojas jóvenes sin expandir de los cultivares de *Manihot esculenta* Crantz (Izquierda). Movilidad electroforética y sustratos específicos (Derecha). Carril 1 y 2 Fibra, carril 3 y 4 Branca de Santa Catarina, carril 5 y 6 IAC-12829, carril 7 y 8 IAC-13. Carril 3 y 8 infectados con *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis, donde se observa la expresión de la Est-7, la cual puede ser utilizada como marcador de patogenicidad. Obtenido de Pereira y col. 2001.

Sheffield y col., 2006, realizaron un trabajo del proteoma de la raíz de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) identificando las proteínas y su expresión diferencial, mediante el uso de electroforesis bidimensional y la extracción de proteínas de tejidos de la raíz tuberosa y fibrosa de las plantas de yuca de 3 meses de edad. En el estudio referido, se presentan los primeros datos de perfiles y comparaciones del proteoma de las raíces de yuca fibrosa y tuberosa. Con el análisis de las imágenes de los geles bidimensionales por medio del software, se detectaron 1467 ( $\pm 59$ ) *sptos* y 1595 *sptos* ( $\pm 68$ ) en los geles de las raíces fibrosas y tuberosas, respectivamente (Figura 2). Lo puntos Isoelectricos (pIs) osciló entre un pH de 3 a 10 y la masa molecular entre 7 y 180 kDa, con la distribución de la mayoría de puntos entre el 30 y 90 kDa. Se identificaron un total de 292 proteínas por medio del nanoISO QTOF MS/MS en conjunto con la búsqueda en bases de datos, de

las 292 proteínas identificadas, 232 proteínas eran diferentes a juzgar por los nombres de proteínas y 237 proteínas eran diferentes a juzgar por su secuencia, las proteínas con el mismo nombre a veces no tienen las mismas secuencias. Las discrepancias en la migración podría deberse a la dimerización, procesamiento de proteínas, o la degradación de las misma. La existencia de diferentes isoformas de una misma proteína, abre nuevas áreas de investigación para comprender las funciones de los genes en diferentes tipos de raíces de yuca. Las proteínas se clasificaron en 15 grupos de acuerdo a las categorías funcionales, el mayor grupo funcional está representado por la energía (19%), seguido por las proteínas metabólicas (16%), las enfermedades y la defensa (16%), el destino y las proteínas de almacenamiento (13%), transportadoras (7%), metabolismo secundario (6%), transducción de señales (6%), síntesis de proteínas (4%), sin clasificar (4%), estructura de la célula (3%), la transcripción (2%), el crecimiento y la división celular (2%), y la clasificación clara (2% ). El grupo más grande se asoció con la energía y se compone de 60 proteínas, todas las proteínas de este grupo eran comunes en ambos tejidos, con excepción de uno (sptos 49T), que es exclusivo de raíces tuberosas. Veintiún proteínas de la raíz tuberosa y seis de la raíz fibrosa se expresan en niveles altos, y diez de estos se incrementaron en más de dos veces en el tejido antiguo, indicando metabolismo activo en las raíces tuberosas. Por otra parte, 26 de las 60 proteínas identificadas están implicadas en la glucólisis y la fermentación, esto es consistente con el hecho de que las raíces de las plantas a menudo sufren de baja o nula la respiración de oxígeno. El segundo mayor grupo de las proteínas identificadas se compone de 48 proteínas asociadas con el metabolismo, 23 proteínas están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y catabolismo, sin incluir dos proteínas únicas de las raíces tuberosas, lo que indica niveles similares de aminoácidos entre los dos tipos de órganos de la raíz. Una subclase formada por 8 proteínas asociadas al metabolismo de almidón, que eran únicas y con niveles altos de expresión en las raíces tuberosas. El tercer grupo está formado por 47 proteínas implicadas en

enfermedades de las plantas y los procesos de defensa, La abundancia de estas proteínas asociadas con el tejido fibroso puede indicar la importancia de las raíces fibrosas en la enfermedad y la respuesta de defensa. El siguiente grupo se asoció con las proteínas de destino y de almacenamiento, la expresión de las metaloproteinasas de matriz (spto 276) y algunas proteínas relacionadas al proteasoma (sptos 199, 238 y 240) se encontró que disminuyó en el tejido tuberoso en comparación con el tejido fibroso. Los grupos funcionales restantes también contienen proteínas con notables diferencias en la expresión entre el tejido fibroso y tuberosa. Las raíces fibrosas no sólo mostraron un perfil relacionado con el crecimiento primario, sino que también estaban implicados en otros procesos como la enfermedad y de defensa, señalización y metabolismo secundario. raíz tuberosa que aparecen un perfil complejo relacionado con la acumulación de almidón, crecimiento secundario, a su vez la proteína más y el almacenamiento, la enfermedad, la defensa y el metabolismo. Por medio de la tecnología MS y la bioinformática, fueron identificadas 299 proteínas, las cuales se divide en varias categorías funcionales. Los resultados mostraron que mientras que las proteínas son únicas asociadas a cada tipo de raíz, la mayoría de las proteínas están presentes en ambos tejidos, aunque muchos se expresan en diferentes niveles en los dos órganos.

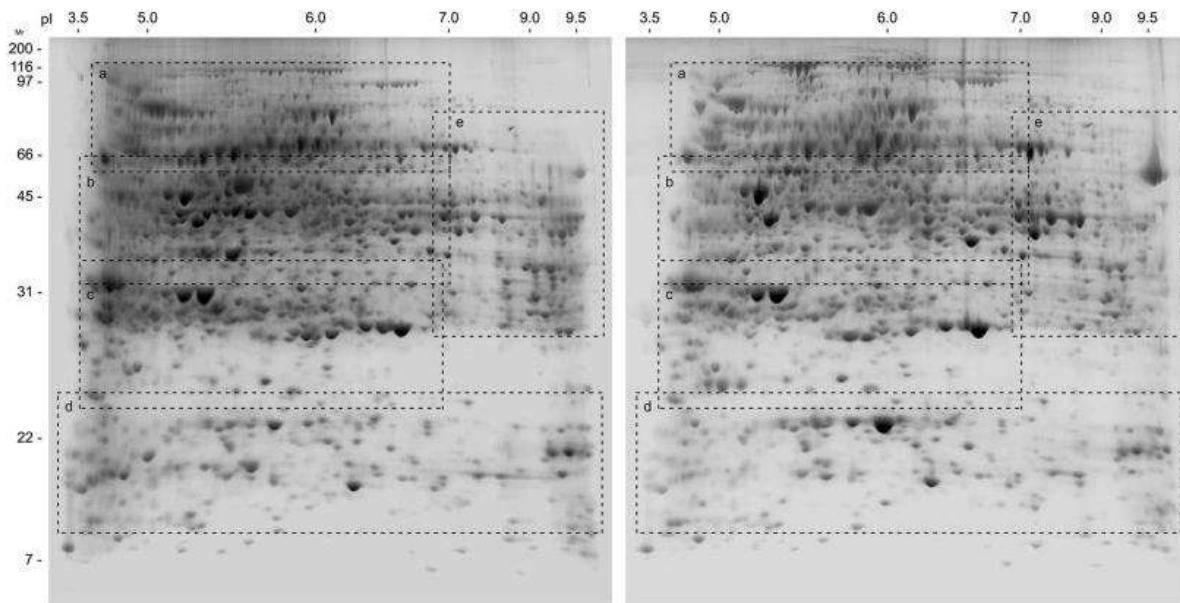


Figura 2. Geles en segunda dimensión de las proteínas totales extraídas de las raíces fibrosas (Izquierda) y tuberosas de yuca (Derecha). Obtenida Sheffield y col. 2006.

Li y col., 2010, realizaron un estudio utilizando como herramienta a la proteómica, para la caracterización del proteoma de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), extrayendo las proteínas de embriones somáticos, plántulas y raíces tuberosas y separándolas en electroforesis SDS-PAGE. El análisis de espectrometría de masas asociada a cromatografía líquida e ionización electrospray (LC-ESI-MS/MS), dio como resultado un total de 383 proteínas, incluyendo sus isoformas se clasificaron en 14 grupos con base en sus funciones bioquímicas, la mayoría de ellas fueron asociadas al metabolismo de carbohidratos y producción de energía (27,2%), proteínas implicadas en la biosíntesis (14,4%) (Figura 3). El mayor grupo funcional en el presente estudio son las proteínas asociadas con metabolismo de carbohidratos y producción de energía compuesta de 104 proteínas. Treinta y tres proteínas específicas de las raíces tuberosas en comparación con 20 de las raíces fibrosas, 12 a partir de embriones somáticos y 16 de los brotes de plántulas, lo que indica que las raíces tuberosas no son solo de almacenamiento, sino también de metabolismo activo. La actividad de las enzimas del ciclo del ácido cítrico y la glucólisis es controlada por el estado

energético de la célula. Al comparar los proteomas de las raíces fibrosas y tuberosas, se identificaron 147 proteínas presentes en la yuca raíces fibrosas y 155 proteínas en raíces tuberosas, de las cuales 37 proteínas estaban presentes en ambas raíces, 74 proteínas únicas de las raíces fibrosas y 102 proteínas únicas de las raíces tuberosas, indicando que los dos tipos de raíces tienen tanto superposición como diferentes actividades metabólicas. Las proteínas implicadas en la fotosíntesis se encontraban, entre el grupo más numeroso identificados en los brotes (21,8%), pero solo el 4,1% está representada en las raíces fibrosas y el 2,6% en las raíces tuberosas, en los resultados del “Western blotting” se encontró altos niveles de expresión de la proteína Rubisco en los brotes y su ausencia en embriones somáticos, así como, altos niveles en la expresión de  $\alpha$ -tubulina en las raíces tuberosas y bajos niveles de su expresión en embriones somáticos, indicando que el desarrollo de fibras en las raíces tuberosas es alto y en contraste con los embriones somáticos. En el estudio citado proporciona una gran cantidad de datos del perfil proteico de la yuca en crecimiento, desarrollo y sus funciones fisiológicas y junto con la integración de otras ramas de estudio de las “-ómicas” se logrará mejorar el rendimiento, valor nutricional y otros problemas relacionados a la yuca.

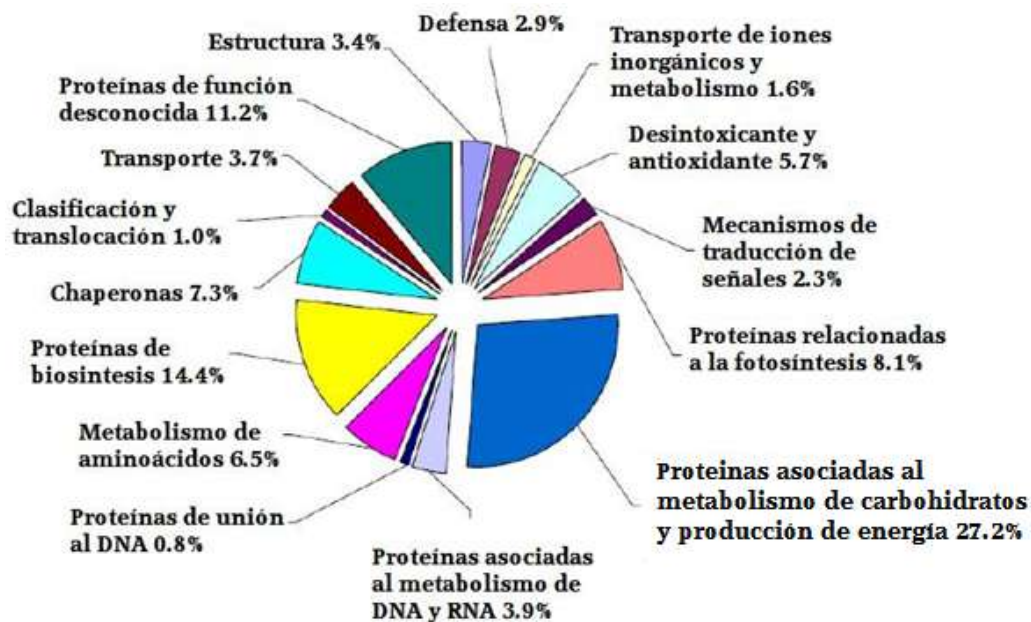


Figura 3. La clasificación funcional y distribución de las 383 proteínas identificadas en el cultivo SC8 de yuca. Obtenida Li y col. 2010.

