



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Perfil proteómico de extractos de proteínas en plátano
(*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

HUGO OSVALDO DELGADO GÓMEZ

TUTOR

DOCTOR HORACIO REYES VIVAS

CIUDAD DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Delgado
Gómez
Hugo Osvaldo
55 64 23 93 13
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311078824

2. Datos del tutor

Doctor
Horacio
Reyes
Vivas

3. Datos del sinodal 1

Doctor
Saúl
Gómez
Manzo

4. Datos del sinodal 2

Doctor
Jesús Antonio
Oria
Hernández

5. Datos del sinodal 3

Doctor
Javier Rolando
Ambrosio
Hernández

6. Datos del sinodal 4

Doctora
Laura del Carmen
Vargas
Parada

7. Datos del trabajo escrito.

“Perfil proteómico de extractos de
proteínas en plátano (*Musa
paradisiaca*) y pera (*Pyrus
communis*)”.
74 pp.
2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a aquel que me amó inmensamente y me ha guiado a lo largo de este camino, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y darme el coraje para seguir adelante. También le agradezco por todo aquello que inmerecidamente recibí, así como las personas que se fueron uniendo a esta causa.

Este proyecto de Tesis es un esfuerzo en el cual participaron distintas personas, directa o indirectamente, opinando, corrigiendo, brindarme su paciencia, dándome ánimo, e incluso acompañándome en mis momentos de crisis. Sin embargo, a lo largo de este tiempo he tenido la oportunidad de aprovechar la experiencia de muchas personas a las cuales les debo toda mi gratitud.

Le doy mi más amplio agradecimiento a mi tutor y director de Tesis, Dr. Horacio Reyes Vivas por haberme asignado este proyecto de investigación. Le agradezco por su paciencia en mis momentos de inconsistencia, pero sobre todo, gracias por su valiosa dirección y experiencia que juntamente con su esposa Angélica Torres Arroyo me brindaron a lo largo de este camino.

Agradezco al Taller "*Enzimología y proteómica aplicada a problemas de salud en pediatría*" de la Universidad Nacional Autónoma de México que me dio la oportunidad de asignarme un tutor con el cual trabajaría en la elaboración de mi proyecto de Tesis.

Al Instituto Nacional de Pediatría, por abrirme las puertas de sus instalaciones, así como al encargado del laboratorio "Bioquímica genética", Dr. Jesús Oria Hernández por haberme recibido en su grupo de investigación.

Agradezco a todos los integrantes de dicho laboratorio que me brindaron su experiencia, tiempo y conocimiento durante mi instancia.

Un especial agradecimiento al Jurado integrado por el Dr. Saúl Gómez, Dr. Jesús Oria, Dr. Javier Ambrosio y la Dra. Laura Vargas, quienes me brindaron su apoyo en la revisión de mi trabajo escrito entre muchas otras cosas.

Finalmente, agradezco inmensamente a aquellas personas que siempre confiaron en mí, quienes han dedicado todo su tiempo y esfuerzo desde el día en el que llegue a sus vidas. A ustedes, papá y mamá gracias por haberme educado y guiado juntamente con Dios a lo largo de estos años. Gracias por los valores que me han inculcado que juntamente con su dirección, dedicación, corrección, experiencia y sobre todo su amor me han convertido en la persona que soy ahora.

A mis hermanos por ser esa pieza importante de felicidad en mi vida, que ha sido mi motor que me hace seguir adelante.

Gracias a toda mi familia que son un ejemplo de unidad familiar el cual me motiva a esforzarme aún más. Gracia a todos por su apoyo, moral, espiritual y económico que me brindaron a lo largo de mi educación.

A todos ustedes, mi mayor gratitud, respeto y admiración.

Hugo.

RESUMEN

La proteómica es una de las herramientas más utilizadas en el estudio y la aplicación de diversas patologías humanas que van desde la preparación de muestras proteicas hasta su identificación. Por otra parte, la inmunoproteómica es una herramienta útil para el develamiento de grandes paneles de biomarcadores clínicos, así como de candidatos terapéuticos para el diseño de futuras vacunas o inmunoterapia de enfermedades infecciosas, alergias, entre otras enfermedades. Actualmente, las alergias alimentarias son consideradas un problema global de salud que ha ido en aumento en las últimas décadas; entre éstas, la alergia a frutas constituyen más del 30% de las reacciones alérgicas a los alimentos. Sin embargo, el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad suele resultar complicada por lo que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico preciso que permitan la identificación certera de alérgenos específicos. Por lo tanto, este estudio pretende obtener un perfil proteómico de extractos de pulpa de frutas como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*), mediante la optimización de métodos de extracción de proteínas por solventes orgánicos. La optimización del método de extracción proteica de pulpas de plátano y pera brindó un rendimiento de extracción del 0.373% y 0.112%, permitiendo la obtención de perfiles proteicos de alta resolución. Por lo tanto, se logró optimizar un método de extracción proteica para tejidos frutales como el plátano y la pera mediante solventes orgánicos, proporcionando de esta manera, proteínas libres de compuestos interferentes presentes en dichos organismos frutales. Las extracciones obtenidas serán de utilidad para estudios posteriores de análisis inmunoproteómico.

ÍNDICE

Pág.

| | |
|--|-----------|
| I. MARCO TEÓRICO..... | 1 |
| GENERALIDADES..... | 1 |
| 1.1 PROTEÓMICA..... | 1 |
| 1.2 OBJETIVOS DE LA PROTEÓMICA..... | 2 |
| 1.3 APLICACIONES DE LA PROTEÓMICA..... | 2 |
| 1.4 HERRAMIENTAS DE LA PROTEÓMICA..... | 3 |
| 1.4.1 EXTRACCIÓN PROTEICA..... | 5 |
| 1.4.2 SEPARACIÓN PROTEICA POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL..... | 8 |
| 1.4.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS..... | 9 |
| 1.5 PROTEÓMICA CLÍNICA..... | 9 |
| 1.6 INMUNOPROTEÓMICA..... | 10 |
| 1.7 HIPERSENSIBILIDAD ALIMENTARIA..... | 10 |
| 1.8 CLASIFICACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS A ALIMENTOS..... | 12 |
| 1.9 ALIMENTOS CAUSANTES DE REACCIONES ALÉRGICAS..... | 14 |
| ANTECEDENTES..... | 15 |
| 1.10 ALERGIA A FRUTAS..... | 15 |
| 1.11 EPIDEMIOLOGÍA DE REACCIONES ADVERSAS A FRUTAS..... | 16 |
| 1.12 ALERGIA A PROTEÍNAS FRUTALES..... | 17 |
| 1.13 REACTIVIDAD CRUZADA..... | 19 |
| 1.14 FISIOPATOGÉNIA DE LA ALERGIA A FRUTAS..... | 21 |
| 1.15 MANIFESTACIONES CLÍNICAS..... | 22 |
| 1.16 DIAGNÓSTICO..... | 24 |
| 1.17 TRATAMIENTO..... | 25 |
| II. JUSTIFICACIÓN..... | 26 |
| III. HIPÓTESIS..... | 27 |
| IV. OBJETIVOS..... | 27 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 28 |
| 5.1 PLAN DE TRABAJO..... | 28 |
| A) EXTRACCIÓN PROTEICA DE LA PULPA DE PLÁTANO Y PERA..... | 29 |
| B) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN UNA DIMENSIÓN (1DE)..... | 31 |
| C) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO LOWRY-TCA..... | 33 |
| D) PRECIPITACIÓN SECUNDARIA..... | 34 |
| E) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN DOS DIMENSIONES (2DE)..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| F) ELECTROTRANSFERENCIA CON ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES | 38 |
| G) ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GELES 2DE Y MEMBRANAS DE PVDF.... | 39 |
| VI. RESULTADOS. | 41 |
| 6.1. EXTRACTO PROTEICO FRUTAL | 41 |
| 6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO LOWRY-TCA..... | 41 |
| 6.3 ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS MEDIANTE PRECIPITACIÓN SECUNDARIA..... | 42 |
| 6.4 SEPARACIÓN PROTEICA MEDIANTE SDS-PAGE..... | 44 |
| 6.5 DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS DE PLÁTANO Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF..... | 45 |
| 6.6 DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS DE PERA Y TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE PVDF | 47 |
| 6.7 ANÁLISIS PROTEICO EN GELES 2DE Y MEMBRANAS DE PVDF | 49 |
| VII. DISCUSIÓN. | 52 |
| 7.1 EXTRACCIÓN PROTEICA DE PLÁTANO Y PERA MEDIANTE SOLVENTES ORGÁNICOS..... | 52 |
| 7.2 EFECTIVIDAD EN MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN SECUNDARIA DE PROTEÍNAS..... | 55 |
| 7.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA..... | 57 |
| 7.4 EVALUACIÓN DEL PERFIL PROTEÓMICO DE PLÁTANO Y PERA MEDIANTE 2DE | 58 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 62 |
| IX. REFERENCIAS. | 63 |
| X. ANEXOS | 72 |
| <u>ANEXO 1</u> | 72 |
| <u>ANEXO 2</u> | 72 |
| <u>ANEXO 3</u> | 73 |
| <u>ANEXO 4</u> | 73 |
| <u>ANEXO 5</u> | 74 |
| <u>ANEXO 6</u> | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| Figura | Tablas | Título | Pág. |
|---------------|---------------|--|-------------|
| 1 | | Metodología simplificada del análisis proteómico | 4 |
| 2 | | Clasificación de las reacciones adversas a alimentos | 13 |
| | 1 | Prevalencia de alergias (%) por frutas y hortalizas en tres regiones diferentes del mundo | 16 |
| | 2 | Reactividad cruzada y riesgo de reacciones alérgicas entre alimentos | 20 |
| 3 | | Mecanismo general a una reacción de hipersensibilidad tipo 1 | 22 |
| 4 | | Plan de trabajo | 29 |
| 5 | | Esquematzación de corrida de SDS-PAGE | 32 |
| | 3 | Soluciones utilizadas para la realización del método Lowry | 33 |
| | 4 | Datos correspondientes a la curva patrón realizada para la cuantificación proteica mediante el método Lowry-TCA | 34 |
| | 5 | Programación del equipo de IEF para la separación proteica | 37 |
| 6 | | Esquematzación de lo elementos de transferencia en cámara semihúmeda | 39 |
| | 6 | Rendimiento proteico obtenido mediante el método optimizado de extracción proteica mediante solventes orgánicos | 41 |
| 7 | | SDS-PAGE al 12% de extractos de plátano | 43 |
| 8 | | Comparación de métodos de precipitación proteica mediante SDS-PAGE al 12% de extractos de plátano | 44 |
| 9 | | SDS-PAGE al 12% de proteínas de plátano y pera | 45 |
| 10 | | Electroforesis bidimensional de proteínas de los extractos de plátano en un gel de poliacrilamida al 12 % y glicerol al 13%; y transferencia a membrana revelada con colorante | 46 |
| 11 | | Electroforesis de dos dimensiones de proteínas de los extractos de pera en un gel de poliacrilamida al 12 % y glicerol al 13%; y transferencia a membrana revelada con colorante | 48 |
| 12 | | Análisis comparativo entre geles 2DE y membranas PVDF del perfil proteómico de extractos de pulpa de plátano | 50 |
| 13 | | Análisis comparativo entre geles 2DE y membranas PVDF del perfil proteómico de extractos de pulpa de pera | 51 |

ABREVIATURAS

2DE (Electroforesis bidimensional)

Ac (Anticuerpo)

Ag (Antígeno)

BSA (Del inglés “Bovine Serum Albumin”: Albúmina sérica bovina)

DTT (Ditiotreitol)

EST (Del inglés “Expressed Sequence Tag”: Marcadores de secuencia expresada)

IEF (Isoelectroenfoque)

IgE (Inmunoglobulina tipo E)

IgG (Inmunoglobulina tipo G)

IgM (Inmunoglobulina tipo M)

IT (Inmunoterapia)

M (Molar)

MALDI (Del inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption / ionization”: Desorción / ionización mediante láser asistida por matriz)

mM (Milimolar)

MS (Espectometría de masas)

PBS (Amortiguador de fosfato salino)

LTP (Proteínas transportadoras de lípidos)

PVDF (Polifluoruro de vinilideno)

SAO (Síndrome de alergia oral)

SDS (Del inglés “Sodium Dodecil Sulfate”: Duodecilsulfato sódico)

SDS-PAGE (Del inglés (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

TCA (Del inglés “Trichloroacetic acid”: Ácido tricloroacético)

I. MARCO TEÓRICO.

GENERALIDADES

1.1 PROTEÓMICA

Una vez concluida la secuenciación del genoma humano, es necesario disponer de técnicas que permitan comprender la relación entre la expresión de los genes y los problemas biológicos ¹. Las metodologías de análisis de proteínas despiertan gran interés, tanto para la investigación básica como para las investigaciones dirigidas a la biomedicina. Se puede así analizar sistemáticamente el proteoma en las más variadas circunstancias de tiempo y ambiente ².