El presente trabajo se centra en el estudio de las proteínas que en base a su expresión constante, bajo una situación de estrés biótico provocado por *Enterobacter cloacae*, con la intención de comprender el papel de esas proteínas en el mantenimiento de la planta.

## Objetivos

### Objetivo General:

Visualizar mediante técnicas de proteómica comparativa, proteínas que en base a su expresión siempre constante se consideran de interés, en la variedad resistente de *Manihot esculenta* Crantz bajo la infección de *Enterobacter cloacae*.

### Objetivo Específico:

- Obtener los perfiles proteómicos de la variedad resistente de *Manihot esculenta* Crantz, tanto sin inocular como inoculados con *Enterobacter cloacae* después de 12, 24 y 48 horas.
- Digitalizar las imágenes de los perfiles proteómicos y analizarlos a través de software de análisis Phoretix 2D.
- Identificar las proteínas mediante la obtención de la huella peptídica, empleando MALDI-TOF y bases de datos en internet como Mascot (<http://www.matrixscience.com/>).

## **Materiales y Métodos**

### **Extracción de proteínas de las hojas de *Manihot esculenta* Crantz:**

Se aislaron las proteínas totales de las hojas de *Manihot esculenta* Crantz, por medio del protocolo propuesto por Tsunetzuka y col., 2005, después de cumplir el tiempo determinado de infección. Las hojas infectadas fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, el polvo resultante, fue resuspendido en 500  $\mu$ L de buffer de extracción (Urea 7 mol/L/ Tiourea 2 mol/L, CHAPS 4% (p/v) y DTT 20 mmol/L) y 1x final de inhibidores de proteasa, el cual tiene como propósito disolver la membrana celular, solubilizar las proteínas sin desnaturalizarlas, colaborar con la eliminación de contaminantes y inactivar las proteasas. El homogeneizado fue centrifugado a 4 °C (9.000 x g por 30min). El sobrenadante fue precipitado con acetona fría, durante 1 hora a -20 °C, lo cual ayuda también a la inhibición de las actividades proteolíticas. Inmediatamente la muestra fue centrifugada a 13.000 x g por 30 min. El pellet se lavó dos veces con acetona fría, después de cada lavado se centrifugó la muestra a 13.000 x g por 30 min y luego se dejó secar al aire. Las muestras finalmente fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de buffer de extracción con 1x final de inhibidores de proteasa y fueron congeladas a -70 °C, hasta la determinación de las proteínas.

### **Cuantificación de proteínas por medio del método de Bradford:**

Se estimó la cantidad de proteínas utilizando el Kit Bradford *Quick Start* (BIO-RAD), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El colorante azul de Coomassie G-250 se une a las proteínas, la máxima absorción del colorante se encuentra desde 465 nm a 595 nm, la cantidad de proteínas puede ser estimada por la determinación de la cantidad del colorante, con una



absorción de 595 nm en la muestra (Wakter, 2002). Se colocó por duplicado 5  $\mu$ L de la muestra en 195  $\mu$ L del reactivo a temperatura ambiente, se mezcló por inversión e incubó las muestras durante 5 min y se realizó la estimación de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Para construir la curva de calibración y realizar la regresión lineal, se realizó diluciones seriadas de albúmina bovina (BSA) por duplicado. Las muestras donde sea necesario realizar una dilución, para obtener el valor estimado se debe multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución para estimar el valor real de la muestra.

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE):**

Luego de estimar las concentraciones de proteínas mediante el método de Bradford se realizó un gel de acrilamida SDS-PAGE al 6%, donde las proteínas son solubilizadas en presencia de un detergente aniónico SDS, el cual rompe las interacciones hidrofóbicas y desnaturaliza a la proteína, enmascarando su carga nativa original por la carga negativa del SDS, con un sistema de buffer discontinuo de Tris-Glicina-SDS, de 0,75 mm de espesor y con 10 bolsillos, para comprobar la integridad y concentración de las proteínas de la muestra. El sistema discontinuo consta de dos tipos de gel, un gel de apilamiento el cual contiene agua, una mezcla de acrilamida al 30%, Tris 1 mol/L a pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED sobre el cual se colocará un peine para la formación de los bolsillos, y a su vez este gel de apilamiento se forma sobre un segundo gel separador que contiene los mismos reactivos pero con un buffer Tris a pH 8.8 (Figura 4) (Maldonado y Jorrín, 2003).

Se preparó 20  $\mu\text{g}$  de cada muestra con 1x final del buffer de muestra (80 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 100 mmol/L DTT, 2% SDS, 0,006% azul de bromofenol) en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se hirvió las muestras durante 5 min. Luego se colocó en cada bolsillo del gel una muestra diferente con la ayuda de una micropipeta, primero se corrió a 70 V durante 15 min y luego a 170 V hasta que el frente de corrida llegue al final del gel. Después de terminada la corrida electroforética, se tiñó con el colorante azul de Coomassie para visualizar las proteínas, se incubó el gel con la solución de tinción durante aproximadamente 10 min y posteriormente se realizó lavados con ácido acético al 10% (v/v) para eliminar el exceso de colorante.

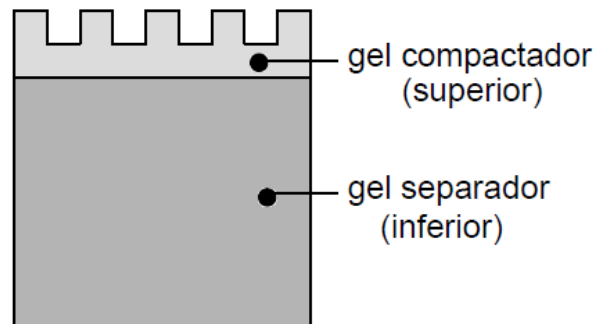


Figura 4. Partes de un gel SDS-PAGE.

#### **Electroforesis en dos dimensiones (2D):**

Rehidratación de las tiras:

En la rehidratación de las tiras donde se resuspendió la muestra en el buffer de rehidratación DeStreak™ (Amersham) y 1% de anfolitos 3-10 no lineal en un volumen final de 160 $\mu\text{L}$ , lo cual permite la desnaturalización y solubilización de las proteínas. Se separó el plástico superior de la tira comercial 3 a 10 no lineal, se sirvió la solución en el soporte con canales para

tiras (Figura 5). Luego, se colocó la tira con el gel boca abajo evitando la formación de burbujas y se incubó a temperatura ambiente durante 16 a 18 horas.

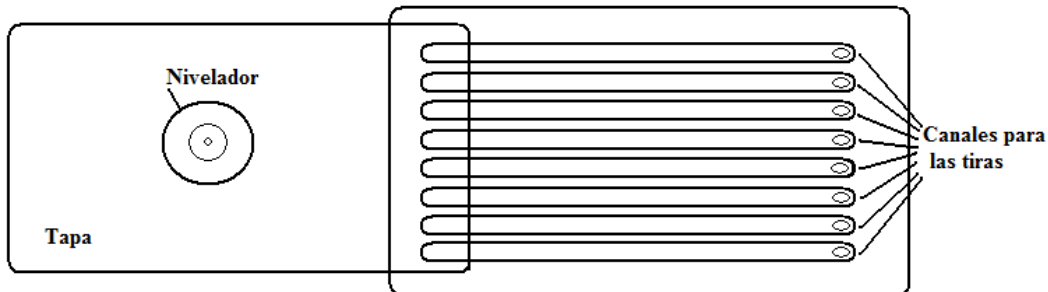


Figura 5. Modelo del soporte de canales. Vista superior.

Isoelectroenfoque (IEF) o primera dimensión:

Después de hidratar las tiras se procedió a enfocarlas en el equipo Ettan IPGphor 3 (Amersham), en donde las proteínas de la muestra se separaron por la aplicación de una corriente eléctrica, la cual generará un gradiente de pH por la presencia de anfólitos. Se verificó que el aceite mineral cubra totalmente los canales del soporte, se preparó puentes de papel de filtro que deben humedecerse en 200  $\mu$ L agua destilada, estos se colocaron encima de ambos extremos de la tira, las cuales se colocaron con el gel hacia arriba en el soporte acanalado de cerámica (Manifold) y encima del papel de filtro humedecido se colocó los electrodos (Figura 6). Se utilizó el programa de enfoque que recomienda la casa comercial Amersham, donde se seleccionó los centímetros de la tira, el rango de pH y el número de tiras que se quería enfocar. El tiempo del enfoque varía según la cantidad y naturaleza de las proteínas. Al finalizar el enfoque se guardaron las tiras a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la segunda dimensión.

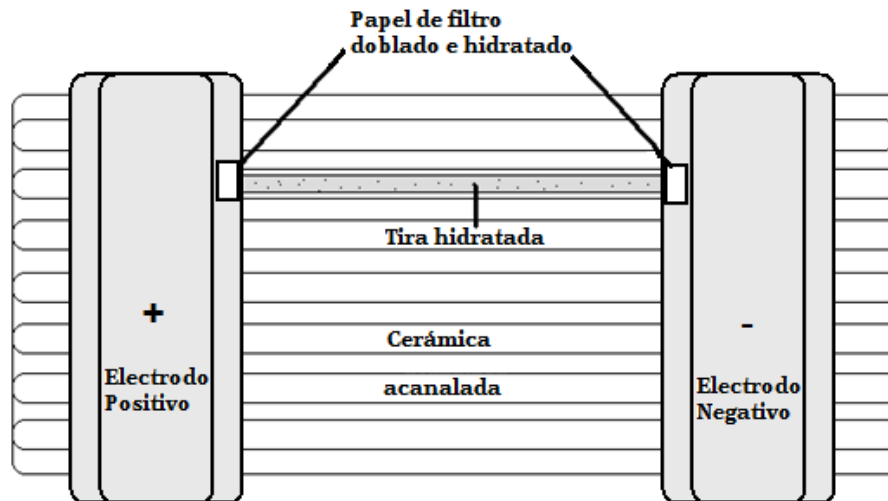


Figura 6. Modelo de la parte interna del equipo Amersham Ettan IPGphor 3. Vista superior.

Equilibrio las tiras:

Antes de realizar la segunda dimensión se equilibró las tiras ya enfocadas, para esto se realizaron dos lavados. El primer lavado se realizó con buffer de equilibrio (6 mol/L úrea, 1,5 mol/L Tris-HCl pH 8,8, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS y trazas de bromofenol) con DTT al 1%, durante 15 min en agitación constante, lo cual permite el rompimiento de los puentes disulfuro. El segundo lavado se realizó con Buffer de equilibrio con iodoacetamina al 4%, durante 15 min en agitación constante, el cual es un agente alquilante.

Electroforesis SDS-PAGE o segunda dimensión:

Para la segunda dimensión se preparó geles de acrilamida/bis-acrilamida en gradiente del 8 al 15%, este gel debe ser preparado el día anterior a la corrida para asegurarnos de su completa polimerización. En el espacio donde estaría el gel de apilamiento en un gel de SDS-PAGE, se colocó la tira con el gel mirando al vidrio de menor tamaño y en contacto con el gel en gradiente. En un

papel de filtro 2 cm de largo x 0,5 mm de ancho, se agregó 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular Benchmark en la parte inferior del papel, este se ubica al lado del extremo positivo de la tira por convención en el laboratorio. Para asegurar la tira y el papel de filtro, se añadió una solución de agarosa al 0,4% (Figura 7). Luego de que la agarosa solidifique se corre el gel en una cámara con un buffer de corrida (25 mmol/L Tris-HCl, 198 mmol/L glicina y 0,1% SDS) a 200v hasta que el frente de corrida llegue al final del gel.

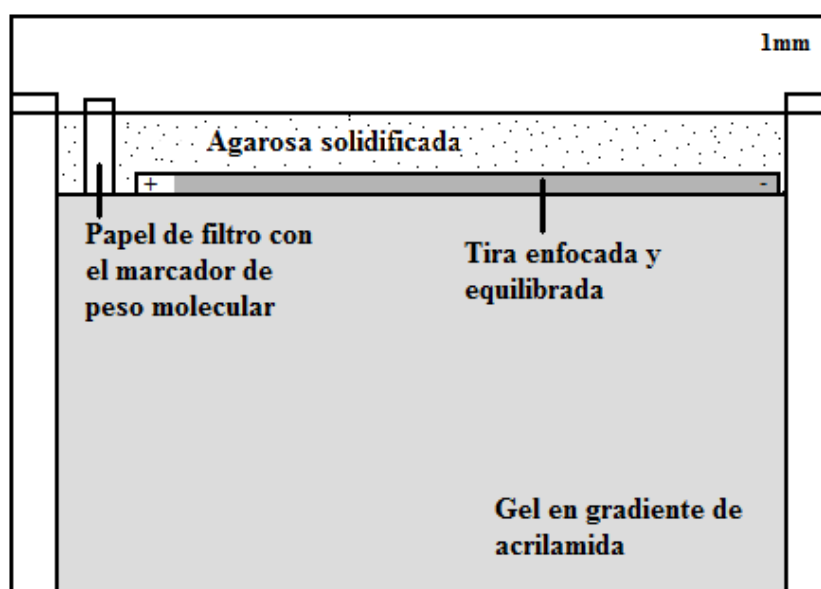


Figura 7. Modelo de la montura del gel para la segunda dimensión. Vista de frente.

Tinción reversible de plata:

Finalmente los geles son teñidos con la tinción reversible de plata donde se procedió a hacer una primera incubación con la solución de fijación (Etanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante 30 min en agitación constante. Luego se incubaron los geles en la solución de sensibilización (Etanol 3%, glutaraldehído 125 mmol/L, tiosulfato de sodio 200 mmol/L, acetato de sodio 0,82 mmol/L) durante 30 min en agitación. Se realizaron tres lavados con agua bi-distilada

cada uno durante 5 min, inmediatamente después se incubó los geles con la solución de reacción con plata (Nitrato de plata 250 mmol/L, formaldehído 4,8mmol/L) durante 20 min en agitación constante. Se realizó dos lavados con agua bi-destilada cada uno durante 1 min. Finalmente se incubó los geles en la solución de revelado (Carbonato de sodio 0,23 mmol/L, formaldehído 7,5 mmol/L) hasta que las proteínas del gel se observen con un color carmelita o negro, inmediatamente se agregó la solución de detención del revelado (EDTA-Na $\cdot$ 2H $_2$ O 0,039 mmol/L).

### **Digitalización y análisis de las proteínas en los geles 2D a través del software Phoretix™**

#### **2D V2004:**

Se digitalizaron los geles con el equipo ChemiDocs XRS Imagen System de la compañía Bio-Rad, se exportaron las imágenes en el formato TIFF el cual es compatible con el software Phoretix™-2D, donde se analizaron para comparar cuantitativamente imágenes de 2D e identificar cambios de expresión de las proteínas, entre geles con condiciones variadas.

Las imágenes se analizaron con el software Phoretix 2D donde se editó su orientación y removió las áreas ajenas a la imagen del gel. El siguiente paso es la detección de los *spots*, el programa tiene un sistema automático para detectar los *spots* donde se eligió la sensibilidad, contraste y el fondo, luego de que los parámetros han sido establecidos puede ser aplicado a todos o a un gel del experimento, pero es necesario la edición manual añadiendo, eliminando o editando los *spots*. Luego se agregó el marcador de peso molecular y del punto isoeléctrico. Para obtener los resultados correctos, de las imágenes del experimento se estableció el gel de referencia para compararlo con los demás geles. El siguiente paso es el *match* de los *spots*, donde se comparó el gel de referencia con los demás geles del experimento, el cual también puede

hacerse de forma automática por el programa pero siempre debe tener una edición manual comparando ambos *spots* según su forma, tamaño, punto isoeléctrico y peso molecular. Luego el programa arrojó resultados de la expresión de los *spots* en los diferentes geles del experimento en forma de histogramas.

### **Identificación de las proteínas mediante Espectrometría de masas (MALDI-TOF):**

Corte de las manchas (*spots*):

Una vez seleccionadas las proteínas, estas se cortaron del gel. El corte se realizó de forma manual, donde se empleó una punta de micropipeta sin esterilizar para la extracción de las manchas (*spots*). Dependiendo del diámetro de la mancha en el gel, se cortó el extremo de la punta de micropipeta tratando que el diámetro resultante sea el más similar a la mancha (*spots*) del gel. Luego de cortar las manchas (*spots*) se depositaron en una placa de 96 pozos.

Digestión trípica:

Cada mancha se colocó en un pozo de una placa de 96 pozos y se lavó con 100  $\mu\text{L}$  de agua durante 5 min. Los fragmentos se centrifugaron y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de acetronilo puro, se dejó incubando en esta solución por 10 min y se volvió a centrifugar para eliminar el líquido restante. La muestra se dejó secando al vacío por 15 min o hasta que quedó completamente seco.

Una vez seco, la muestra se incubó con 100  $\mu\text{L}$  de ditiotreitol 10 mmol/L en 100 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 56  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, se centrifugó para eliminar el líquido. Inmediatamente, la

muestra se incubó por 5 min en 100  $\mu\text{L}$  de una solución al 50% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 50 mmol/L por 5 min, después se centrifugó para eliminar el líquido.

La muestra se alquiló incubándola con 100  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 55 mmol/L en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mmol/L por 20 min a temperatura ambiente y protegido de la luz, se centrifugó para eliminar el líquido. Los fragmentos se lavaron con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 10 min y se centrifugó para eliminar el líquido. Se incubó nuevamente con acetonitrilo puro durante 5 min, se centrifugó y se seco al vacío durante 10-15 min.

La muestra se digirió con tripsina, los fragmentos se rehidrataron en tampón de digestión (0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Tripsina diluida en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mmol/L a pH 7,8) durante 40-45 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se retiró el sobrenadante y se cubrió los fragmentos con tampón de digestión sin tripsina y se dejó incubando a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, en cámara húmeda para evitar secar los pozos.

Al día siguiente, se centrifugó y se pasó el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo sin esterilizar, se secaron al vacío por 15 min o hasta que se seco la muestra, se resuspendió el sedimento en 5  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético al 0,5%. Se verificó el pH de la mezcla y si es ácido se procedió a la pre-mezcla con la matriz para MALDI. Las manchas se lavaron con ácido trifluoroacético 0,5% por 30min a 37  $^{\circ}\text{C}$  y se guardó.

#### Espectrometría de masa (MALDI-TOF):

La proteína se identificó mediante la obtención de su huella peptídica con el equipo MALDI-TOF (Desorción/Ionización mediante Láser Asistida por Matriz-Tiempo De Vuelo). Una vez



digerida la muestra se utilizó una placa porta muestras de acero inoxidable con pozos marcados de 0,1 mm de profundidad. Se colocó 1 o 2  $\mu\text{L}$  de la muestra tripsinizada con 1  $\mu\text{L}$  de la matriz del tipo  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) de la casa comercial Sigma.

Una vez que la matriz y la muestra hayan cocristalizado, se introducirá la placa en el espectrómetro de masas, el cual está conectado a una computadora y por medio del programa TOFworks™ versión 1.0 de Perkin Elmer, actualmente por problemas técnicos este equipo no se encuentra en funcionamiento, por lo que aun no se ha realizado esta parte de la metodología. Se procederá a irradiar los péptidos con un laser pulsado de nitrógeno, el laser inducirá la liberación de protones de la matriz que ionizarán las macromoléculas de la muestra. Estas moléculas en forma de gas ionizado entrarán en un campo eléctrico donde se acelerarán y se dirigirán a un detector. Según la relación masa/carga de las moléculas estas llegarán en diferentes tiempos al detector. Se seleccionarán los espectros obtenidos por el equipo, obteniendo los valores de las masas de cada péptido y se exportarán para su análisis.

#### **Análisis bioinformático de la huella peptídica:**

Se copiará el registro de los péptidos para cada muestra en formato .txt y se realizará la búsqueda a través del programa en internet Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). Se colocará los parámetros de la muestra como tipos de modificaciones, reino, familia o especie al que pertenecen las proteínas de la muestra. Se identificará las proteínas de interés comparando su huella peptídica con las de otras proteínas existentes en las bases de datos, observando el porcentaje de reconocimiento y comparando el punto isoeléctrico y masa molecular.

Además la bioinformática es una disciplina científica que se interesa por la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de datos biológicos mediante la aplicación de técnicas y herramientas matemáticas, de la biología y de la informática, con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos. En nuestro caso utilizamos los datos arrojados por el análisis de los perfiles proteicos a través del software Phoretix™ 2D V2004, por medio de una búsqueda de información se realizó la identificación de las proteínas de interés junto con su función en la células de las hojas de la especie resistente de *Manihot esculenta* Crantz.

## Resultados y Discusión

La proteómica representa una metodología de alto rendimiento para el análisis global de las proteínas, teniendo en la actualidad una gran cantidad de aplicaciones para analizar los diversos aspectos funcionales de las proteínas como las modificaciones post-traduccionales, interacciones proteína-proteína, las actividades y estructuras de las mismas. Las técnicas 2DE han mejorado la visualización de las proteínas en los geles bidimensionales, junto con el desarrollo de la espectrometría de masas y el crecimiento de las bases de datos la proteómica avanzó aún más en el análisis del proteoma.