Evidentemente, muchas de las características propias de estos componentes esenciales, que regulan la maquinaria biológica, como son sus modificaciones post-traduccionales o sus interacciones, no son deducibles directamente de estudios genómicos ni transcriptómicos ². Este es precisamente el campo de la proteómica, ciencia dedicada al estudio de la expresión de las proteínas y de sus cambios en dependencia del contexto biológico. La proteómica estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo; en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, como enfermedades, factores ambientales y fisiológicos como la edad, el estrés, agentes tóxicos y/o fármacos ³.

La proteómica comprende tanto las técnicas para el estudio en gran escala de las proteínas expresadas (proteoma) como las aplicaciones de estas técnicas al análisis de problemas biológicos ⁴. La forma más adecuada para realizar el análisis y la caracterización del proteoma, dependerá de las estrategias que se apliquen para la preparación de las muestras biológicas complejas, de los

métodos de análisis a utilizar y de la infraestructura disponible. Muchos de los métodos utilizados en proteómica permiten obtener un despliegue u ordenamiento físico de mezclas complejas de proteínas, separadas mediante la combinación de dos o más técnicas de separación ⁵.

1.2 OBJETIVOS DE LA PROTEÓMICA

La ciencia de la proteómica no es nueva en sus bases experimentales, pero ha dado un salto cualitativo y cuantitativo sensible gracias al desarrollo convergente de diferentes áreas de investigación como son los proyectos de secuenciación de distintos genomas ⁶. El objetivo general de la proteómica es analizar los proteomas y la variabilidad de estos en las diferentes células de un tejido, con el fin de resaltar las diferencias entre ellas. A nivel específico, uno de los principales objetivos de la proteómica es proporcionar información útil en el campo de la biomedicina acerca de los cambios en los perfiles de expresión proteica específicos y de los mecanismos asociados a éstos en diferentes estadios celulares, con una finalidad a largo plazo de desarrollar mejores métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades ⁷.

1.3 APLICACIONES DE LA PROTEÓMICA

La expresión y caracterización de proteínas es un tema de particular e importante interés dentro del área de la investigación clínica y básica. Además de las implicaciones directas en el desarrollo, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, mediante la proteómica se pueden identificar y validar la expresión de proteínas que se correlacionan a los diferentes estados fisiológicos del organismo y como tal, pueden ser útiles como indicadores de dicho estado ⁸.

Las múltiples aplicaciones de estas técnicas pueden agruparse en las siguientes categorías:

- ❖ **Caracterización del proteoma de un organismo.** El propósito de este estudio es identificar el mayor número de proteínas expresadas por un organismo en una condición biológica particular.
- ❖ **Proteómica comparativa.** Consiste en evaluar los cambios en la expresión de proteínas de un organismo sometido a dos o varias condiciones biológicas diferentes, generalmente una de ellas es una condición control que se utiliza como referencia de la expresión de proteínas en condiciones “normales”.
- ❖ **Interacción de proteínas.** En los últimos años ha quedado evidenciada la importancia de identificar las interacciones entre proteínas y de proteínas con otras moléculas. Estos resultados contribuyen significativamente al establecimiento de mapas de interacciones y al esclarecimiento del mecanismo de determinadas funciones biológicas.

Básicamente, la proteómica pone en juego un conjunto de técnicas destinadas a resolver, cuantificar, identificar y caracterizar proteínas así como almacenar y analizar los datos ⁶.

1.4 HERRAMIENTAS DE LA PROTEÓMICA

El estudio de la proteómica es cada vez más atractivo dada las amplias bases de datos de secuencia genómicas y marcadores de secuencia expresada (EST) que proporcionan grandes oportunidades para identificar proteínas. La electroforesis bidimensional (2DE) un método eficiente para la separación de proteínas ya que permite separar cientos, incluso miles de proteínas en un solo experimento. Para ello es necesario disponer de técnicas que permitan: a) separar miles de

moléculas; b) identificar las moléculas de interés y c) cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de proteínas. La proteómica aborda este complejo problema técnico con variadas herramientas ⁹.

En consecuencia, la investigación proteómica es el resultado de la aplicación de un conjunto de técnicas que permiten el estudio de proteínas. A continuación, se describe y ejemplifica en la figura 1 de forma resumida una metodología para el análisis proteómico para una muestra ¹⁰.

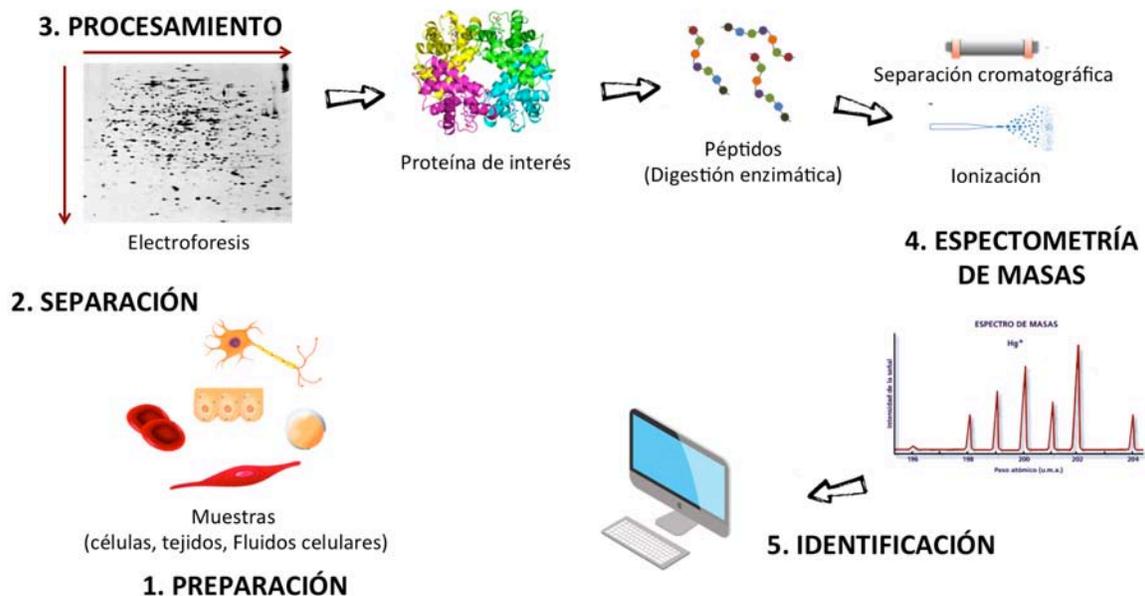


Figura 1. Metodología simplificada del análisis proteómico. La investigación proteómica requiere de un conjunto de técnicas que permitan: 1) La preparación de las muestras, 2) Separación proteica, 3) El procesamiento de las muestras, 4) Identificación proteica, así como 5) La identificación de las mismas ^{9,10}.

- 1. Preparación de muestras.** Cualquiera que sea su origen, las muestras biológicas sometidas a 2DE requieren de un tratamiento previo cuya función es liberarlas de todos los componentes no proteicos presentes que puedan interferir en los siguientes pasos del análisis ¹¹.
- 2. Separación proteica.** Las muestras provenientes de células, tejidos u otro

tipo de muestras biológicas se separan principalmente por técnicas cromatográficas y/o electroforéticas, las cuales son tecnologías robustas, versátiles y con alta capacidad de resolución. La tecnología más utilizada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida ¹².

3. **Procesamiento de la muestra.** Las proteínas son desnaturalizadas a consecuencia de factores externos como la acidez del medio, temperatura etc., exponiendo los sitios específicos de corte enzimático y evitando la formación de dímeros en las proteínas ¹¹.
4. **Análisis por espectrometría de masas.** Este procedimiento involucra la ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa y la separación de las especies iónicas resultantes de acuerdo a la relación de su masa con su carga eléctrica (m/z) ¹².
5. **Identificación de proteínas.** Los valores de masas se comparan con bases de datos virtuales del proteoma teórico del organismo analizado. La identificación se realiza mediante el alineamiento de las secuencias determinadas experimentalmente contra bases de datos de secuencias conocidas, con el objetivo de encontrar secuencias similares ¹³.

1.4.1 EXTRACCIÓN PROTEICA

1.4.1.1 ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD DE CÉLULAS

Todas las células tienen una membrana plasmática, una bicapa de proteína y lípidos que forma una barrera que separa el contenido celular del ambiente extracelular. Las proteínas de membrana están incrustadas en la bicapa lipídica, mantenidas en su lugar por uno o más dominios que abarcan el núcleo hidrofóbico. Además, las proteínas periféricas se unen a la superficie interna o externa de la bicapa a través de interacciones con proteínas de membrana

integrales o con grupos de cabeza de lípidos polares. La naturaleza del contenido de lípidos y proteínas varía según el tipo de célula y la especie de organismo ¹⁴.

En las células animales, la membrana plasmática es la única barrera que separa el contenido celular del ambiente, pero en las plantas y las bacterias, la membrana plasmática también está rodeada por una pared celular rígida. Las paredes de las células vegetales consisten en múltiples capas de celulosa. Estos tipos de barreras extracelulares confieren forma y rigidez a las células. Las paredes celulares de las plantas son particularmente fuertes, lo que las hace muy difíciles de romper mecánicamente o químicamente ¹⁵.

Sin embargo, no hay un protocolo universal para la preparación de muestras de proteínas. Los protocolos de preparación de muestras deben tener en cuenta varios factores, como la fuente o el tipo de muestra, la heterogeneidad química y estructural de las proteínas, la ubicación celular o subcelular de la proteína de interés e incluso el rendimiento de proteína requerida. Por ejemplo, los fluidos corporales como la orina o el plasma ya son soluciones de proteínas más o menos homogéneas y sólo se requiere una manipulación menor para obtener proteínas a partir de estas muestras. Las muestras de tejido, sin embargo, requieren una amplia manipulación para romper la estructura de los tejidos y solubilizar las proteínas ¹⁶.

1.4.1.2 LISIS CELULAR Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los métodos más utilizados en la extracción de proteínas se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos ¹⁷.

Históricamente, la lisis física era el método de elección para la disrupción celular y la extracción de contenidos celulares; sin embargo, los métodos tradicionales de interrupción física no son propicios para el alto rendimiento y volúmenes más pequeños típicos de la investigación de laboratorio moderna ¹⁵.

En los últimos años, los métodos de lisis basados en detergentes se han convertido en la norma. Mediante pruebas empíricas por ensayo y error, se han desarrollado diferentes soluciones basadas en detergentes compuestas de tipos particulares y concentraciones de detergentes, amortiguadores, sales y agentes reductores para proporcionar los mejores resultados posibles para especies y tipos de células particulares ¹⁷.

1.4.1.3 FRACCIONAMIENTO DE CÉLULAS Y AISLAMIENTO DE ORGÁNULOS

Mediante la optimización cuidadosa de las técnicas de disrupción física, soluciones de amortiguadores detergentes y métodos de gradiente de densidad, se han desarrollado procedimientos para permitir la separación de estructuras subcelulares. Por ejemplo, con los detergentes apropiados, las proteínas de membrana hidrófobas pueden solubilizarse y separarse de las proteínas hidrófilas.

Actualmente, se ha desarrollado una amplia gama de técnicas de disrupción celular, que se usan a escala de laboratorio y pueden clasificarse como ¹⁵:

- a) Métodos físicos mecánicos: agitación con abrasivos, homogeneización a alta presión o extrusión por presión.
- b) Métodos físicos no mecánicos: shock osmótico, ciclos de congelación descongelación, sonicación o secado.
- c) Métodos químicos: tratamiento con álcali, solventes, detergentes, ácidos o sustancias caotrópicas.

Estos métodos pueden combinarse para obtener un mejor resultado de la disrupción.

1.4.1.4 INHIBICIÓN DE LAS PROTEASAS Y ESTABILIZACIÓN PROTEICA

La lisis celular perturba el ambiente celular cuidadosamente controlado, permitiendo que las proteasas endógenas y las fosfatasas se desregulen. Como resultado, las proteínas extraídas se degradan o modifican artefactualmente por las actividad de estas moléculas. Para prevenir estos efectos y obtener el mejor rendimiento de proteína posible en la lisis celular, se deben añadir inhibidores de proteasa y fosfatasa a los reactivos de lisis. Numerosos compuestos han sido identificados y utilizados para inactivar o bloquear a estas enzimas uniéndose de manera reversible o irreversible a ellas ¹⁷.