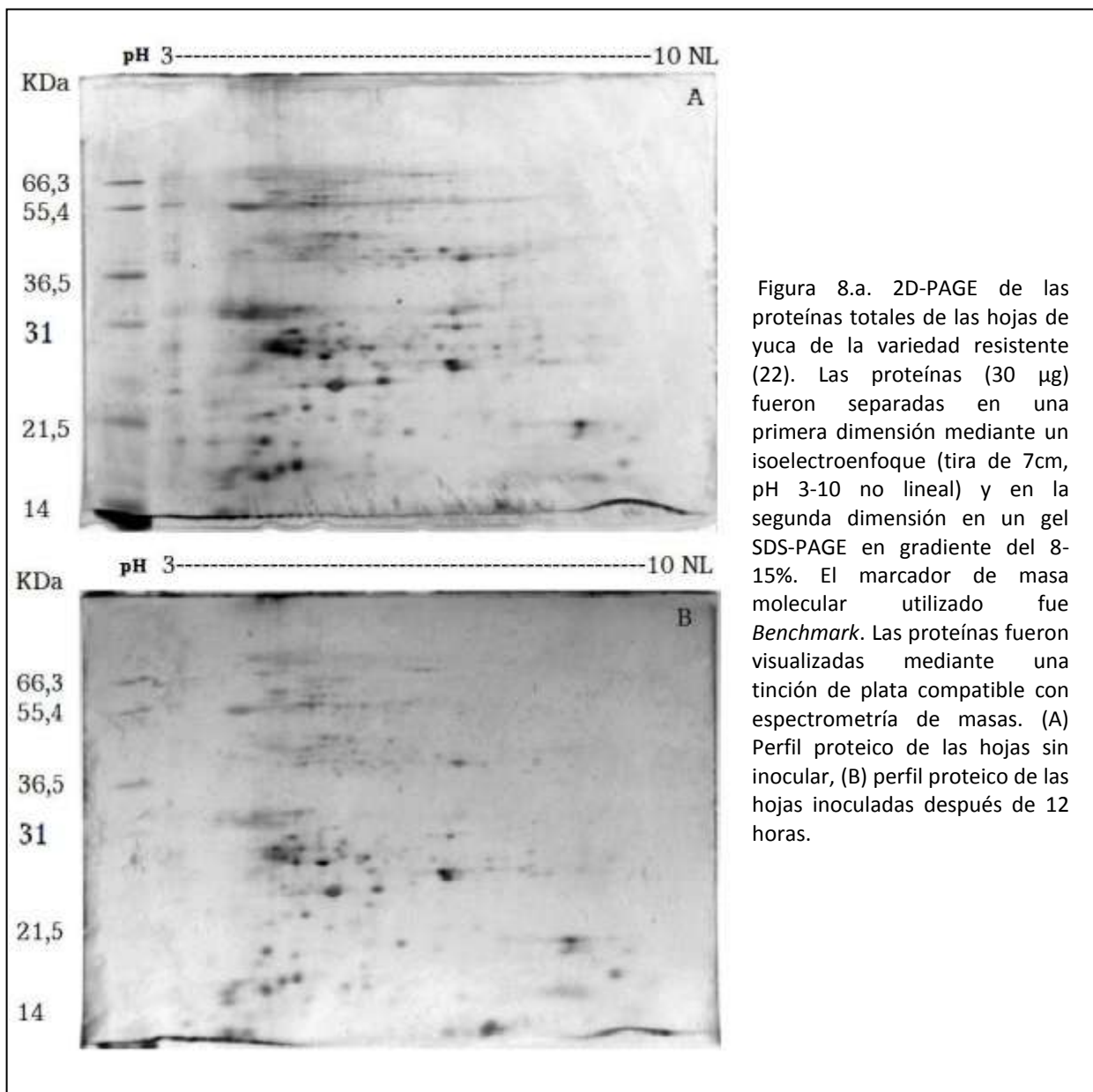
El análisis proteómico, es el resultado de la aplicación de un conjunto de ensayos que permiten el estudio de las proteínas.

Desde la extracción de proteínas de las hojas de yuca por medio del protocolo propuesto por Tsunetzuka y col., 2005, la muestra está siendo preparada para su mejor separación en la electroforesis bidimensional, la cual es una técnica versátil y de alta resolución. Luego de obtener los geles bidimensionales, estos son analizados por programas especializados, como el programa Phoretix-2D v2004, el cual permite el estudio comparativo de la expresión proteica, la aparición o desaparición de *spots* proporcionara información sobre la expresión diferencial de las proteínas dependiente del estado en que se encuentre las células de la planta.

### Perfiles proteicos:

Los perfiles proteicos de las hojas de la variedad resistente (22) de *Manihot esculenta* Crantz, sin inocular e inoculados con *Enterobacter cloacae* se obtuvieron mediante la técnica de electroforesis bidimensional descrita por primera vez por O'Farrell en 1975, donde las proteínas de la muestra biológica se someten a dos procesos de separación diferentes, en la primera dimensión se separaron según su punto isoeléctrico por el isoelectroenfoque en un gradiente de pH 3-10 no lineal en una tira de 7cm, y en la segunda dimensión en función a su masa molecular en un gel en gradiente del 8-15% de poliacrilamida, utilizando como marcador de masa molecular *Benchmark* de la casa comercial Invitrogen. Las proteínas separadas en la electroforesis fueron visualizadas mediante la tinción con plata, la cual es compatible con espectrometría de masas.

Los perfiles proteicos de las hojas de la variedad resistente (22) de yuca sin inocular e inoculados con la bacteria *Enterobacter cloacae* después de 12, 24 y 48 horas se observan en la figura 8.a y 8.b. Podemos observar que existe una diferencia en el número de *spots* presentes en las imágenes de las diferentes condiciones, en el control y durante evolución de la enfermedad. Debido a que la expresión de las proteínas varía según el estado en que se encuentra la célula de la planta.



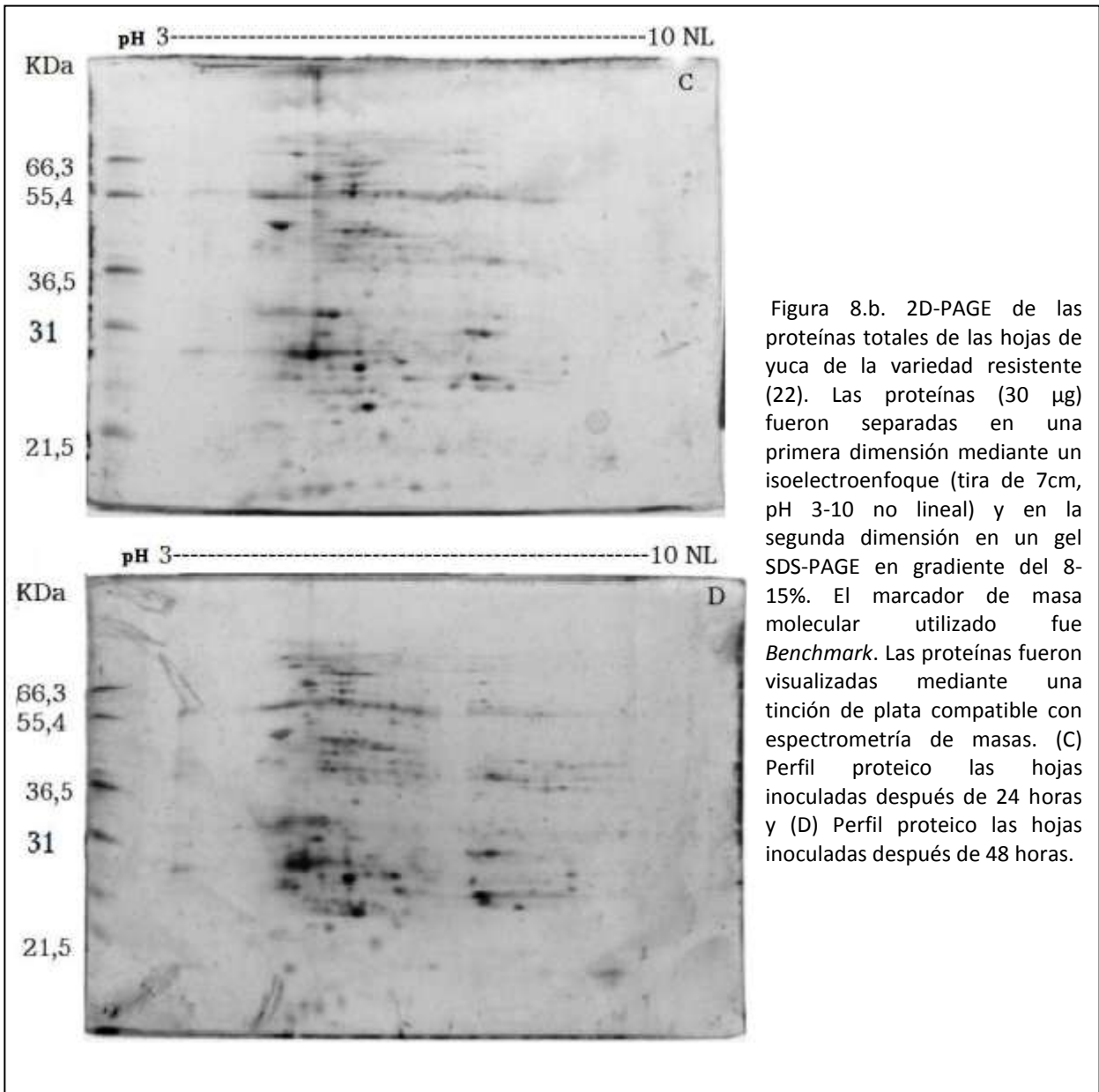


Figura 8.b. 2D-PAGE de las proteínas totales de las hojas de yuca de la variedad resistente (22). Las proteínas (30 µg) fueron separadas en una primera dimensión mediante un isoelectroenfoque (tira de 7cm, pH 3-10 no lineal) y en la segunda dimensión en un gel SDS-PAGE en gradiente del 8-15%. El marcador de masa molecular utilizado fue *Benchmark*. Las proteínas fueron visualizadas mediante una tinción de plata compatible con espectrometría de masas. (C) Perfil proteico las hojas inoculadas después de 24 horas y (D) Perfil proteico las hojas inoculadas después de 48 horas.

### Selección de las proteínas invariablemente presentes:

En un primer análisis, para la selección de los *spots* mediante el programa Phoretix 2D v2004, se encontró que en el gel sin inocular obtuvimos un mayor número de *spots* que en los geles sometidos a una condición de estrés por la inoculación de la bacteria *Enterobacter cloacae*, además se observa que el número de *spots* entre los perfiles inoculados con la bacteria, primero disminuyen y luego aumentan, observándose una diferencia en la expresión proteica que se debe al estado en que se encuentra la célula de la planta como se muestra en la figura 8.a y 8.b, así como en la tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de *spots* presentes en los diferentes geles.

Condición de la hoja de yuca	Número de <i>spots</i>
Sin inocular (control)	175
Inoculado después de 12hr.	124
Inoculado después de 24hr.	124
Inoculado después de 48hr.	147

Se compararon los perfiles proteicos de la hoja de yuca de la variedad resistente (22) sin inocular con cada perfil proteico inoculado después de 12, 24 y 48 horas por separado, donde se obtuvo como resultado que el número de coincidentes iba decreciendo (84, 53 y 30 *spots*) al compararse con cada perfil proteico inoculado con la bacteria (12, 24 y 48 horas), como se muestra en la figura 9 y tabla 2, a medida que transcurría el tiempo aumentaba la expresión de proteínas que le confieren resistencia a la planta o otros mecanismos de la planta.

Luego se comparó el perfil proteico inoculado después de 12 horas con los otros perfiles proteicos inoculados después de 24 y 48 horas por separado, se obtuvo un número de

coincidencias próximos entre los perfiles que fueron comparados con 12 horas (34 y 43 spots), se observa que siguen expresando nuevas proteínas, así como se mantiene la expresión de otras proteínas, como se muestra en la figura 10 y tabla 2.

Y por último, se comparó el perfil proteico inoculado después de 24 horas con el perfil proteico inoculado después de 48 horas, cerca de la mitad de las proteínas expresadas a las 24 horas se encuentran presentes a las 48 horas de inocular la bacteria (63 spots), podemos observar que se estabiliza la respuesta de la planta frente al patógeno, como se observa en la figura 11 y tabla 2.

Finalmente se realizo un análisis comparativo global, donde todos los perfiles proteicos se comparaban entre sí, obteniendo el número de spots coincidentes el cual corresponde a 15 proteínas constantemente presentes.

Tabla 2. Cantidad de *spots* coincidentes presentes entre las diferentes comparaciones de perfiles proteicos.

Comparación de los perfiles		Número de <i>spots</i> coincidentes
Sin inocular (control)	Inoculado después de 12horas	84
	Inoculado después de 24horas	53
	Inoculado después de 48horas	30
Inoculado después de 12horas	Inoculado después de 24horas	34
	Inoculado después de 48horas	43
Inoculado después de 24horas	Inoculado después de 48horas	63
Comparación Global		15



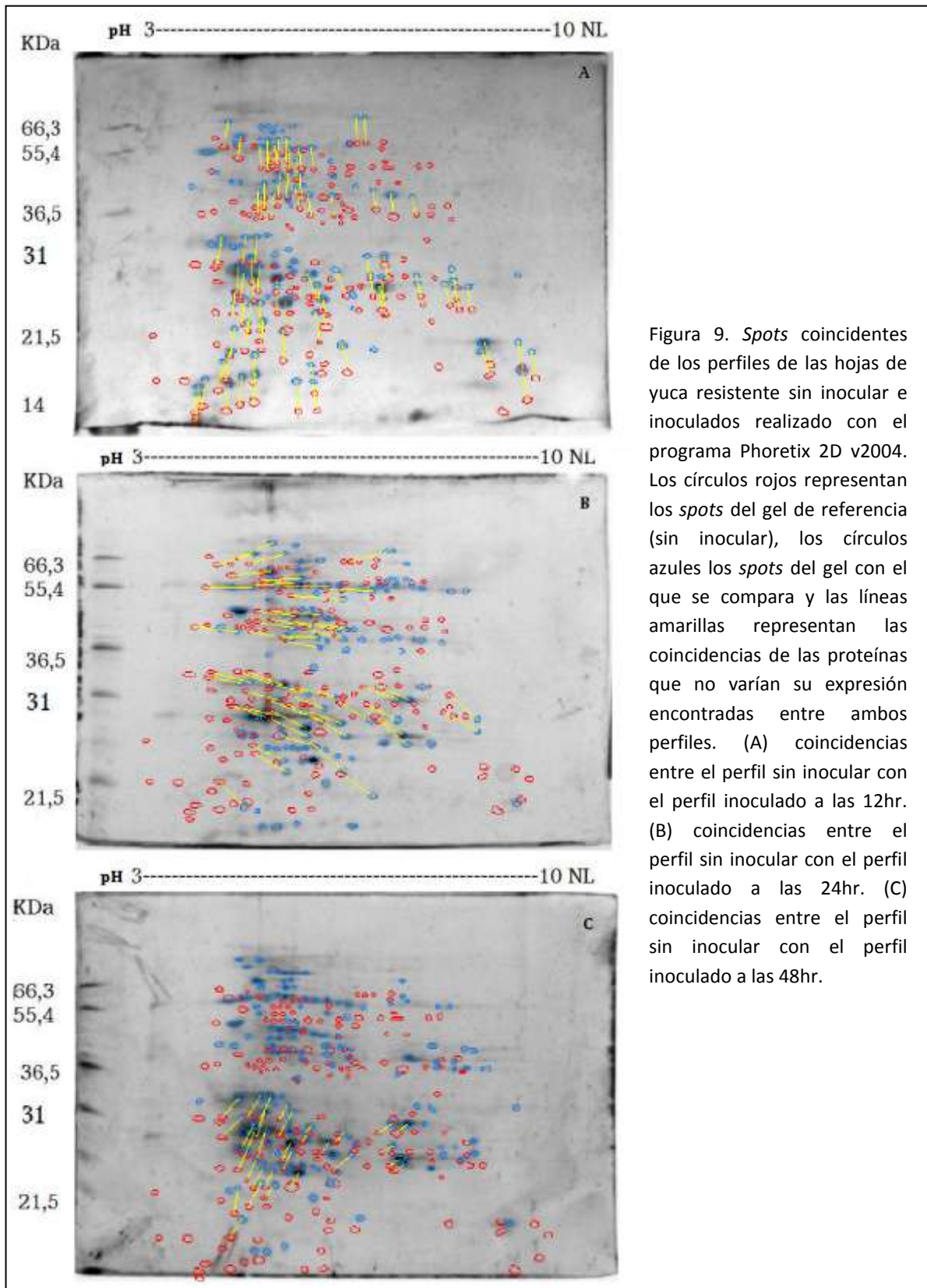


Figura 9. *Spots* coincidentes de los perfiles de las hojas de yuca resistente sin inocular e inoculados realizado con el programa Phoretix 2D v2004. Los círculos rojos representan los *spots* del gel de referencia (sin inocular), los círculos azules los *spots* del gel con el que se compara y las líneas amarillas representan las coincidencias de las proteínas que no varían su expresión encontradas entre ambos perfiles. (A) coincidencias entre el perfil sin inocular con el perfil inoculado a las 12hr. (B) coincidencias entre el perfil sin inocular con el perfil inoculado a las 24hr. (C) coincidencias entre el perfil sin inocular con el perfil inoculado a las 48hr.

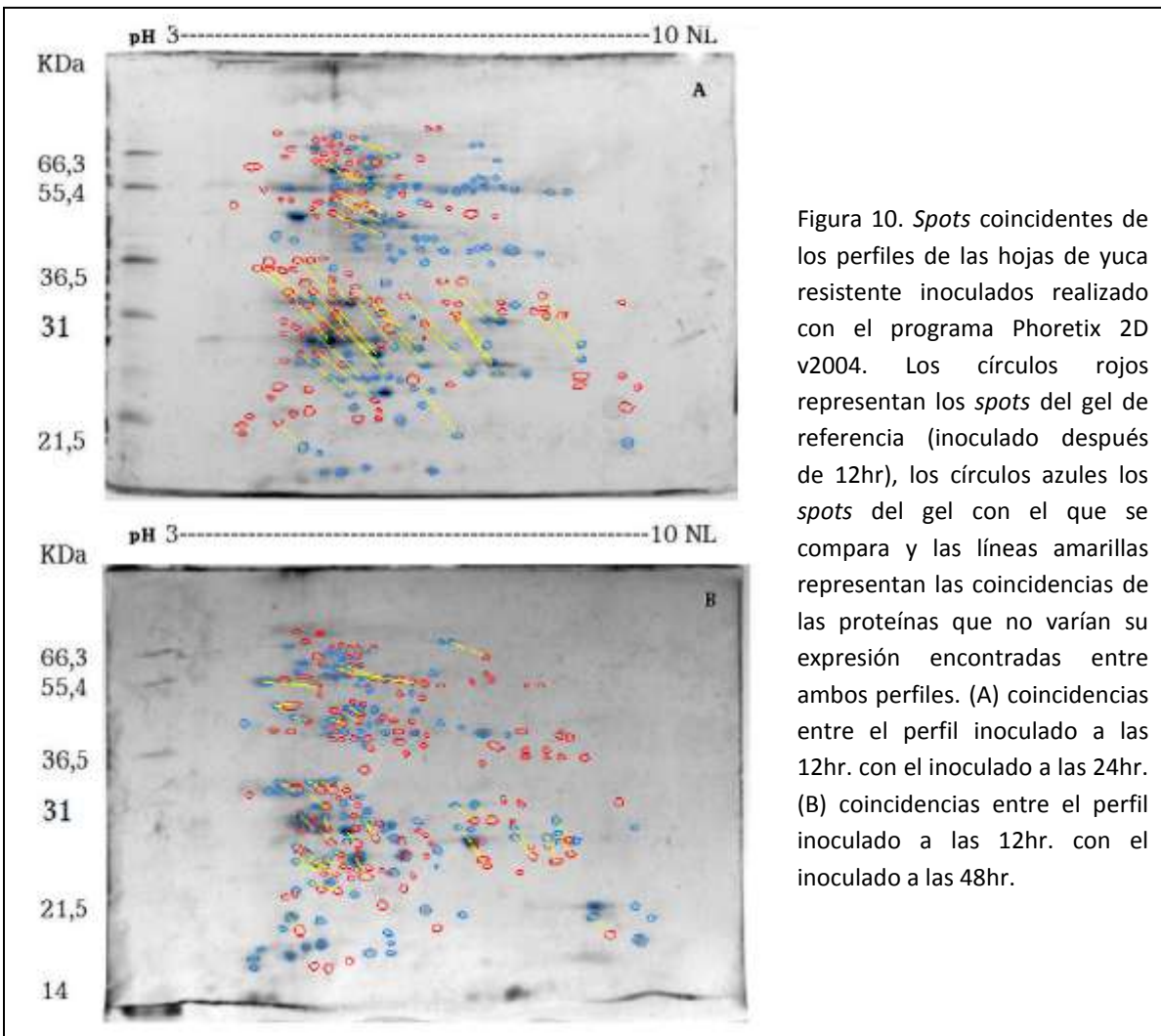


Figura 10. *Spots* coincidentes de los perfiles de las hojas de yuca resistente inoculados realizado con el programa Phoretix 2D v2004. Los círculos rojos representan los *spots* del gel de referencia (inoculado después de 12hr), los círculos azules los *spots* del gel con el que se compara y las líneas amarillas representan las coincidencias de las proteínas que no varían su expresión encontradas entre ambos perfiles. (A) coincidencias entre el perfil inoculado a las 12hr. con el inoculado a las 24hr. (B) coincidencias entre el perfil inoculado a las 12hr. con el inoculado a las 48hr.

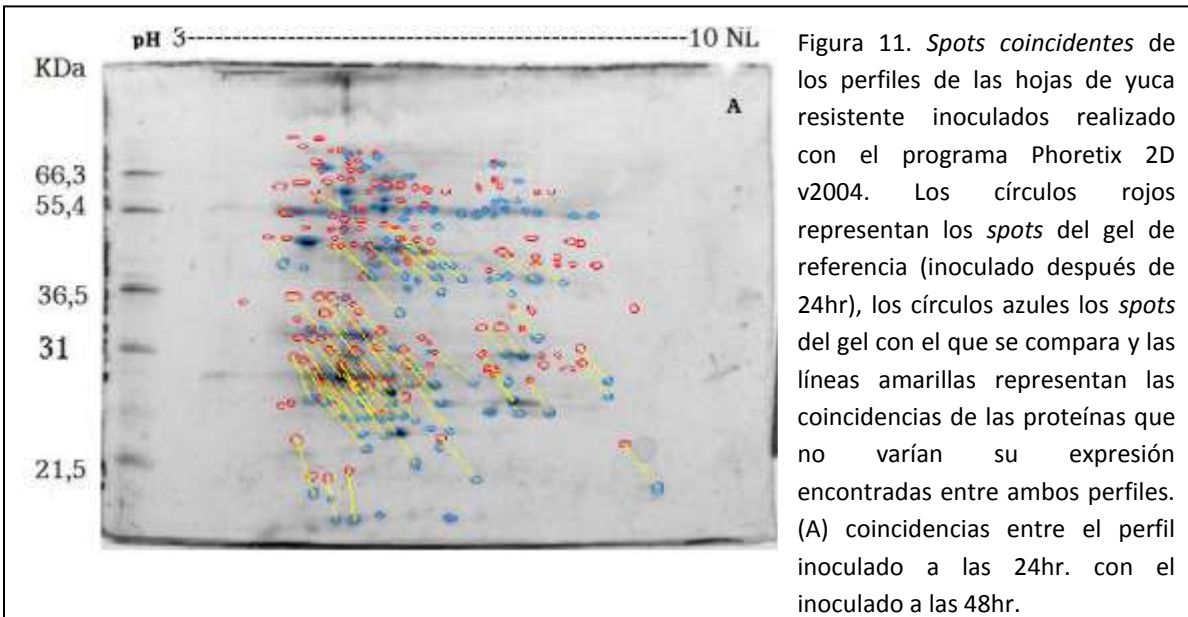


Figura 11. *Spots* coincidentes de los perfiles de las hojas de yuca resistente inoculados realizado con el programa Phoretix 2D v2004. Los círculos rojos representan los *spots* del gel de referencia (inoculado después de 24hr), los círculos azules los *spots* del gel con el que se compara y las líneas amarillas representan las coincidencias de las proteínas que no varían su expresión encontradas entre ambos perfiles. (A) coincidencias entre el perfil inoculado a las 24hr. con el inoculado a las 48hr.