1.4.2 SEPARACIÓN PROTEICA POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La 2DE fue introducida en 1975 simultáneamente por J. Klose en Berlin y O' Farrell, en los Estados Unidos. Estos geles permiten obtener un arreglo o despliegue físico en dos dimensiones de mezclas complejas de proteínas ¹⁸. Se basan en la combinación de dos técnicas ortogonales (es decir, que no comparten principios físicos comunes) de forma consecutiva para aumentar la resolución de la separación de las proteínas de un tejido:

- ❖ **Separación por carga eléctrica (Isoelectroenfoco (IEF)).** El método original propuesto de modo independiente por O' Farrell y por Klose en 1975 se basa en la separación de las proteínas por su carga utilizando un gel cilíndrico de poliacrilamida al cual se le incorporan mezclas de anfólitos solubles (compuestos de baja masa molecular que poseen carga eléctrica). Mediante este método, las proteínas migran en un gradiente de pH hasta

alcanzar el sitio donde carecen de carga, es decir, su punto isoeléctrico ^{19, 20}.

- ❖ **Separación por tamaño molecular.** Este proceso se efectúa en un gel de poliacrilamida en presencia de un detergente aniónico muy potente, el docecil sulfato de sodio (SDS).

1.4.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de las masas moleculares de péptidos y proteínas, así como los espectros de fragmentación que proporcionan información de secuencia ²¹.

La espectrometría MALDI-TOF utiliza una técnica de generación de iones por desabsorción/ionización mediante láser inducida por matriz. Esta estrategia es utilizada para identificar una proteína dada determinada, mediante paquetes computacionales específicos (p.ej. ProFound, Mascot). En una base de datos de proteínas, las masas provenientes de los digeridos proteicos (huellas peptídicas) obtenidas por espectrometría de masas, se comparan con las que provienen de digerir teóricamente las distintas proteínas presentes en las bases de datos. Si el genoma del organismo o especie está secuenciado y su información es accesible a las bases de datos públicas, esta búsqueda-rastreo dará un resultado que será una proteína candidata con un grado de confiabilidad determinado ²².

1.5 PROTEÓMICA CLÍNICA

La genómica ha aumentado sustancialmente el conocimiento que se poseía sobre muchas enfermedades, abriendo nuevas rutas terapéuticas, diagnósticas, fisiopatológicas, etc. La proteómica correlaciona las proteínas con sus genes siendo un área de investigación que conjuga factores genéticos y ambientales.

La proteómica clínica representa el uso de técnicas proteómicas al campo de la medicina y su aplicación ha permitido el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades. La posibilidad de analizar de una forma exhaustiva y simultánea, cambios en un gran número de proteínas en el contexto de una enfermedad o de distintas condiciones fisiológicas sitúa a la proteómica como una prometedora herramienta para abrir soluciones a cuestiones difíciles de investigación clínica ²³.

1.6 INMUNOPROTEÓMICA

La inmunoproteómica es una herramienta útil para el develamiento de grandes paneles de biomarcadores clínicos potenciales, así como de candidatos terapéuticos para el diseño de futuras vacunas o inmunoterapia de enfermedades infecciosas, alergias, trastornos autoinmunitarios y/o neoplasias ²⁴. Se trata de examinar global y simultáneamente, los perfiles de reactividad de los anticuerpos (Ac) séricos dirigidos frente a un amplio espectro de antígenos (Ag), muchos de los cuales tienen un notable significado clínico y/o terapéutico. Entre las diferentes y variadas estrategias inmunoproteómicas, descritas para identificar Ag reconocidos por Ac circulantes en pacientes con este tipo de afecciones, el análisis del proteoma serológico es la técnica más común para explorar el inmunoma de organismos y descubrir posibles biomarcadores clínicos y/o candidatos terapéuticos ²⁵.

1.7 HIPERSENSIBILIDAD ALIMENTARIA

La prevalencia de las enfermedades alérgicas va en aumento en todo el mundo tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad son las respuestas inmunes

específicas, con expresión clínica, ya que producen un cuadro sintomático que determinados individuos elaboran frente a sustancias no infecciosas e inofensivas para el organismo en la mayoría de la población ²⁶. Sustancias como el polen, los ácaros, el polvo, diversos alimentos y medicamentos son denominados alérgenos, los cuales son conocidos por causar reacciones alérgicas o de hipersensibilidad tales como asma, rinitis, dermatitis hasta anafilaxia ²⁷.

La alergia o hipersensibilidad alimentaria es una reacción inmunológica producida por la ingestión de un alimento o de un aditivo alimentario. Esta reacción se produce después de la ingesta de cantidades muy pequeñas del alimento en cuestión, tratándose de una reacción inmunológica que puede ser de tipo inmediato o retardado, que involucra un mecanismo inmunológico humoral, celular o mixto, y que requiere en cualquier caso que haya existido una primera exposición al alérgeno o antígeno capaz de producir una sensibilización del individuo, que muchas veces puede haber sido asintomática ²⁸. La alergia a alimentos es más frecuente en personas con antecedentes familiares de alergia (atópicos), aunque puedan ser otros tipos de alergias (eccemas, asma, rinitis) ²⁹.

La diversidad de la dieta humana es enorme; sin embargo, son relativamente pocos los alimentos que causan la mayoría de las alergias alimentarias en todo el mundo. Las alergias a alimentos más frecuentes en niños son al huevo, la leche y el pescado. En los adultos destacan las alergias a frutas frescas y frutos secos, seguidos por marisco y pescado. Más frecuente que la alergia a alimentos es la intolerancia alimentaria, que expresa simplemente que un alimento genere malestar a una persona, sin fundamentos alérgicos ²⁹.

Las alergias alimentarias se pueden agrupar en cuatro tipos distintos según Coombs y Gell (1963), dependiendo de los componentes del sistema inmune que

inician la respuesta (IgE, IgG o célula T) y de la naturaleza del antígeno ²⁶. La hipersensibilidad tipo I, son reacciones en las que los antígenos (Ag) se combinan con Inmunoglobulinas IgE específicos, fijados a receptores de la membrana de mastocitos; la tipo II, son reacciones mediadas IgG e IgM preformada con Ag presentes en la superficie celular; la tipo III: son reacciones producidas por la existencia de inmunocomplejos (IC) que al depositarse en los tejidos provocan activación de fagocitos y daño tisular; y finalmente, la tipo IV: son reacciones mediadas por células, capaces de producir una lesión inmunológica por efecto tóxico ³⁰.

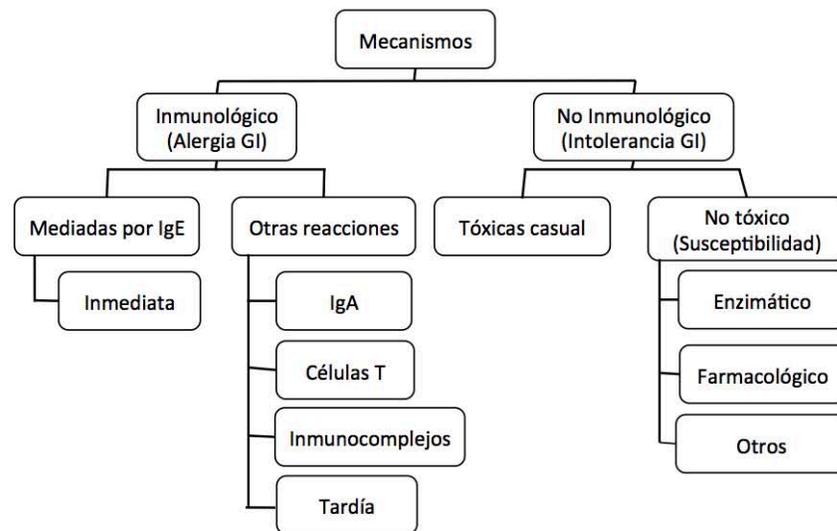
1.8 CLASIFICACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS A ALIMENTOS

Las reacciones adversas a alimentos se definen como cualquier respuesta clínicamente anormal que se pueda atribuir a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento o de sus derivados o de un aditivo contenido en el mismo ³¹. En la propuesta por el Subcomité de Reacciones Adversas a Alimentos de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica en 1995 y revisada en 2001, que se basa en los mecanismos patológicos, se distinguen los siguientes tipos de reacciones adversas a alimentos esquematizados en la figura 2 ^{31,32}.

- ❖ **Alergia a Alimentos o Hipersensibilidad Alérgica a Alimentos.** Incluye aquellos cuadros clínicos con mecanismo inmunológico comprobado, tanto las reacciones mediadas por IgE, como las producidas por otro mecanismo inmunológico, conocidas como reacciones no mediadas por IgE.
- **Alergia alimentaria mediada por IgE.** Se encuentran anticuerpos específicos de la clase IgE. La reacción tiende a ser inmediata y suele existir una relación directa entre la exposición al alérgeno y la aparición de

síntomas. En este tipo de alergia mediada por IgE, los síntomas clínicos suelen ser tanto más graves cuanto más corto es el intervalo entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas.

- **Alergia alimentaria no mediada por IgE.** No se comprueba la existencia de IgE frente al antígeno. La reacción es retardada y puede ocurrir varias horas o incluso días tras la ingesta, por lo que a menudo es mucho más difícil de diagnosticar, ya que no se puede establecer un fácil nexo de unión entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas. Este tipo de hipersensibilidad alimentaria no mediada IgE puede manifestarse en forma de cuadros clínicos cutáneos o gastrointestinales diversos, pero nunca en forma de anafilaxia.
- **Formas mixtas.** Mediadas por anticuerpos IgE e inmunidad celular en las que juega un papel fundamental la actividad eosinofílica.



GI: Gastrointestinal

Figura 2. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos. El Subcomité de Reacciones Adversas a Alimentos de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica clasificó a las reacciones adversas a los alimentos en tóxicas (no inmunológicas) y no tóxicas (inmunológicas) ³³.

- ❖ **Hipersensibilidad no alérgica a los alimentos.** Se da en aquellos casos en los que hay relación causal entre alimento y clínica pero no se puede demostrar ningún mecanismo inmunológico. Pueden deberse a defectos enzimáticos, efectos farmacológicos de sustancias añadidas a los alimentos o presentes en ellos (cafeína, histamina, tiramina) o a reacciones no definidas.
- ❖ **Intoxicación.** Reacción adversa a alimentos que ocurre cuando se ingieren sustancias tóxicas que se incorporan al alimento durante su procesamiento o por contaminación (toxinas y bacterias de los alimentos).

1.9 ALIMENTOS CAUSANTES DE REACCIONES ALÉRGICAS

Los alérgenos que originan los cuadros de alergia alimentaria son proteínas o glicoproteínas con masas moleculares que van desde los 8 a los 80 kDa ³⁴. Estas moléculas proteicas tienen una determinada secuencia y estructura, de forma que no es toda la proteína sino sólo determinadas partes de la misma (epítomos o determinantes antigénicos) los que tienen la propiedad de desencadenar reacciones inmunológicamente mediadas ³⁵.

Hasta el momento tan sólo se han identificado los alérgenos mayoritarios de pocos alimentos, los más frecuentemente implicados en la alergia alimentaria, tales como la leche de vaca, el huevo o el pescado, que representan más del 70% de las sensibilizaciones alimentarias en niños o los frutos secos, legumbres y frutas más frecuentemente implicados en las alergias alimentarias en adultos. Existe la posibilidad de reactividad cruzada entre familias de alimentos, por lo que hay que prevenir esto. Por ejemplo, los alérgicos a proteínas de leche de vaca probablemente también lo sean a proteínas de la leche de cabra u oveja ³⁶.

Otro grupo de alimentos capaces de desarrollar una respuesta alérgica son las frutas frescas ³⁷, las cuales se les ha involucrado en reacciones locales en labios y boca (alergia oral), además de que cruzan entre familias, pueden generar reacciones con otras sustancias como polen de pastos y otras plantas; las frutas principalmente involucradas son: manzana, plátano, fresa, mango, kiwi, melón, pera, ciruela, higo, uva, coco, aguacate y durazno ³⁸.

ANTECEDENTES

1.10 ALERGIA A FRUTAS

El estudio de la alergia a frutas ha experimentado un notable cambio en poco más de una década. De ser un área poco conocida ha pasado a ser un tema de candente actualidad en la investigación clínica y básica en alergología. Con el reconocimiento de la sintomatología orofaríngea como principal manifestación clínica, pero también de la potencial gravedad de algunas reacciones, de su característica asociación con alergia a inhalantes (pólenes y látex) y con la mejora de las pruebas cutáneas al utilizar frutas en fresco, se ha despertado un creciente interés entre los alergólogos clínicos ³⁹.

La prevalencia de alergia a determinadas frutas varía de unas áreas geográficas a otras, en relación con las costumbres alimentarias y con la palinología de la zona, ya que entre el 20 y el 40% de los pacientes polínicos presentan una alergia a alimentos vegetales asociada, debido a la existencia de alérgenos comunes ⁴⁰. Sin embargo, la alergia a las frutas de la familia Rosaceae es la alergia a frutas más frecuente, y es caracterizada como la hipersensibilidad alimentaria más común en adolescentes y adultos jóvenes. Según los datos del estudio epidemiológico *Alergológica* realizado en 2005 en España, las frutas

rosáceas inducen el 24% de las reacciones alérgicas a los alimentos ⁴¹.

1.11 EPIDEMIOLOGÍA DE REACCIONES ADVERSAS A FRUTAS

Las enfermedades alérgicas asociadas con alimentos se incrementan anualmente, presentando una prevalencia de 2 a 4% en adultos y de 6 a 8% en niños. El cuadro clínico varía de síntomas leves hasta la anafilaxia ³⁰. La prevalencia global de alergia a las frutas mediada por IgE es difícil de determinar debido a las diferencias geográficas como se muestra en la tabla 1 ⁴². Por este motivo, el estudio epidemiológico *Alergológica 2005*, realizado en España, demostró que el 7.4% de los pacientes que acuden al alergólogo presentan alergias a los alimentos, con una implicación de las frutas en el 33%. En este estudio también se evidenció que la alergia a las frutas es la causa más frecuente de alergia a los alimentos en niños mayores de 5 años y en adultos ⁴³.

Tabla 1. Prevalencia de alergias (%) por frutas y hortalizas en tres regiones diferentes de Europa ⁴².

| | Suecia | Italia | España |
|-------------|--------|--------|--------|
| Manzana | 47 | 53 | 18 |
| Melocotón | 34 | 40 | 25 |
| Pera | 26 | 22 | 13 |
| Cereza | 29 | 20 | 8 |
| Albaricoque | 8 | 23 | 8 |
| Melón | 3 | 16 | 18 |
| Naranja | 12 | 16 | |
| Plátano | | 10-15 | 18 |
| Ciruela | 21 | 5-10 | 10 |
| Sandía | | 5-10 | |
| Uva | 5 | 5-10 | |
| Kiwi | 3 | <5 | |
| Higo | | <5 | 13 |
| Fresa | 3 | <5 | |
| Mora | | <5 | |
| Limón | | <5 | 3 |
| Piña | | | 5 |
| Granada | | | |
| - | | | |
| Zanahoria | 23 | 10 -15 | |
| Papa | 20 | 10 -15 | |
| Jitomate | | 21 | 13 |
| Apio | | 5 -10 | 3 |
| Lechuga | | <5 | 20 |
| Hinojo | | 18 | |
| Pimiento | | | 1 |
| Alcachofa | | | 1 |

En México existe escasa información de la prevalencia del síndrome de alergia oral y las características de estos pacientes. Sin embargo, un grupo de investigadores del IMSS en 2014, dirigido por Rodríguez-Mireles, realizó pruebas *Prick* a 44 pacientes de entre 16 y 63 años con alimentos en fresco. En dicha prueba se demostró que las familias de alimentos vegetales causantes del SAO más frecuentes fueron las rosáceas con una prevalencia del 60% y las musáceas presentando un 23%. Además, las frutas implicadas con más frecuencia en el SAO fueron: manzana (37%), durazno (27%), plátano (23%) y kiwi (18%)⁴⁴.

1.12 ALERGIA A PROTEÍNAS FRUTALES

Los alérgenos de frutas son proteínas que cumplen funciones biológicas primordiales y están presentes en la mayoría de los tejidos vegetales (hojas, flores, polen, fruto, savia). Estas proteínas están muy extendidas dentro del reino vegetal y son altamente conservadas a lo largo del proceso evolutivo, lo cual las convierte en panalérgenos, que simplemente son alérgenos responsables de reactividad cruzada entre especies. La sensibilización a estos panalérgenos explica la importante reactividad cruzada entre frutas y las asociaciones con alergia a pólenes y látex⁴⁵. La gran mayoría de los alérgenos de frutas son proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa vegetal. Estas proteínas se acumulan en respuesta a infecciones por patógenos (hongos, bacterias, virus), heridas, después de la aplicación de productos químicos o en situaciones de estrés. Es importante tener en cuenta los cambios de expresión de estos alérgenos en estas circunstancias, ya que los procesos de cultivo, cosecha, almacenamiento o manipulación de frutas y hortalizas pueden aumentar su contenido y, en definitiva, la alergenicidad de estos alimentos⁴⁶.

Las frutas implicadas en procesos alérgicos son muchas. Según los datos del estudio epidemiológico, *Alergológica* 2005, en España las frutas rosáceas inducen el 70% de todas las reacciones alérgicas a frutas ⁴¹. La alergia a frutas es más frecuente a partir de la adolescencia y son los alimentos que producen las reacciones alérgicas en la población adulta. El durazno, la manzana, la pera, la cereza, la ciruela, la nectarina, la fresa, la zarzamora, la almendra, entre otras, son frutas que pertenecen a la familia de la Rosáceas. Otras frutas implicadas frecuentemente en fenómenos de alergias son el kiwi, mango, la piña, el melón, la sandía, el aguacate, la uva, y el plátano ⁴³.

Existen proteínas que se asocian al citoesqueleto de un gran número de plantas y que participan en la forma y el movimiento de las células del mundo vegetal. Éstas proteínas se llaman profilinas y se consideran verdaderos panalérgenos responsables de la reactividad cruzada entre frutas, verduras y pólenes. Son poco resistentes a la digestión gástrica y al aumento de temperatura. Esto explica que los alérgicos a profilinas no suelen presentar reacciones sistémicas, sino sólo localizadas en el área de la orofaringe.

Otras proteínas capaces de provocar reacciones son el grupo de proteínas de defensa vegetal localizada sobre todo en la superficie de la piel, para cumplir con lo que su nombre indica: la defensa del vegetal ⁴⁷. De este grupo destacan las siguientes proteínas:

- ❖ **Los alérgenos pertenecientes al grupo 10, conocidos como homólogos de Bet v 1.** Al igual que las profilinas, Son proteínas no resistentes al calor ni a las enzimas digestivas. La sensibilización a estos alérgenos se produce de forma inicial por vía respiratoria al polen implicado, y secundariamente aparecen los síntomas orales con el vegetal.

- ❖ **El grupo 14 o proteínas de transferencia de lípidos.** Se caracterizan por su alta resistencia a las enzimas digestivas y al aumento de la temperatura. Estas propiedades le dan la capacidad de sensibilizar directamente por vía digestiva y explican que los síntomas pueden afectar a varios sistemas. Una de las primeras frutas en las que se describieron fue en el durazno.
- ❖ **Los grupos 3 y 4 quitinasas, son alérgenos asociados al síndrome látex-frutas.** Se caracterizan por la asociación de alergia a algunas frutas en pacientes alérgicos al látex. Entre las frutas implicadas destacan el plátano, el aguacate, la castaña y el kiwi. Aproximadamente el 50% de los pacientes alérgicos al látex presentan alergia a frutas como plátano, kiwi, aguacate y castaña, que es lo que se ha denominado síndrome látex-frutas ⁴². Las hortalizas inducen reacciones alérgicas con menor frecuencia que las frutas frescas.

1.13 REACTIVIDAD CRUZADA

Dentro del sistema inmunológico, una de las características principales de los Ac es su gran especificidad con la que reconocen los Ag. Sin embargo, se sabe que una determinada IgE puede reconocer Ag diferentes. La explicación de este hecho está en que el Ac reconoce tan solo una cadena corta de aminoácidos del Ag conocido como epítipo, por lo que basta que dos proteínas se asemejen en unos cuantos aminoácidos para que pueda existir reactividad cruzada (RC) entre ellas. Por lo tanto se entiende por RC al reconocimiento de Ag diferentes por una misma IgE ⁴⁸.

Sin embargo, parece razonable que exista RC entre antígenos de especies filogenéticamente cercanas. La experiencia en alergia a alimentos indica que con

frecuencia el paciente que sufre reacciones con un alimento concreto de una familia determinada, suele tener problemas con otros miembros de la misma familia. Hoy en día se conocen varios de los alérgenos principales responsables de esta RC, que se traduce clínicamente en sensibilización o alergia asociada a una familia de alimentos concreta ⁴⁹.

Una de las formas más frecuentes de alergia a alimentos en pacientes adultos es el síndrome de alergia oral (SAO) por alimentos vegetales ⁵⁰. Los alimentos implicados con más frecuencia pertenecen a las familias de Rosáceas y Umbelíferas, mientras que los pólenes habitualmente implicados son los de abedul y de artemisa. En la mayoría de los casos, los síntomas respiratorios por pólenes preceden a la aparición de las reacciones adversas a alimentos, lo que sugiere que la sensibilización primaria es por vía respiratoria ⁵¹.

Se han descrito numerosas asociaciones de sensibilizaciones a pólenes y alimentos que han sido denominados síndromes de reactividad cruzada, ejemplo de esto se muestra en la tabla 2 ³⁸. Estas asociaciones de pólenes y alimentos varían de unos países a otros, ya que dependen de las costumbres alimentarias de la población estudiada y de la flora local que produce la alergia al polen, por lo que no se deben extrapolar automáticamente los datos de una población a otra ⁵².

Tabla 2. Reactividad cruzada y riesgo de reacciones alérgicas entre alimentos ³⁸.

| Alergia a: | Riesgo de reactividad cruzada | % de riesgo |
|----------------------------------|---|-------------|
| Cacahuete | Otras leguminosas | 5 |
| Pescado (salmón) | Otros peces | 50 |
| Marisco (camarón) | Otros mariscos | 75 |
| Granos (trigo) | Otros granos | 20 |
| Leche de vaca | Leche de cabra | 92 |
| Polen (ambrosia y abedul) | Frutas (manzana, pera), verduras | 55 |
| Durazno | Otras <i>Rosaceae</i> (manzana, cereza, uva, ciruela) | 55 |
| Melón | Otras frutas (sandía, plátano, aguacate) | 92 |
| Látex | Frutas (kiwi, plátano, aguacate) | 35 |
| Frutas (kiwi, plátano, aguacate) | Látex | 11 |

1.14 FISIOPATOGENIA DE LA ALERGIA A FRUTAS

Ciertas clases de antígenos conocidos como alérgenos inducen una reacción de hipersensibilidad tipo I y este fenómeno manifiesta todas las características de una reacción humoral normal. Esto es, el alérgeno promueve una reacción humoral de anticuerpo para otros antígenos solubles, lo que resulta en la generación de células plasmáticas y células de memoria secretoras de anticuerpo ⁵³.

La reacción de hipersensibilidad tipo I, corresponde a las reacciones de hipersensibilidad inmediata que se producen dentro de los primeros 15 minutos desde la interacción del antígeno con el anticuerpo en personas previamente sensibilizadas a ese antígeno ³⁰.

Lo que distingue una reacción de hipersensibilidad tipo I de una reacción humoral normal es que las células plasmáticas secretan IgE en respuesta a la activación de células TH2 específicas de alérgeno. El anticuerpo de esta clase se fija con gran afinidad a los receptores Fc sobre la superficie de los mastocitos tisulares y los basófilos sanguíneos; se dice que los mastocitos y basófilos cubiertos por IgE están sensibilizados. La exposición posterior al mismo alérgeno enlaza de manera cruzada la IgE de membrana de los mastocitos y los basófilos,

lo que produce desgranulación de estas células como se esquematiza en la figura 3. Los mediadores con actividad farmacológica que se liberan de los gránulos actúan sobre los tejidos circundantes. Los efectos principales como la vasodilatación y la contracción del músculo liso pueden ser generales o localizados según la magnitud de la liberación de mediadores ⁵³.