Las 15 proteínas constantemente presentes tanto en el perfil sin inocular como en los perfiles inoculados encontrados en el análisis comparativo global, se observa en la tabla 3 los valores de pI y MM de cada una de estas proteínas en los cuatro perfiles proteicos. En la selección de las proteínas, se tomaron en cuenta las características similares de los *spots* en cuanto a su forma e intensidad, así como sus coordenadas de pI y MM. Es por ello que se decidió seleccionar estas 15 proteínas para estudiarlas a profundidad e identificarlas mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF.

Tabla 3. Valores de pI y MM de las 15 proteínas constantemente presentes en los perfiles proteicos de las hojas de yuca de la variedad resistente (22) sin inocular e inoculados.

Número del Spot en el gel de referencia	Control		12hr		24hr		48hr	
	PI	MM (KDa)	PI	MM (KDa)	PI	MM (KDa)	PI	MM (KDa)
1	6,662	28,808	6,675	28,097	6,706	28,150	6,756	27,250
2	4,548	28,393	4,633	28,229	4,462	28,557	4,573	28,625
3	4,748	28,263	4,808	27,833	4,688	28,693	4,750	28,750
4	4,668	30,457	4,769	29,813	4,668	30,457	4,730	30,500
5	5,130	27,931	5,178	27,701	5,141	27,336	5,143	27,500
6	5,320	25,245	5,314	25,326	5,326	25,164	5,281	24,750
7	4,296	19,400	4,419	20,160	4,091	18,098	4,376	19,941
8	6,865	25,981	6,850	26,382	6,871	25,437	6,933	25,625
9	6,800	26,716	6,811	26,910	6,788	26,521	6,874	26,125
10	6,603	30,854	6,617	29,944	6,685	30,593	6,756	29,375
11	6,931	29,926	6,889	29,944	6,912	30,457	6,002	29,375
12	4,813	32,400	4,847	32,604	4,771	32,269	4,829	32,328
13	5,162	26,386	5,178	26,778	5,162	26,386	5,163	26,750
14	4,636	32,511	4,672	32,604	4,565	32,410	4,671	32,527
15	4,180	32,729	4,283	32,375	4,194	32,551	4,337	32,328

### **Identificación de las proteínas invariablemente presentes.**

Luego de seleccionados los *spots* de interés, se cortaron del gel y se realizó la digestión trípica, preparando las muestras biológicas para su análisis en el espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF, actualmente por problemas de carácter técnico el equipo no está en funcionamiento, por lo cual, se tomó la decisión de realizar un análisis comparativo utilizando herramientas bioinformáticas, esta es una disciplina científica que utiliza la tecnología de la información para organizar, analizar y distribuir información de biomoléculas con la finalidad de responder preguntas complejas (Martínez Hormazábal, 2006).

Para realizar el análisis comparativo, la publicación que más información provee utilizando un tejido similar al nuestro corresponde a Baba y col. en el 2008, donde identificaron proteínas de cotiledones de embriones somáticos de yuca, sometidos a embriogénesis somática secundaria. Baba y col utilizaron herramientas proteómicas como la electroforesis bidimensional para la elaboración de los perfiles proteicos y la identificación de los *spots* mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF-TOF-MS. Las proteínas reportadas por los autores fueron presentadas en una tabla que corresponde a los parámetros fisicoquímicos y los péptidos señal que dan como resultado la identidad de las proteínas estudiadas, estos resultados pueden compararse con los parámetros fisicoquímicos de punto isoeléctrico y masa molecular que obtuvimos mediante el programa Phoretix 2D v2004 con nuestros resultados experimentales (tabla 4).

El resultado del análisis arrojó tres grupos de proteínas con sus funciones: Proteínas asociadas al metabolismo y energía (60%), defensa (26,7%) y proteínas no identificadas (13,3%)

(Figura 12). A continuación se discutirá las posibles funciones de estas proteínas en la hoja de yuca.

Tabla 4. Comparación de los parámetros MM (KDa) y pI, experimentales y teóricos identificados en el trabajo de Baba y col. 2008, con los parámetros MM (KDa) y pI obtenidos en este trabajo.

Número del spot en el gel de referencia	MM(KDa)/pI experimentales de este trabajo	MM(KDa)/pI teóricas (Baba y col. 2008)	MM(KDa)/pI experimentales (Baba y col. 2008)	Nombre de la proteína ID (NCBI)
1	28,8/6,7	28,6/8,5	28,8/5,8	Proteína 23KDa OEC gi 21265
2	28,4/4,5	28,4/1	36,4/5,9	Subunidad H del Fotosistema II gi 37721410
3	28,3/4,7			Proteína no identificada
4	30,4/4,7	29,4/4,7	39,6/4,4	Proteína 14-3-3 e 2 gi 44917153
5	27,9/5,1	27,7/5,3	37,4/5,1	Ascorbato peroxidasa APX3 gi 62526589
6	25,2/5,3			Proteína no identificada
7	19,4/4,3	17,8/5,7	20,5/5,4	Factor de iniciación de la traducción 5A gi 14193249
8	25,9/6,9	26,6/8,3	56,0/8,3	Peroxidasa gi 14029184
9	26,7/6,8	26,7/9,3	21,5/6,2	Ciclofilina gi 50931055
10	30,8/6,6	29,9/4,7	39,6/4,3	Proteína 14-3-3 gi 67107029
11	29,9/6,9	29,5/9,0	31,6/7,0	Proteína similar a la Osmotina (taumatina) gi 1220537
12	32,4/4,8	32,2/6,8	50,5/7,0	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa gi 62816190
13	26,4/5,1	26,1/4,7	33,4/4,2	Subunidad 20S proteosoma gi 7839485
14	32,5/4,6	32,2/7,0	51,3/8,0	lactoilglutación liasa gi 15221116
15	32,7/4,2	32,2/7,0	51,5/7,5	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa gi 82400215

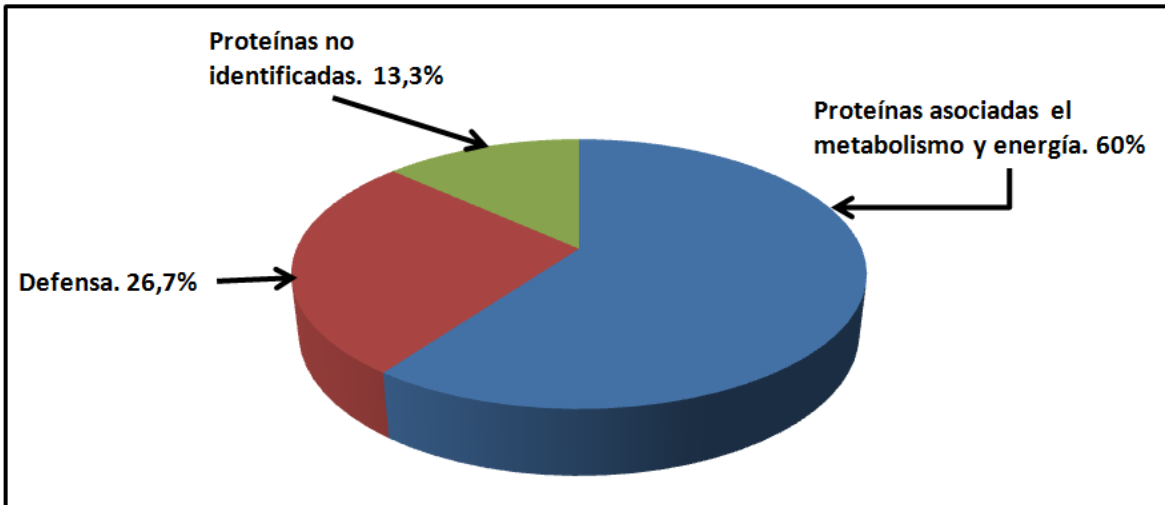


Figura 12. Clasificación funcional de las 15 proteínas constantemente presentes en las hojas de la variedad resistente de *Manihot esculenta* Crantz (22).

- Proteínas asociadas al metabolismo y energía

Las proteínas identificadas con funciones relacionadas al metabolismo y energía son el grupo mayoritario en las hojas de yuca, donde se encuentran:

### Fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los procesos metabólicos de los que se valen las células vegetales para obtener energía, estas captan energía luminosa procedente del sol y la transforman en energía química (ATP) y en compuestos reductores (NADPH). Con estos transforman el agua y el CO<sub>2</sub> en compuestos orgánicos reducidos (glucosa y otros), liberando oxígeno. El oxígeno en la atmósfera proviene de la luz impulsado por la oxidación del agua en un centro catalítico conocido como el fotosistema II (PSII), el cual está formado por diferentes subunidades, entre las cuales se encuentra la subunidad H identificada en este trabajo (*spot 2*). El PSII se encuentra en las membranas fotosintéticas de las plantas, algas y cianobacterias, y su generador de oxígeno central

(OEC) consta de cuatro iones de manganeso y un ión de calcio rodeado de una proteína altamente conservada (Barber, 2008). El OEC es responsable de la oxidación del agua, permitiendo que el PSII convierta la luz en energía química, y se compone de subunidades unidas a un lado del PSII (Collins y col., 2010) de las cuales la subunidad 23KDa fue identificada en este trabajo (*spot 1*). Las proteínas involucradas en el proceso de fotosíntesis son esenciales para las plantas ya que de este obtienen energía y nutrientes para su sustento. En este trabajo se seleccionaron las proteínas constantemente presentes, por lo que no es raro haber conseguido proteínas de este tipo ya que son primordiales para el mantenimiento de la planta. Además, es importante resaltar que en este trabajo el material biológico utilizado fueron las hojas de la planta de yuca lugar a donde se lleva a cabo este proceso.

#### Metabolismo de carbohidratos

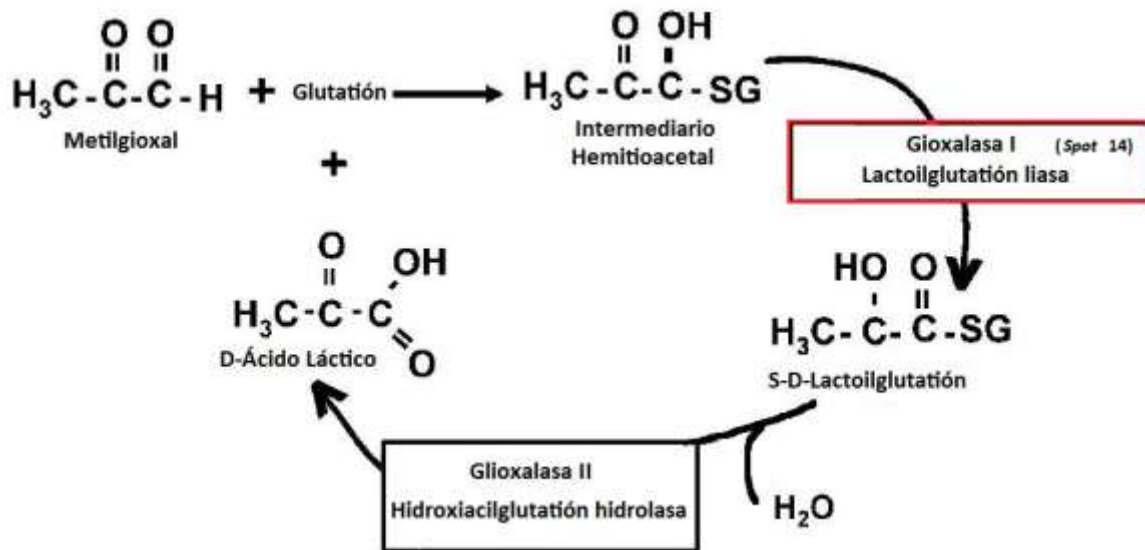
La vía glucolítica o glucólisis es la ruta encargada de proporcionar energía, conectando así el metabolismo de carbohidratos con el crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, la glucólisis tiene que ser altamente regulada para proporcionar la flexibilidad necesaria para responder a las diferentes demandas de plantas (Muñoz-Bertomeu, Anoman y col., 2011). Dos *spots* fueron identificados como gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*spots 12 y 15*), esta proteína cataliza la conversión de gliceraldehido-3-fosfato a 1,3 bifosfoglicerato por el acoplamiento de la reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH. Este es el primer paso hacia la vía de la biosíntesis de fosforilados de serina. La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es importante tanto para la glucólisis como también para la generación de metabolitos de otras vías anabólicas (Muñoz-Bertomeu, Bermúdez y col., 2011). La expresión de esta enzima aumenta durante el estrés osmótico, permitiendo así un

aumento del flujo de carbono a los solutos orgánicos ocasionando el ajuste osmótico de la célula (Taiz y Zeiger, 2006).