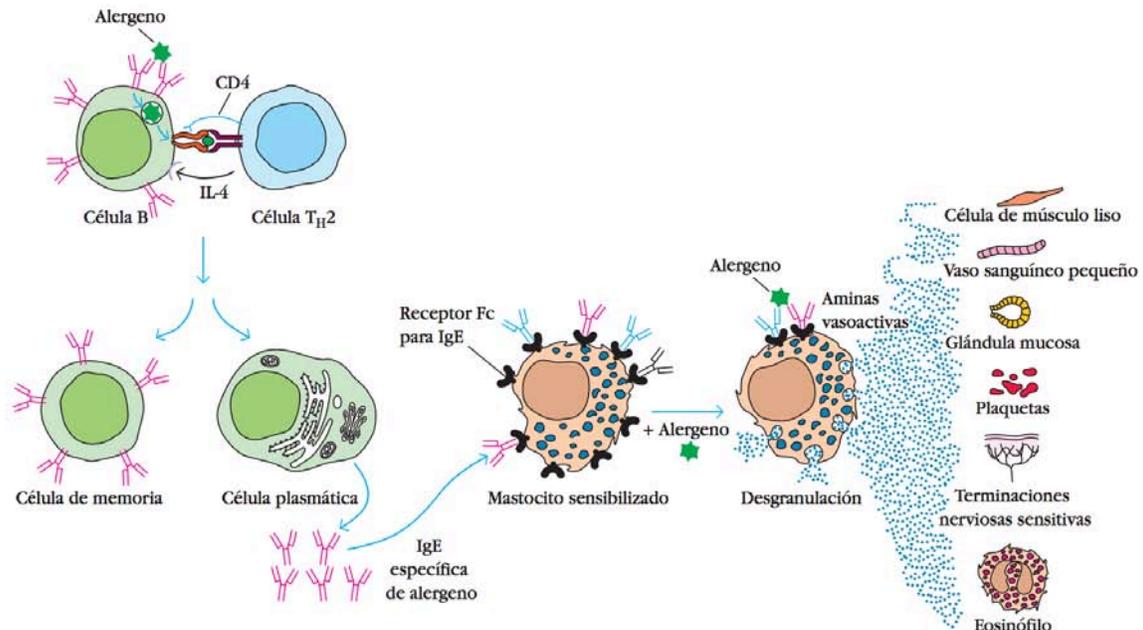


Figura 3. Mecanismo general a una reacción de hipersensibilidad tipo 1. La exposición a un alérgeno activa las células T_H2 que estimulan a las células B para que formen células plasmáticas secretoras de IgE. Las moléculas de IgE secretadas se fijan a receptores Fc específicos de IgE sobre los mastocitos y basófilos sanguíneos. La segunda exposición al alérgeno produce enlace cruzado de la IgE fija, lo que desencadena la liberación de mediadores con actividad farmacológica de mastocitos y basófilos. Los mediadores producen contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación ⁵³.

1.15 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas de alergia inducidos por las frutas son de tipo inmediato y aparecen dentro de la primera hora tras la ingestión del alimento. Son producidos por el consumo de los alimentos frescos y son frecuentemente tolerados al ser

cocinados. En ocasiones, las manifestaciones aparecen con la manipulación en fresco del alimento y se manifiesta como urticaria de contacto, dermatitis, rinitis, conjuntivitis o asma ⁵⁴.

La forma de presentación más característica de la alergia a frutas es la afectación oral u orofaríngea, que se manifiesta con prurito oral u orofaríngeo, eritema labial y perioral, y angioedema labial. Estos síntomas se inician entre los 5 y 15 minutos de la ingestión del alimento, suelen ser de leve intensidad y desaparecen rápidamente, aunque pueden seguirse de síntomas digestivos, rinoconjuntivitis, asma, urticaria-angioedema, a incluso las afectaciones sistémicas más severas de anafilaxia y shock anafiláctico. Este tipo de presentación clínica debuta con síntomas orofaríngeos que pueden ir seguidos de afectación a otro nivel como el síndrome de alergia oral ⁵⁵.

En la alergia a frutas rosáceas se han observado diferencias geográficas en la presentación clínica relacionadas con el diferente patrón de alérgenos implicados. La alergia a rosáceas en el norte y centro de Europa en pacientes alérgicos al polen de abedul es leve y la sintomatología orofaríngea es la más frecuente e incluso, a menudo, es la única manifestación ⁵⁵. La sensibilización a alérgenos lábiles como los homólogos a Bet v 1 y profilinas explicaría este patrón clínico de respuesta. Estos alérgenos son capaces de inducir reacciones locales al unirse a mastocitos ⁵⁶.

Sin embargo, la alergia a rosáceas en el área mediterránea (España, Italia, Israel), en pacientes no sensibilizados al polen de abedul es más severa, con menos manifestaciones orales (59-86%) y frecuente afectación sistémica de tipo urticaria o anafilaxia (20- 45%). En estas poblaciones, las proteínas transportadoras de lípidos (PTL) son los mayores alérgenos de las rosáceas ⁵⁵.

1.16 DIAGNÓSTICO

Para llevar a cabo el diagnóstico de alergia a un alimento es necesario comprobar que éste sea la causa de los síntomas referidos por el paciente mediante una prueba de provocación. Además, es necesario demostrar que existe un mecanismo inmunológico subyacente mediado por IgE, generalmente mediante la realización de pruebas cutáneas (PC) o determinación de IgE específica sérica ³¹.

El diagnóstico de la alergia cutánea se establece mediante una historia clínica dirigida a relacionar la causa desencadenante con la reacción, el examen físico general y particular de las lesiones en la piel, y las pruebas cutáneas “in vivo” que detecten la sensibilización al alérgeno responsable de la reacción ⁵⁷.

La prueba *Prick* es un método rápido, de elevada especificidad y sensibilidad, que resulta muy útil para confirmar una sospecha diagnóstica de alergia. Este método se basa en la provocación de una reacción de hipersensibilidad tipo I, al introducir una lanceta desechable de 1 mm sobre la superficie de los antebrazos: primeramente se hace la punción en el alimento en cuestión y posteriormente se punciona la piel del paciente, realizando la lectura pasados 15 minutos. Se consideran positivos los alérgenos que induzcan la formación de una pápula mayor de 3 mm que el control negativo (solución de Evans); incluyendo, además, un control positivo (histamina) ⁵⁸.

Debido a las limitaciones de la capacidad diagnóstica de estas pruebas, el diagnóstico definitivo solamente se realiza con pruebas de provocación; siendo el “estándar de oro” la provocación oral doble ciego controlada por placebo (PODCCP). Sin embargo, la aplicación de esta metodología se considera riesgosa en el síndrome de alergia oral por frutas y hortalizas al necesitarse el contacto directo del alimento fresco con la mucosa orofaríngea. Sería, por tanto, deseable

disponer de una técnica diagnóstica fácil de realizar, exenta de riesgos y eficaz ⁵⁹.

1.17 TRATAMIENTO

Hasta el momento, el tratamiento más fácil y seguro es evitar el (los) alimento(s) que ocasionan el síndrome de alergia oral y aquéllos con los que hay reactividad cruzada ⁶⁰. El pronóstico general de los pacientes con síndrome de alergia oral es bueno, con muy pocas reacciones severas. Aproximadamente una tercera parte de los pacientes con alergias alimentarias pierden su sensibilización después de evitar estrictamente los alimentos durante dos años ⁶¹.

Se sabe que la restricción de todos los alimentos para los que se detectan pruebas positivas conduce a la eliminación por exceso de alimentos que se toleran, pero el permitir la ingestión de aquéllos a los que el paciente está sensibilizado y cuya tolerancia tras una reacción con un alimento relacionado es desconocida puede suponer un riesgo de reacciones para el paciente. Por lo tanto, es imprescindible realizar provocaciones orales con los alimentos relacionados para poder prescribir una dieta de restricción correcta ⁶².

II. JUSTIFICACIÓN.

La alergia a frutas es una reacción adversa del organismo a la ingestión o contacto con proteínas que el sistema inmunitario ha considerado un peligro del cual debe defenderse. El hecho de que ocurra una reacción alérgica más o menos intensa no depende siempre de la cantidad del alimento ingerido, pero sí del contenido proteico o de la presencia de carbohidratos u otras moléculas, provengan todas ellas de una fuente natural o no.

Datos del estudio epidemiológico, *Alergológica 2005*, en España mostraron que las frutas rosáceas inducen el 70% de todas las reacciones alérgicas a frutas, por lo que es importante mencionar que en la mayoría de los pacientes pediátricos, las rosáceas son las primeras frutas que inducen reacciones alérgicas y resulta poco común observar alergia a frutas pertenecientes de otras familias sin que exista alergia a las rosáceas.

Actualmente, las alergias alimentarias son consideradas un problema global de salud que ha ido en aumento en las últimas décadas; entre estas, la alergia a frutas constituyen a más del 30% de las reacciones alérgicas a los alimentos. Por otra parte, el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad así como la identificación alérgenos específicos suele ser muy complicada, por lo que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico preciso que permitan la identificación certera de alérgenos específicos en nuestra población. Por lo tanto, se pretende obtener un perfil proteómico de extractos de pulpa de frutas tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*), mediante la optimización de métodos de extracción de proteínas por solventes orgánicos, los cuales serán utilizados posteriormente para el análisis inmunoproteómico de pacientes pediátricos mexicanos que presentan esta patología.

III. HIPÓTESIS.

La optimización del método de extracción proteica mediante solventes orgánicos, permitirá la obtención de proteínas libres de interferencias como lípidos, fibras y azúcares presentes en plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*).

IV. OBJETIVOS.

General:

- ❖ Obtener un perfil proteómico de extractos de pulpa de frutas, tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*), mediante métodos de extracción y separación proteica.

Particulares:

- ❖ Optimizar métodos de extracción de proteínas a partir de pulpas frutales, tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*).
- ❖ Eliminar compuestos interferentes de las muestras proteicas provenientes de los extractos frutales de plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*) mediante métodos de precipitación proteica.
- ❖ Obtener la electroforesis bidimensional a partir de pulpas frutales, tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*).

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo esquematizado en la figura 4, describe brevemente los pasos a seguir para cumplir con el objetivo planteado, correspondiente a la optimización del método de extracción proteica, así como la obtención de perfiles proteicos bidimensionales de extractos de pulpa de plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*).

Después del procesamiento del material orgánico, se procederá a la extracción proteica del plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*) mediante el método por fenol saturado; posteriormente se procederá a cuantificar dichas proteínas por el método colorimétrico de Lowry-TCA. Además, se analizará de manera simple el perfil proteico mediante SDS-PAGE.

Para la realización de geles de dos dimensiones, se requerirá de un IEF con el fin de separar proteínas por su punto isoeléctrico y proceder con la segunda dimensión mediante SDS-PAGE, seguido de una electrotransferencia con el fin de analizar y comparar el número de manchas proteicas presentes en las membranas después de haber sido transferidas del gel de poliacrilamida.

Finalmente, se digitalizarán los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF para su posterior análisis mediante el paquete computacional PDQuest de Bio-Rad, el cual será útil para detectar, cuantificar y comparar el número de manchas proteicas o “spots” presentes en los geles de doble dimensión, así como las manchas proteicas presentes en las membranas de PVDF para cada uno de las muestras frutales.

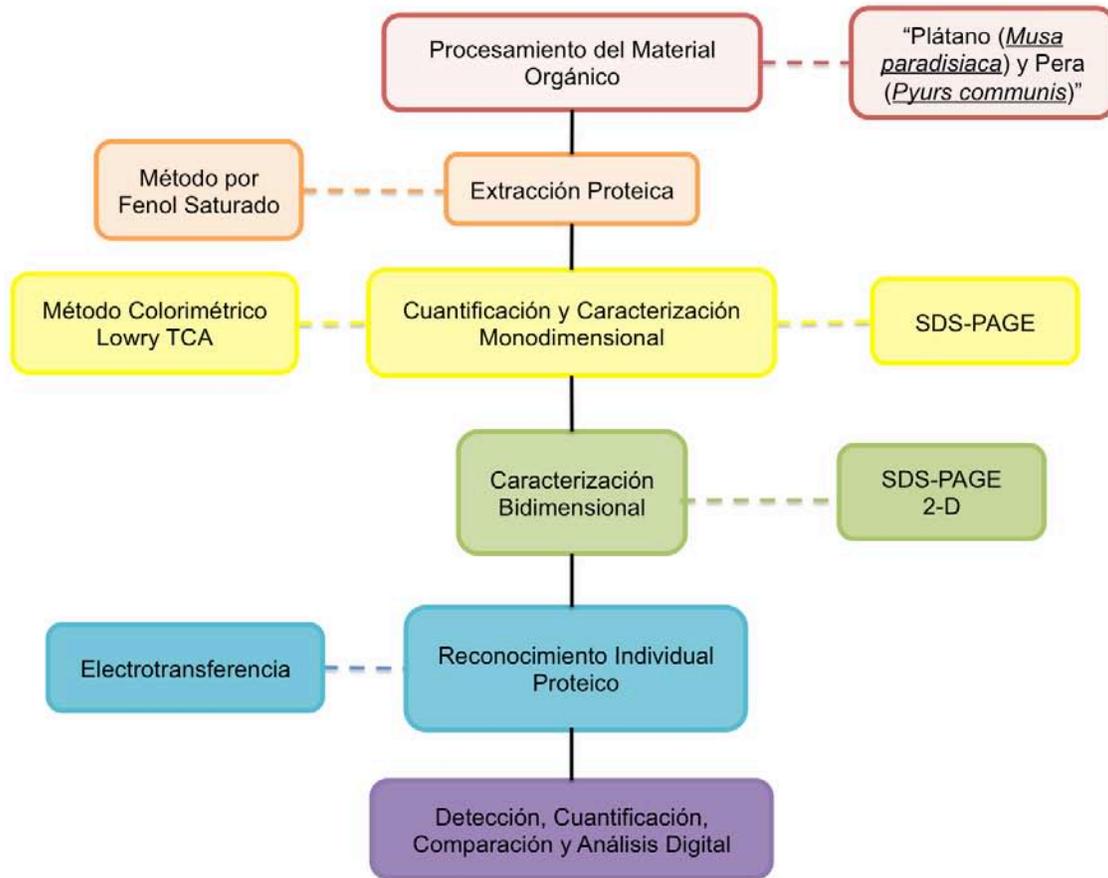


Figura 4. Plan de trabajo general para obtener el perfil proteómico de extractos proteicos de pulpa de frutas, tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*).