Otra proteína identificada en este trabajo fue la enzima lactoilglutación liasa también conocida como glioxalasa I (*spot 14*), la cual cataliza la condensación de metilglioxal y glutatión para formar lactoilglutación como paso intermedio en la conversión del metilglioxal en ácido láctico (figura 13). Esta enzima detoxifica el metilglioxal, el cual es un subproducto de la glucólisis, metabolismo de aminoácidos y cuerpos cetónicos (Lee y col., 2004). Se especula que la glioxalasa se expresa en las plantas que están expuestas a estrés osmótico ya que la actividad glicolítica es mayor debido a un aumento de la demanda de ATP (Mulako y col., 2008).

Las proteínas pertenecientes a este grupo juegan un papel fundamental en el metabolismo central de la planta, y que en su mayoría era lo que se esperaba encontrar ya que la hipótesis planteada en este trabajo ya que si las proteínas se encontraban constantemente presentes en la planta implica su rol “esencial” y posiblemente sean las responsables de su mantenimiento. Por otro lado hay que recordar, que las hojas utilizadas fueron infectadas con *Enterobacter cloacae*, lo cual pudo ser una de las causas por la que se hayan encontrado proteínas relacionadas con condiciones de estrés osmótico como es el caso ya discutido de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, sin obviar que las plantas siempre poseen proteínas que le permiten retornar al equilibrio ante una condición de estrés.





**Figura 13.** Sistema que se compone de dos enzimas gioxalasa, la gioxalasa I (Lactoilglutación liasa) y la gioxalasa II (Hidroxiacilglutación hidrolasa), la metilgioxal y gioxal forman un intermediario hemitioacetal y la gioxalasa I cataliza la formación de S-D-Lactoilglutación. La gioxalasa II cataliza la hidrólisis de la S-D-Lactoilglutación a D-Ácido Láctico y glutación (Lee y col., 2004).

### Síntesis y procesamiento de proteínas

Las células de las plantas reciben señales químicas del ambiente en el que se encuentran, estas señales también llamadas ligando las cuales tienen un receptor específico en la célula, una vez que este ligando se une al receptor se desencadena una serie de procesos llamados transducción de señales el cual conduce a una respuesta final (Curtis y Col., 2006). En este mecanismo de transducción de señales actúan dos proteínas identificadas en este trabajo, la proteína 14-3-3 e-2 y la 14-3-3 (*spots* 4 y 10, respectivamente). Las proteínas de la familia 14-3-3 son adaptadores universales que participan en múltiples procesos de la célula. La interacción de las proteínas 14-3-3 con el ligando se basa en el reconocimiento de secuencias consenso específicos de la misma (Sluchanko y Gusev, 2010). Las proteínas 14-3-3 regulan una amplia gama de proteínas diana a través de una interacción proteína-proteína, fosforilando al ligando llevando a cabo la transducción de la señal.

La respuesta a la transducción de señales es la regulación de la expresión genética, como la activación de genes y expresión de proteínas. En este trabajo se identificó el Factor de iniciación de la traducción 5A (eIF-5A) (*spot 7*), el cual es regulado negativamente ante tratamiento con sal, no se requiere para que la traducción ocurra, sino que está involucrado en la transportación de ARNm específicos del núcleo al citoplasma (Ruhl y col., 1993). Después de que el ARNm llega a su destino este es traducido a proteínas las cuales deben ser plegadas de forma eficiente, en sus conformaciones nativas a medida que se sintetizan con la ayuda de proteínas accesorias, que auxilian a los polipéptido en su plegamiento. Entre estas proteínas se encuentra la ciclofilinas (*spot 9*) identificada en este trabajo, se encuentran en mamíferos, plantas, insectos, hongos y bacterias. Están conservadas estructuralmente a lo largo de la evolución y todas ellas poseen actividad Peptidil-Propil cis-trans Isomerasa (PPIasa) (Wang y Heitman, 2005). Comparten un dominio común de 109 aminoácidos denominado *cyclophilin-like domain* (CLD), rodeado por dominios únicos de cada miembro de la familia y están asociados con la compartimentalización celular y la especialización de su función (Wang y Heitman, 2005). La actividad PPIasa promueve la rotación de los enlaces  $\alpha$ -Pro de la conformación “cis” a la “trans”, el cual es un paso limitante en el plegamiento de las proteínas (Romano y col., 2004) (figura 14).

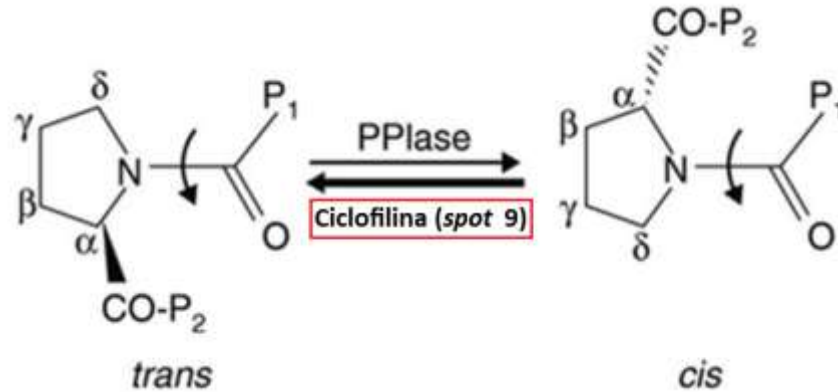


Figura 14. Representación esquemática de dos isómeros cis y trans entre el enlace peptídico prolina y otro aminoácido (P1). La ciclofilina cataliza la interconversión entre ambas conformaciones (Wang y Heitman, 2005).

Es lógico encontrar proteínas implicadas en la síntesis y procesamiento de proteínas, debido a que son procesos metabólicos primordiales en el desarrollo y mantenimiento de cualquier organismo. Por medio de este proceso la planta en su estado de infección, puede responder a ese estímulo, desviando el flujo de expresión de proteínas a las que sean importantes y relacionadas al estado en que esta se encuentra, para así adaptarse y superar la enfermedad. Es importante señalar que aunque se encontró en su mayoría proteínas relacionadas con el metabolismo de la planta, estas también poseen funciones involucradas a las condiciones de estrés tanto biótico como abiótico, que son utilizadas por la planta como vías alternas que le permiten a la planta sobrevivir al ataque del patógeno.

- Defensa

Un grupo importante de proteínas identificadas (26,7%), fueron las que participan en la defensa de la planta en diferentes condiciones de estrés, entre las cuales encontramos:

## Estrés oxidativo

Un mecanismo base, bajo condiciones de estrés, es la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden ocasionar daños en los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, lo que lleva a la interrupción de los procesos fisiológicos (Yan y col., 2003). Para evitar la inhibición del metabolismo y evitar la muerte celular, debe existir una reducción de las cantidades  $H_2O_2$  dentro de las células, este proceso es llevado a cabo por enzimas como la ascorbato peroxidasa (APX3) (*spot 5*) la cual se encuentra localizada en la membrana perioxosomal (Narendra y col., 2006), eliminando el peróxido de hidrógeno y utilizando ácido ascórbico para convertirlo en agua (García Pineda y col., 2004) (figura 15). Y la peroxidasa (*spot 8*) que es capaz de utilizar el  $H_2O_2$  para oxidar una variedad de metabolitos secundarios que produce la planta como mecanismo de defensa, especialmente los compuestos fenólicos. Se ha demostrado en otros trabajos que los fenoles pueden formar un ciclo de cooperación con la regeneración de ácido ascórbico, lo que permite peroxidasa / fenoles recoger las altas cantidades de  $H_2O_2$  (Ferrerres y col., 2011) (figura 16). Estas enzimas son importantes para la defensa de la planta ya que protegen a las células vegetales del daño estrés oxidativo.

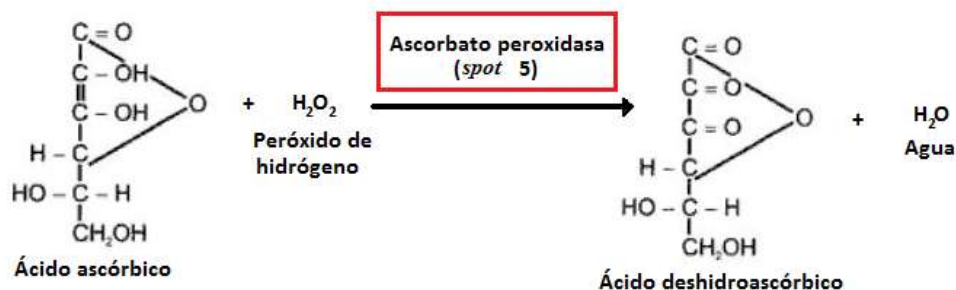


Figura 15. Representación de la acción de la proteína ascorbato peroxidasa (APX3). Donde el ácido ascórbico actúa como reductor, oxidándose a la forma deshidroascórbico por la enzima APX3 y liberando agua.

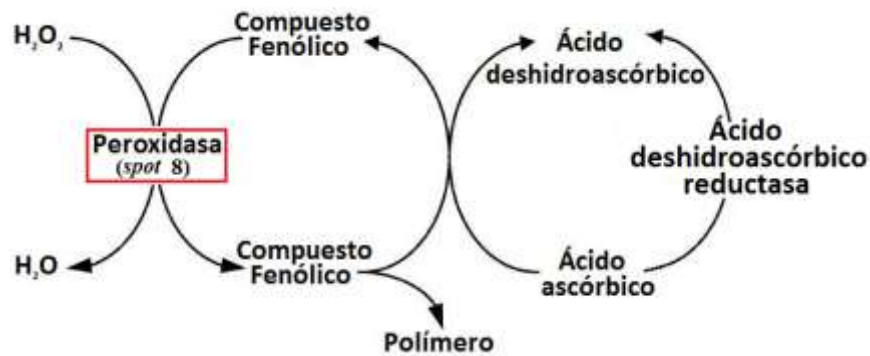


Figura 16. Ciclo de cooperación con la regeneración de ácido ascórbico, lo que permite peroxidasa/ fenoles recoger las altas cantidades de  $H_2O_2$ . Un compuesto fenólico se oxida en un radical fenólico por la acción de la peroxidasa, que a su vez oxida al ácido ascórbico a monodeshidroascorbato, la cual puede interactuar de forma espontánea para producir ácido ascórbico + ácido deshidroascórbico, que puede ser reducido por una ácido deshidroascórbico reductasa citosólica (Ferrerres y col., 2011).

Siguiendo con esta línea, se identifico la subunidad 20S del proteosoma (*spot 13*), la cual es una proteasa intracelular abundante que está implicada en varios procesos catabólicos (Fu y col., 1998). La subunidad 20S de proteosoma podría estar involucrada en la degradación de las proteínas modificadas por la oxidación. Los radicales y otras especies de oxígeno generan modificaciones en los aminoácidos de las proteínas, las cuales son reconocidas por la subunidad 20S del proteosoma y degradadas por el mismo, además de contribuir a la desintoxicación de la célula a través de la eliminación de las proteínas dañadas por oxidación, suministrando aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas y como sustrato para la producción de energía en la respiración (Basset y col., 2002).

El estrés oxidativo es una ruta que se activa cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés biótico como es el caso del ataque de patógenos, como ya se mencionó anteriormente en este trabajo se utilizaron las hojas de la planta infectadas *Enterobacter cloacae*, por lo cual es lógico haber identificado proteínas involucradas en este tipo de procesos de defensa.

### Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)

Otro grupo importante entre las proteínas de defensa son las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), las cuales están clasificadas en cinco grupos. La PR5, que es una proteína similar Osmotina (taumatina) fue identificada en este trabajo (*spot 11*). La osmotina se encuentra localizada en la vacuola y se ha demostrado en otros trabajos que la expresión de la misma es activada por la hormona ABA, NaCl, heridas, infecciones y etileno. El promotor del gen osmotina exhibe patrones específicos de expresión temporal y espacial durante el desarrollo normal de la planta y después de la adaptación de NaCl, sugiriendo su doble función ante la defensa de la planta y la presión osmótica (Zhu y col., 1995).

Las proteínas relacionadas con la patogenicidad y mecanismos de defensa tanto en condiciones de estrés biótico como abiótico son esenciales en las plantas ya que son necesarias para poder reaccionar ante cualquier tipo de perturbación que pueda ocasionarles algún daño. Y como el material biológico utilizado en este trabajo fue infectado con *Enterobacter cloacae*, la planta debe reaccionar ante este estímulo, promoviendo la expresión de proteínas de defensa que contengan al patógeno deteniendo la invasión del mismo y evitando así, el desarrollo de la enfermedad.

- Proteínas no identificadas:

No se pudo identificar dos proteínas debido a que el genoma de la yuca no ha sido completamente secuenciado, por lo tanto aun no se conoce la función de todos los genes y proteínas del mismo. Es importante recalcar que a pesar de no contar con el procesamiento por

medio del MALDI-TOF, se logro identificar mediante la bioinformática los posibles nombres y funciones de 13 de las 15 proteínas de interés.

Las plantas están sometidas a numerosas condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, el cambio de las condiciones en donde se desarrolla la planta desencadenan una serie de mecanismos para la aclimatación de la misma. Donde empieza la traducción de señales que induce la activación de genes, la síntesis de nuevos conjuntos de proteínas y la degradación de otras. La producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS) como respuesta al estímulo, conjuntamente debe ocurrir una reducción de estas especies, para evitar dañar los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Simultáneamente incrementa la demanda de ATP, por lo que la planta se ve forzada a mantener vías metabólicas activas para la generación de esta importante molécula.

Este trabajo nos permitió tener una visión de la importancia que tienen algunas rutas metabólicas en el sostenimiento de las plantas y como su presencia es fundamental frente a un posible ataque biótico, aumentando así la información ya existente de este importante rubro alimenticio, los resultados aquí presentados son un aporte para colaborar en la comprensión de los mecanismos bioquímicos globales que se pueden presentar en este rubro y permitir en un futuro el mejoramiento del mismo.

## Conclusiones

Con el uso de herramientas proteómicas en la especie resistente de *Manihot esculenta* Crantz durante la evolución de la infección del patógeno, se logró identificar un grupo de proteínas invariablemente presentes.

El uso de herramientas bioinformáticas permitió que a partir de resultados experimentales (geles bidimensionales) y utilizando información de las bases de datos dilucidar la función de las proteínas seleccionadas y el papel que tienen en el mantenimiento de la planta.

Las proteínas identificadas en este trabajo participan mayoritariamente en funciones metabólicas para el mantenimiento de la yuca, así como también están asociadas en la respuesta de defensa de la planta, esta información va a complementar la ya existente en referencia a este rubro y va a permitir en un futuro comprender los mecanismos bioquímicos globales que se pueden presentar en estas plantas.



## **Recomendaciones**

Finalizar la técnica del MALDI-TOF, realizando el disparo para la obtención de la huella peptídica y corroborar la identificación de las mismas en el presente trabajo.

Ampliar el estudio de las rutas metabólicas para la comprensión de los mecanismos bioquímicos globales, que se presentan en este importante rubro alimenticio.

## Bibliografía

1. Baba, A.I., Nogueira, F.C.S., Pinheiro, C.B., Brasil, J.N., Jereissati, E.S., Jucá, T.L., Soares, A.A. y colaboradores. 2008. Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Sci.* **175**:717-723.
2. Barber, J. 2008. Photosynthetic generation of oxygen. *Philus Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **363(1504)**:2665-74.
3. Basset, G., Raymond, P., Malek, L. y Brouquisse, R. 2002. Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. evidence for an in vivo oxidation of the proteasome. *Plant Physiol.* **128(3)**:1149-62.
4. Collins, R.M., Afzal, M., Ward, D.A., Prescott, M.C., Sait, S.M., Rees, H.H. y Tomsett, A.B. 2010. Differential proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella*. *PLos One.* **5(4)**:e10103.
5. Curtis, H., Barnes, N.S. y colaboradores. 2006. Invitación a la Biología. Sexta edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
6. Ferreres, F., Figueiredo, R., Bettencourt, S., Carqueijeiro, I., Oliveira, J., Gil-Izquierdo, A., Pereira D.M. y col. 2011. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affair?. *J Exp Bot.* **62(8)**:2841-54.
7. Fu, H., Doelling, J.H., Arendt, C.S., Hochstrasser, M. y Vierstra, R.D. 1998. Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* **149(2)**:677-92.

8. Lee HY, Xu Y, Huang Y, Ahn AH, Auburger GW, Pandolfo M, Kwiecinski H y colaboradores. 2004. The gene for paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia encodes an enzyme in a stress response pathway. *Hum Mol Genet.* **13(24)**:3161-70.
9. Li, K., Zhu, W., Zeng, K., Zhang, Z., Ye, J., Ou, W., Rehman, S. y colaboradores. 2010. Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Sci.* **8**: 10.
10. Mabrouk, A. 2004. Cassava biology and physiology. *Plant Mol Biol.* **56**: 481-501.
11. Maldonado A., A. M. y Jorrín N., J., 2003. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba.*
12. Martínez Hormazábal, J. 2006. Función e Importancia de la Bioinformática en el Desarrollo de las Ciencias, Especialmente en Biotecnología y Medicina Molecular. *Ciencia & Trabajo.* **22**: 159-163.
13. Mehta, A., Brasileiro, A., Souza, D., Romano, E., Campos, M., Grossi-de-Sá, M., Silva, M. y colaboradores. 2008. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us?. *FEBS J.* **275**: 3731-3746.
14. Mulako, I., Farrant, J.M., Collett, H. y Illing, N. 2008. Expression of Xhdsi-1VOC, a novel member of the vicinal oxygen chelate (VOC) metalloenzyme superfamily, is up-regulated in leaves and roots during desiccation in the resurrection plant *Xerophyta humilis* (Bak) Dur and Schinz. *J Exp Bot.* **59(14)**:3885-901.

15. Muñoz-Bertomeu, J., Anoman, A.D., Toujani, W., Cascales-Miñana, B., Flores-Tornero, M. y Ros, R. 2011. Interactions between abscisic acid and plastidial glycolysis in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* **6(1)**:157-9.
16. Muñoz-Bertomeu, J., Bermúdez, M.A., Segura, J. y Ros, R. 2011. Arabidopsis plants deficient in plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase show alterations in abscisic acid (ABA) signal transduction: interaction between ABA and primary metabolism. *J Exp Bot.* **62(3)**:1229-39.
17. Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Kornyejev, D. y colaboradores. 2006. The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development. *J Exp Bot.* **57(12)**:3033-42.
18. Nishijima, K.A., Alvarez, A.M., Hepperly, P.R., Shintaku, M.H., Keith, L.M., Sato, D.M., Bushe, B.C. y col. 2004. Association of *Enterobacter cloacae* with Rhizome Rot of Edible Ginger in Hawaii. *Plant Dis.* **88(12)**:1318-1327.
19. O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* **250(10)**:4007-21.
20. Ortega, E. y Velásquez, E. 2005. La bacteriosis o añublo bacteriano: principal desafío para la producción exitosa de yuca. *INIA*. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Monagas. Caripe. 44-50.
21. Pereira, A., Lapenta, A., Vidigal-Filho, P., P.S. Machado, M. 2001. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. *Biochem Genet.* **39**: 289-296.

22. Romano, P.G., Horton, P. y Gray, J.E. 2004. The Arabidopsis cyclophilin gene family. *Plant Physiol.* **134(4)**:1268-82.
23. Ruhl, M., Himmelspach, M., Bahr, G.M., Hammershimd, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H. y col. 1993. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol.* **123(6 Pt 1)**:1309-20.
24. Santana, M.A.; Rodriguez, M.; Matehus, J.; Faks, J.; Bocsanczy, A.; Gerstl, A., Romay, G. Y colaboradores. *Enterobacter cloacae* is the causal agente of a new bacterial disease of cassava in Venezuela. *J Plant Pathol.* En imprenta.
25. Sheffield, J., Taylor, N., Fauquet, C. and Chen, S. 2006. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root proteome: Protein identification and differential expression. *Proteomics.* **6**: 1588-1598.
26. Simpson, R. 2003. Proteins and Proteomics: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
27. Sluchanko, N.N. y Gusev, N. B. 2010. 14-3-3 Proteins and Regulation of Cytoskeleton. *Biochemistry.* **75(13)**:1528-46.
28. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiologia vegetal volume 2. Publicacions de la Universitat Jaume I, D.L.
29. Tsunetzuka, H.; Fujiwara, M., Kawasaki, T., Shimamoto, K. 2004. Proteome Analysis of Programmed Cell Death and Defense Signaling Using the Rice Lesion Mimic Mutant *cdr2*. *MPMI.* **18**: 52–59.
30. Wang, P. y Heitman, J. 2005. The cyclophilins. *Genome Biol.* **6(7)**:226.
31. Walker, J.M. 2002. Protein Protocol Handbook. Segunda Edición. Human Press, Totowa, N.J.

32. Yan, J., Wang, J., Tissue, D., Holaday, A. S., Allen, R. and Zhang, H. 2003. Photosynthesis and Seed Production under Water-Deficit Conditions in Transgenic Tobacco Plants That Overexpress an Arabidopsis Ascorbate Peroxidase Gene. *Crop Sci.* 43:1477–1483.
33. Zhu, B., Chen, T.H. y Li, P.H. 1995. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **108(3)**:929-37.

### Consultas en línea

1. [http://images.isiknowledge.com/WOK46/help/WOS/J\\_abrvjt.html](http://images.isiknowledge.com/WOK46/help/WOS/J_abrvjt.html) (última consulta en 2010).
2. <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000899/index.html> (última consulta en octubre 2010).
3. García Pineda, E., Castro Mercado, E. y Arreola Cortés, A. 2004. Oxígeno herramienta para fabricar defensas bioquímicas en la planta del chile. *Ciencia y Desarrollo*.  
[<http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/ArticulosCompleto/pdf/Oxigeno.pdf>]