A) EXTRACCIÓN PROTEICA DE LA PULPA DE PLÁTANO Y PERA

1) PROCESAMIENTO DEL MATERIAL ORGÁNICO

Para la extracción proteica de la pulpa de plátano “Tabasco” (*Musa paradisiaca*) y pera “mantequilla” (*Pyrus communis*), ambas frutas fueron conseguidas en un mercado local de la Ciudad de México. Se obtuvo aproximadamente un kilogramo de cada fruta, los cuales fueron lavadas, peladas y cortadas en pequeños trozos, los trozos se colocaron en bolsas selladas; se pesaron y ultracongelaron a -70 °C.

2) EXTRACCIÓN PROTÉICA MEDIANTE EL MÉTODO POR FENOL

SATURADO ^{63, 64}.

Para cada extracción proteica, se procesaron 100 gramos del material fresco (sin cáscara ni semillas) previamente congelado. La fruta fue enfriada con nitrógeno líquido y pulverizada junto con 100 gramos de hielo seco, utilizando una licuadora clásica (600 watt motor) con vaso de acero inoxidable. El polvo obtenido de la pulpa de fruta fue vertido en un matraz Erlenmeyer (1000 mL) al cuál se adicionaron 250 mL de amortiguador de extracción (Sacarosa 30%; SDS 2%; Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0; mercapto etanol 5%; inhibidor de proteasas (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail)) correspondiente a 10 mL de amortiguador por cada 5 gr de muestra pulverizada incubando la muestra toda la noche a 4 °C en agitación suave.

Al término de la incubación, se agregó un volumen de Fenol saturado con Tris, incubando nuevamente toda la noche a 4 °C con agitación suave. Al día siguiente, se centrifugó durante dos intervalos en un rotor de columpio a 3,220 xg/ 25 min/ 4 °C. Posteriormente, se recuperó la fase fenólica (fase superior color anaranjada) y se agregaron 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1M en metanol, incubando nuevamente toda la noche a 4 °C en agitación.

Al finalizar la incubación, la muestra se centrifugó a 3,220 xg/ 45 min/ 4 °C. Posterior a la centrifugación, el sobrenadante se desechó y el botón se recuperó resuspendiéndolo y repartiéndolo en microtubos de 2 mL. Pasado esto, se realizaron cinco rondas de lavados: a) dos lavados con metanol frío (-20 °C); b) dos lavados con Acetona fría (-20 °C) al 80% sin romper la pastilla o botón y c) un lavado con Acetona fría (-20 °C) al 100% rompiendo el botón.

Una vez rotos los botones, los microtubos fueron centrifugados a 8,400 xg/ 15 min/ 4 °C. Pasada la centrifugación, se precipitó con una solución de desoxicolato de sodio al 0.1% + tricloroacético al 10% y se lavó cuatro veces con acetona al 100%. Finalmente, el solvente fue evaporado en un concentrador “LABCONCO Centrivap (78100-00)” y guardado a -70 °C hasta su uso.

3) SOLUBILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para poder solubilizar nuestras muestras proteicas, se descongeló el botón de cada una de las frutas a temperatura ambiente. Posteriormente, los botones de proteína de ambas frutas fueron solubilizados en amortiguador de lisis (Urea 8M, Tiourea 2M, SDS 1%), considerando el volumen necesario para disolver la totalidad del botón de proteína. Finalmente, se centrifugó cada una de las muestras a 18,600 xg/ 20 min/ 4 °C y se recuperó el sobrenadante que contenía a las proteínas de las frutas.

B) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN UNA DIMENSIÓN (1DE) ⁶⁵.

Preparación de geles de poliacrilamida.

Se procedió a la preparación del gel separador al 12% y el gel concentrador al 4% de poliacrilamida (Acrilamida/ Bis al 30%, amortiguador Tris pH 8.8, H₂O, PSA al 10% y TEMED), mediante el método descrito por Laemmli. Para la preparación de ambos geles, se utilizó el equipo para electroforesis Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra.

Preparación de las muestras.

Para proceder con la electroforesis de nuestro SDS-PAGE, cada muestra (plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*)) fue resuspendida en una modificación del amortiguador de lisis (Urea 8M, Tiourea 2M, SDS 1%).

Posteriormente, se tomó de cada extracto proteico 20, 50 y 100 μg y se mezcló con amortiguador de carga (Tris 125mM, SDS al 10%, Glicerol al 20%, y Azul de Bromofenol 0.1% y DTT 0.5 M). Una vez mezclada la proteína con el resto de los reactivos, se hirvieron las muestras a baño María durante un minuto.

Más tarde, se preparó la cámara electroforética colocando el SDS-PAGE y cargando los carriles como se muestra en la figura 5:

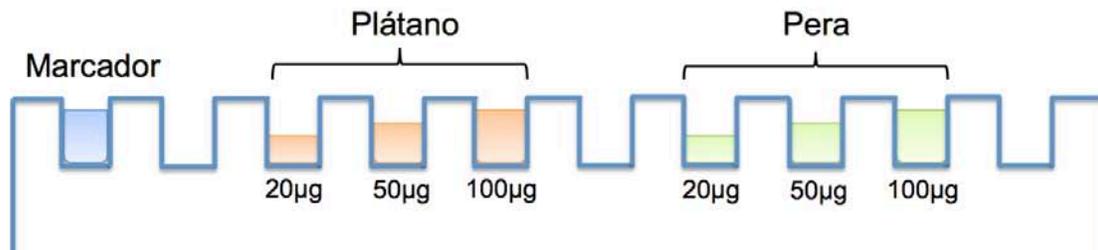


Figura 5. Esquematización de corrida de SDS-PAGE. Muestra las concentraciones añadidas dentro de cada uno de los pozos en el gel de poliacrilamida de las muestras proteicas de plátano y pera.

Finalmente, la electroforesis se inició a 90 voltios constantes durante aproximadamente 30 minutos una vez que las muestras atravesaron el gel concentrador. Posteriormente, el voltaje se cambió a 120 voltios hasta que el frente de corrida se ubicó al borde de los vidrios. Al término de la electroforesis, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie coloidal incubándolo toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Una vez pasada la incubación, se destiñó el gel con Solución desteñidora (Etanol 10% y ácido Fosfórico 1.4%) y se digitalizó en el equipo ChemiDocTM XRS+ Sistem de Bio-Rad.

C) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO LOWRY-TCA ⁶⁶.

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras problema, se utilizó el método colorimétrico de valoración cuantitativa de Lowry. Previamente a realizar la curva patrón, se agregaron 20 µL del extracto problema (Urea;Tiourea), 30 µL de H₂O y 50 µL de TCA al 100%. Pasado esto, se incubó durante 20 minutos a 4°C, seguido de una centrifugación a 16,000 xg/ 20 min/ 4°C.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 rondas de lavado a la muestra problema con 200 µL de acetona al 100% y a su término se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Al término de la centrifugación, las muestras se secaron en el concentrador *Centrivot* guardando a -70 °C hasta su uso.

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras problema, se construyó una curva patrón o de calibración a partir de una solución patrón con albúmina (BSA) (2 mg/mL). Para llevar a cabo esto, la concentración proteica de las muestras problema se determinaron por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. Para esta metodología, se necesitó la elaboración de los reactivos A, B y C, los cuales se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Soluciones utilizadas para la realización del método Lowry

| Soluciones | Reactivos |
|-------------------|--|
| Solución A | NaOH al 0.1N en Na ₂ CO ₃ al 2% |
| Solución B | CuSO ₄ al 1% |
| Solución C | Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (2H ₂ O) al 2% |
| Solución A+B+C | 1mL de B + 1mL de C + 23 mL de A |

Una vez preparadas las soluciones, se prosiguió a realizar la curva patrón como se muestra en la tabla 4:

Tabla 4. Datos correspondientes a la curva patrón realizada para la cuantificación proteica mediante el método Lowry-TCA

| Tubo | Agua | Patrón (BSA) | NaOH | Muestra problema | Reactivo A+B+C | Folín diluido |
|------|-------|--------------|------|------------------|----------------|---------------|
| 1 | 45 µl | --- | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 2 | 40 µl | 5 µl | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 3 | 35 µl | 10 µl | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 4 | 30 µl | 15 µl | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 5 | 25 µl | 20 µl | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 6 | 15 µl | 30 µl | 5 µl | --- | 1 mL | 50 µl |
| 7 | 45 µl | 5 µl | --- | 50 µl | 1 mL | 50 µl |

A continuación, se añadió a cada tubo 1 mL de la solución A+B+C, incubando durante 10 minutos después de agitar perfectamente en vortex. Posteriormente, se adicionó nuevamente a cada tubo 50 µL de Folín diluido 1:1 con agua y se agitó inmediatamente en Vortex, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se leyó la curva patrón y la muestra problema en un espectrofotómetro a 750 nm.

D) PRECIPITACIÓN SECUNDARIA ⁶³.

Con el fin de eliminar interferencias de las muestras proteicas de los extractos frutales, es necesario analizar y comparar métodos de precipitación secundaria que permitan eliminar compuestos interferentes en los perfiles proteicos al aplicar métodos electroforéticos. Por tal motivo, se emplearon los siguientes métodos de precipitación:

TCA Normal. Para la eliminación de interferencias solubles y la concentración de proteínas.

Inicialmente, se tomaron 100 µg de la proteína problema y se mezcló con ácido tricloroacético (TCA) al 100%. Una vez mezclado, se mantuvo a -20°C

durante 5 minutos y posteriormente, se incubó a 4°C toda la noche. Pasada la incubación, la muestra se centrifugó a 16,000 xg/ 15 min/ 4°C, descartando el sobrenadante y recuperando el botón.

Precipitación con etanol. Método útil para concentrar las proteínas y la remoción de clorhidrato de guanidina.

Se mezcló por un volumen de solución de proteína 9 volúmenes de etanol frío al 100%; se homogenizó e incubó toda la noche a -20°C. Pasada la incubación, se centrifugó a 16,000 xg/ 15min/ 4°C, descartando el sobrenadante y recuperando el botón. Finalmente, se lavó el botón con etanol frío (-20°C) al 90%, se agitó con vortex y se centrifugó a 16,000 xg/ 5 min/ 4°C.

Acetona acidificada / Metanol. Método útil para eliminar las interferencias solubles de acetona y metanol como SDS antes de IEF.

Para este método, se preparó acetona acidificada (120 mL de acetona + 10 µL de HCl, obteniendo una concentración final de 1 mM), la cual se utilizó para preparar un reactivo de precipitación mezclando volúmenes iguales de acetona acidificada y metanol, el cual se mantuvo a -20°C. Posteriormente, se tomaron 100 µg de la proteína problema y se le añadieron 4 volúmenes de reactivo de precipitación frío; se homogenizó y se incubó toda la noche a -20°C. Pasada la incubación, se centrifugó a 16,000 xg/ 15 min/ 4°C, descartando el sobrenadante y recuperando el botón.

TCA-Etanol. Método de precipitación útil para concentrar las proteínas y la eliminación de clorhidrato de guanidina.

Se diluyeron 10 µL de la muestra problema en 100 µL de agua y se mezclaron junto con 100 µL de TCA al 20% y se dejó enfriar durante 20 minutos. Una vez fría la muestra, se centrifugó a 16,000 xg/ 15 min/ 4°C, descartando el sobrenadante y recuperando el botón. Posteriormente, se lavó el botón con 100µL de etanol frío (-20°C), se agitó con vortex y se centrifugó a 16,000 xg/ 5 min/ 4°C.

Para cada uno de los cuatro métodos, una vez que se recuperó el botón, el solvente fue evaporado en el concentrador *Centrivap*. Finalmente, las muestras fueron resuspendida en amortiguador de Urea (8M) y Tiourea (2M), para proceder con la electroforesis monodimensional.

Dichos métodos fueron probados únicamente para las muestras proteicas de plátano, con el fin de optimizar la resolución de los SDS-PAGE.

E) ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN DOS DIMENSIONES (2DE) ⁶⁷.

Primera Dimensión: Isoelectroenfoco (IEF) con Gradientes de pH Inmovilizados.

Para la realización de la electroforesis de proteínas en dos dimensiones, se utilizó y modificó el método descrito por Simpson ⁹. Para realizar el IEF en las muestras de plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*), se preparó un volumen final de 125 µL, el cual contenía la muestra problema (200 µg para plátano y 170 µg para pera), amortiguador de IEF (Urea 8M, Tiourea 2M, DTT 1M, CHAPS al 5%, Tritón 100x y azul de bromofenol 0.001%) y 1.25 µL de anfolitos (20% BioLyte® 3/10 Ampholyte #1631112) equivalentes a 1% final.

Posteriormente, el volumen final de la muestra se vertió a lo largo del pozo de la cámara de IEF, colocando inmediatamente una tira de IEF (ReadyStrips IPG Bio-Rad #163-2000) de 7cm un intervalo de pH lineal de 3 a 10 sobre la muestra líquida, seguido de 1 mL de aceite mineral (Bio-Rad #163-2129) con el fin de cubrir toda la tira de IEF junto con la muestra. Finalmente, el equipo PROTEAN® IEF System de Bio-Rad fue programado como se muestra en la tabla 5:

Tabla 5. Programación del equipo de IEF para la separación proteica.

| Paso de Rehidratación | 12 hrs | 20°C | (PASIVA) |
|---------------------------------|---------------|-------------|-----------------|
| Paso 1 | 250v | 20min | Lineal |
| Paso 2 | 4000 v | 2 hrs | Lineal |
| Paso 3 | 4000 v | 10000/hr | Rápida |
| Mantenimiento (Opcional) | 500 v | 8 hrs | Rápida |

Al término de la corrida de IEF, la tira se escurrió eliminando el exceso de aceite mineral y fue guardada a -70°C hasta su uso.

Segunda Dimensión: Separación de Proteínas por Peso Molecular.

Para la segunda parte de la electroforesis bidimensional, se preparó únicamente el gel separador SDS-PAGE al 12%, sin la necesidad de colocar el gel concentrador. Además, junto con el gel, se elaboró y colocó el marcador de masa molecular (2 µL de marcador (Broad-Range de Bio-Rad #1610317) + 1 µL de amortiguador de carga (Tris 125 mM, SDS al 10%, Glicerol al 20%, y azul de bromofenol 0.1%) y DTT 100 mM) en un cuadrado de 0.5x0.5 centímetros de papel filtro. Por otra parte, mientras el gel de poliacrilamida polimerizaba, se descongeló la tira de IEF y se sumergió en 1 mL de amortiguador de equilibrio (Tris HCl, Urea 8 M, Tiourea 2 M, SDS al 2% a pH 8.8 y DTT 25 mM), incubándola durante 15 minutos en

agitación suave. Al término de la incubación, se sumergió nuevamente la tira de IEF en 1 mL de amortiguador de equilibrio con iodoacetamida 100 mM y sin DTT, incubándola de igual forma durante 15 minutos en agitación suave.

Una vez que la última incubación terminó y el gel separador polimerizó, se agregaron aproximadamente 800 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 2% sobre nuestro gel, acto seguido, se enjuagó la tira de IEF con amortiguador Leammli y se colocó sobre el gel de poliacrilamida, mientras que el marcador de masa molecular se adaptó en el extremo izquierdo del SDS-PAGE. Posteriormente, después que la agarosa polimerizó, se inició la electroforesis a 120 voltios constantes, deteniéndola hasta que el frente del gel se ubicó al borde de los vidrios. Al término del método, se procedió a transferir las proteínas a membrana de PVDF, o bien, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie coloidal, incubándose toda la noche a temperatura ambiente en agitación.

F) ELECTROTRANSFERENCIA CON ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES ⁶⁸.

Al término de la electroforesis bidimensional, el gel fue sumergido en solución amortiguadora de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 y metanol 20% v/v) junto con dos filtros gruesos (8x5cm) y dos filtros delgados (8x5cm) durante 10-15 minutos. Al mismo tiempo, se cortaron 2 membranas de PVDF (8x5cm) y se activaron con metanol al 100% de 20-30 min. Una vez saturados los filtros y activadas las membranas, se preparó la cámara de transferencia semihúmeda (Trans-blot [®] Sd Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) colocando los filtros, el gel y las membranas de la siguiente manera:

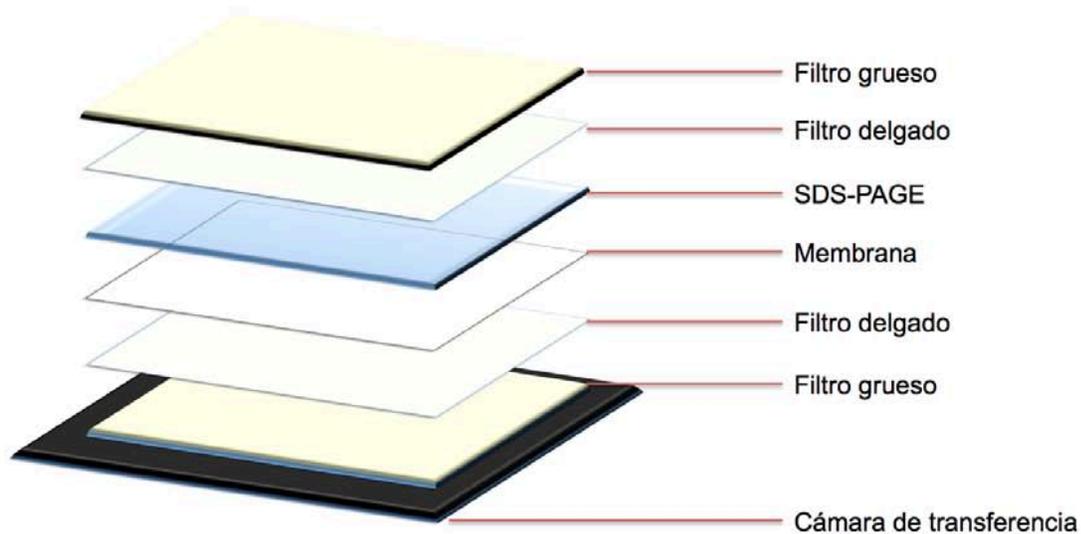


Figura 6. Esquemática de los elementos de transferencia en cámara semihúmeda.

Posteriormente, una vez colocados todos los elementos en el equipo como se esquematiza en la figura 6, la transferencia se realizó a 400 mA/ 30 min por dos geles transferidos. Para esto, es recomendable que el sistema esté lo suficientemente húmedo para que los elementos no se sequen durante la transferencia. Una vez transcurrida la transferencia, las membranas fueron teñidas con *amido black* (*amido black* al 0.1% en metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante 5 min. Finalmente, fueron desteñidas 3 veces con metanol al 20% y ácido acético al 17.5%, y digitalizadas.

G) ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GELES 2DE Y MEMBRANAS DE PVDF

Con el fin de comprobar la eficacia de los métodos anteriores, se comparó el número de manchas proteicas presentes en los geles de poliacrilamida 2DE contra el número de manchas proteicas presentes en las membranas de PVDF. Por tal motivo, este análisis se realizó con la ayuda del programa bioinformático PDQuest (PDQuest 7.2 User Guide, Bio-Rad) el cual es un paquete computacional para análisis de imágenes que analiza y almacena la información proveniente de los

geles 2DE y membranas.

De esta forma, se escanearon tres réplicas de geles y membranas para cada muestra frutal, analizando las imágenes una a una para corregir los errores de detección automática con el fin de realizar el emparejamiento automático de los puntos proteicos, obteniendo como resultado un gel tipo denominado “*gel maestro*” tanto para los geles como para las membranas (ambos casos se analizaron por separado).

Una vez realizada la edición y normalización de los geles 2DE y las membranas de PVDF, los geles maestro se compararon con el fin de observar el número de manchas presentes en cada proteoma antes y después de haber sido transferidas.

VI. RESULTADOS.

6.1. EXTRACTO PROTEICO FRUTAL

Los extractos de proteína obtenidos para cada una de las muestras frutales mostraron cantidades diferentes en cada uno de los casos. Para el extracto de plátano, se obtuvo un liofilizado de proteína con un peso aproximado de 373 mg de los 100 gramos de la pulpa de fruta fresca, generando un rendimiento del 0.373%. Para el extracto de proteína de la pulpa de pera se obtuvo aproximadamente 112 mg, generando un rendimiento de extracción del 0.112%.

Tabla 6. Rendimiento proteico obtenido mediante el método optimizado de extracción proteica mediante solventes orgánicos.

| Extracto frutal | Cantidad proteica obtenida | % de Rendimiento | Concentración proteica |
|-----------------|----------------------------|------------------|------------------------|
| Plátano | 373 mg | 0.373 | 6 µg/µL |
| Pera | 112 mg | 0.112 | 4 µg/µL |

6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO LOWRY-TCA

El interés en la aplicación de este método fue determinar la concentración proteica total de los extractos de pulpas frutales. Por lo que, con el protocolo utilizado se determinó que la concentración total proteica obtenida de los extractos de pulpa de plátano fue de 6 µg/µL, mientras que para el extracto proteico de pulpa de pera se obtuvo una concentración total de 4 µg/µL.

El anexo 2 muestra las curvas patrón obtenidas con BSA, las cuales sirven como referencia para la determinación proteica de las muestras frutales de plátano y pera. Para ambos casos, se observa una coeficiente de correlación (r^2)

adecuado que indica una alta linealidad, así como la calidad del ajuste que se logró en la regresión.

6.3 ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS MEDIANTE PRECIPITACIÓN SECUNDARIA

Los primeros ensayos obtenidos en el trabajo presentaron problemas al obtener el perfil electroforético de los extractos proteicos de plátano, debido a que existía un poco de interferencia (barridos a lo largo de las bandas) en la resolución de bandas como se pueden observar en la figura 7, la cual corresponde al primer ensayo electroforético empleado para las muestras proteicas de extractos de pulpa de plátano.

Por ello, fue necesario emplear métodos de precipitación secundaria que permitieran eliminar los compuestos interferentes restantes en las muestras de plátano y así poder optimizar el perfil proteico, por tal razón se emplearon y compararon 4 métodos de precipitación: TCA-Normal, etanol, acetona acidificada con etanol y TCA-Etanol.

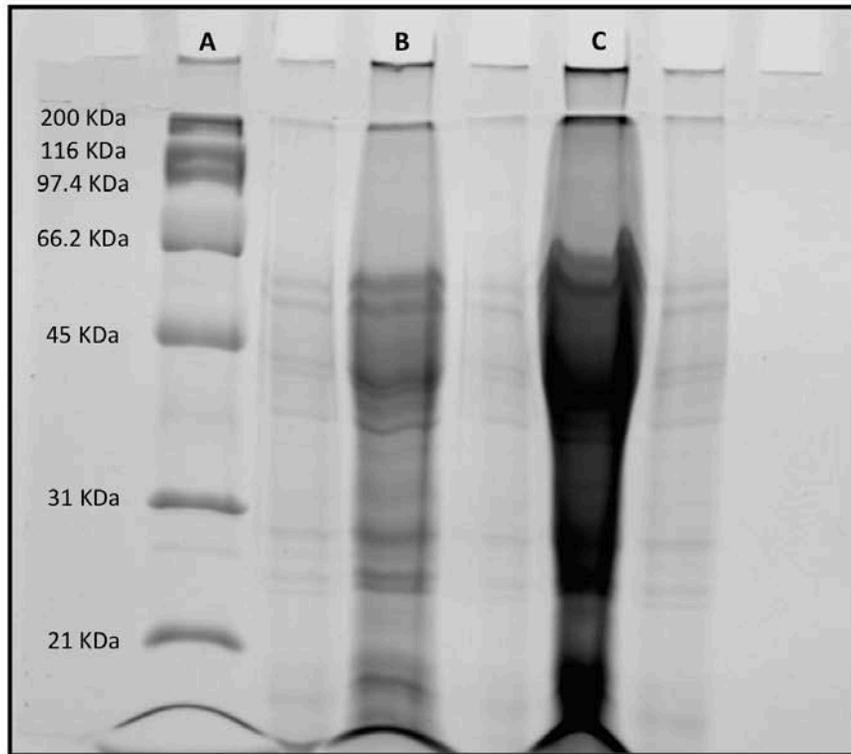


Figura 7. SDS-PAGE al 12% de extractos de plátano. Separación de productos proteicos por masa molecular en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie coloidal. El carril A corresponde al marcador de masa molecular (Broad-Range de Bio-Rad #1610317). El carril B y C contienen 50 μg y 100 μg de la muestra proteica respectivamente.

Una vez precipitadas la muestras de los extractos proteicos de plátano mediante nuestros cuatro métodos de precipitación, se corrieron en 1DE de la siguiente manera: en el carril A se corrió la muestra precipitada mediante etanol; el carril B contiene la muestra precipitada por TCA-Etanol; en el carril C se colocó la muestra precipitada por acetona acidificada con metanol y finalmente, el carril D contiene la muestra precipitada por TCA Normal como se muestra en la figura 8.

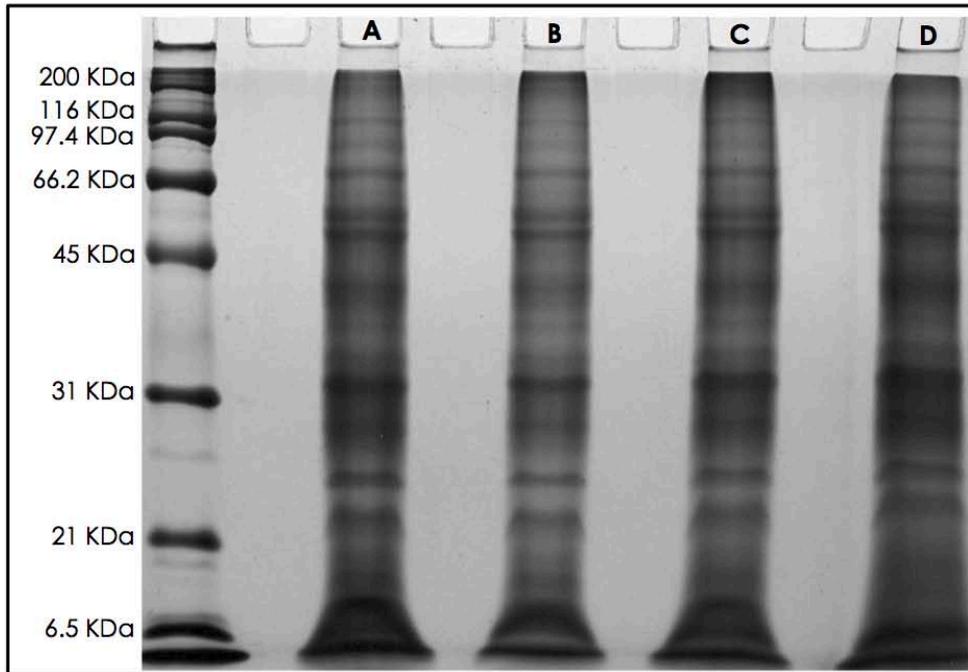


Figura 8. Comparación de métodos de precipitación proteica mediante SDS-PAGE al 12% de extractos de plátano. Separación de productos proteicos de extractos de pulpa de plátano (100 µg) mediante masa molecular comparando diferentes métodos de precipitación proteica. **A)** Precipitación por etanol. **B)** Precipitación por TCA-etanol. **C)** Precipitación por acetona acidificada **D)** Precipitación por TCA normal.

Después de aplicar la prueba electroforética se puede determinar que el método más efectivo de precipitación proteica fue el precipitado mediante TCA-Etanol (Carril B), debido a que se puede observar una mayor definición en cada una de las bandas correspondientes al carril B para ambas muestras con algunas excepciones.

6.4 SEPARACIÓN PROTEICA MEDIANTE SDS-PAGE

En este punto, se realizó una electroforesis de una dimensión para los extractos proteicos de plátano (*Musa paradisiaca*) y pera (*Pyrus communis*). El SDS-PAGE realizado contiene las muestras de ambas frutas a diferentes concentraciones como se muestra en la figura 9, colocando para cada muestra 20,

50 y 100 μg respectivamente. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de lisis modificado (Urea 8M, Tiourea 2M, SDS 1%) con el fin de obtener bandas proteicas bien definidas dentro de nuestro gel .

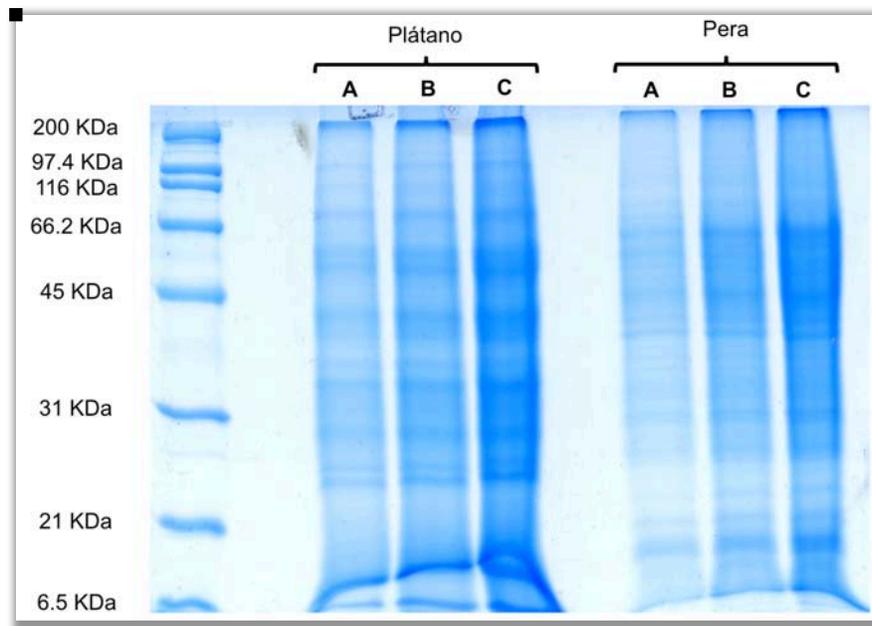


Figura 9. SDS-PAGE al 12% de proteínas de plátano y pera. Separación de productos proteicos de plátano y pera por SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie coloidal. Los carriles A, B y C fueron cargados con 20 μg , 50 μg y 100 μg de proteína respectivamente para cada uno de los casos frutales.

6.5 DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS DE PLÁTANO Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF

Para poder observar las proteínas extraídas de la pulpa de plátano en su totalidad se realizó una separación proteica por punto isoelectrónico (isoelectroenfoque) y por masa molecular (SDS-PAGE 2DE). Sin embargo, para la realización de inmunoensayos, se requiere transferir las proteínas del SDS-PAGE a membranas, ya sea a membranas de PVDF o Nitrocelulosa, proceso por el cual pueden perderse algunas proteínas durante el curso de la transferencia.

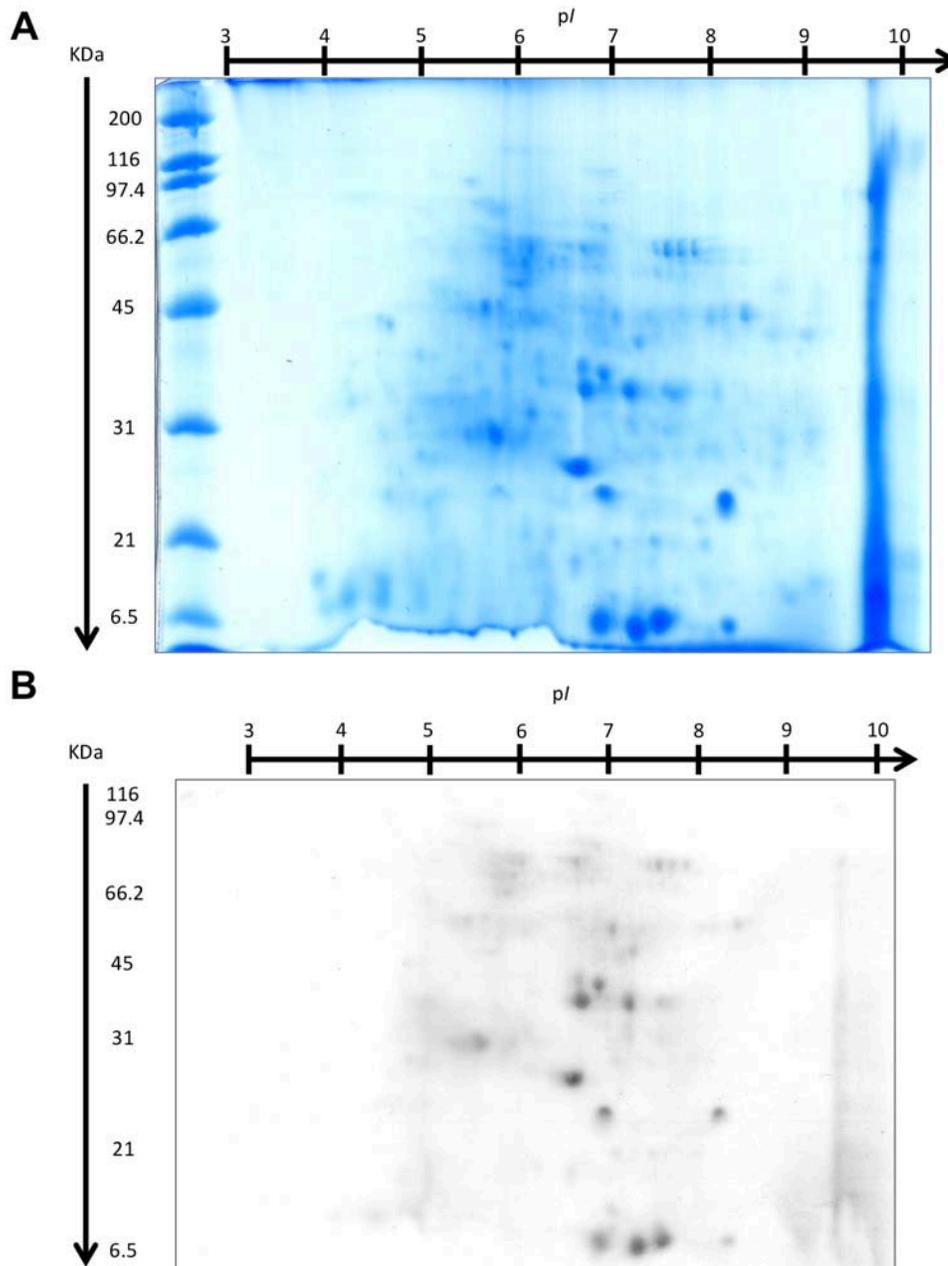


Figura 10. Electroforesis bidimensional de proteínas de los extractos de plátano en un gel de poliacrilamida al 12 % y glicerol al 13%; y transferencia a membrana revelada con colorante. Donde **A**, corresponde a la separación protéica de extractos de pulpa de plátano (200 μ g) mediante geles de dos dimensiones teñido con azul de Coomassie coloidal. El panel **B**, corresponde a la electrotransferencia proteica en membranas de PVDF después del gel 2DE y teñidas con *amido black*.

La figura 10 muestra en el panel A los geles de doble dimensión de los extractos proteicos de la pulpa de plátano, donde se pueden observar una gran cantidad de *spots* entre los intervalos de pH 4.5 y 9.5, contando aproximadamente 57 *spots* de proteína con ayuda del paquete computacional PD-Quest de Bio-Rad. Mientras que en el panel B se encuentran las proteínas ya transferidas a la membrana de PVDF.

Por otra parte, podemos observar en el panel **C** del anexo 5, el 2DE pasada la transferencia, mostrando a simple vista algunos de los *spots* los cuales no se lograron transferir durante el proceso.

6.6 DOBLE DIMENSIÓN DE PROTEÍNAS DE PERA Y TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE PVDF

La figura 11 muestra los geles de doble dimensión (panel A) de los extractos proteicos de la pulpa de pera, donde se pueden observar una gran cantidad de *spots* entre los intervalos de pH 4.5 y 9.5, contando aproximadamente 75 *spots* de proteína. Mientras que en el panel B se encuentran las proteínas ya transferidas a la membrana de PVDF.

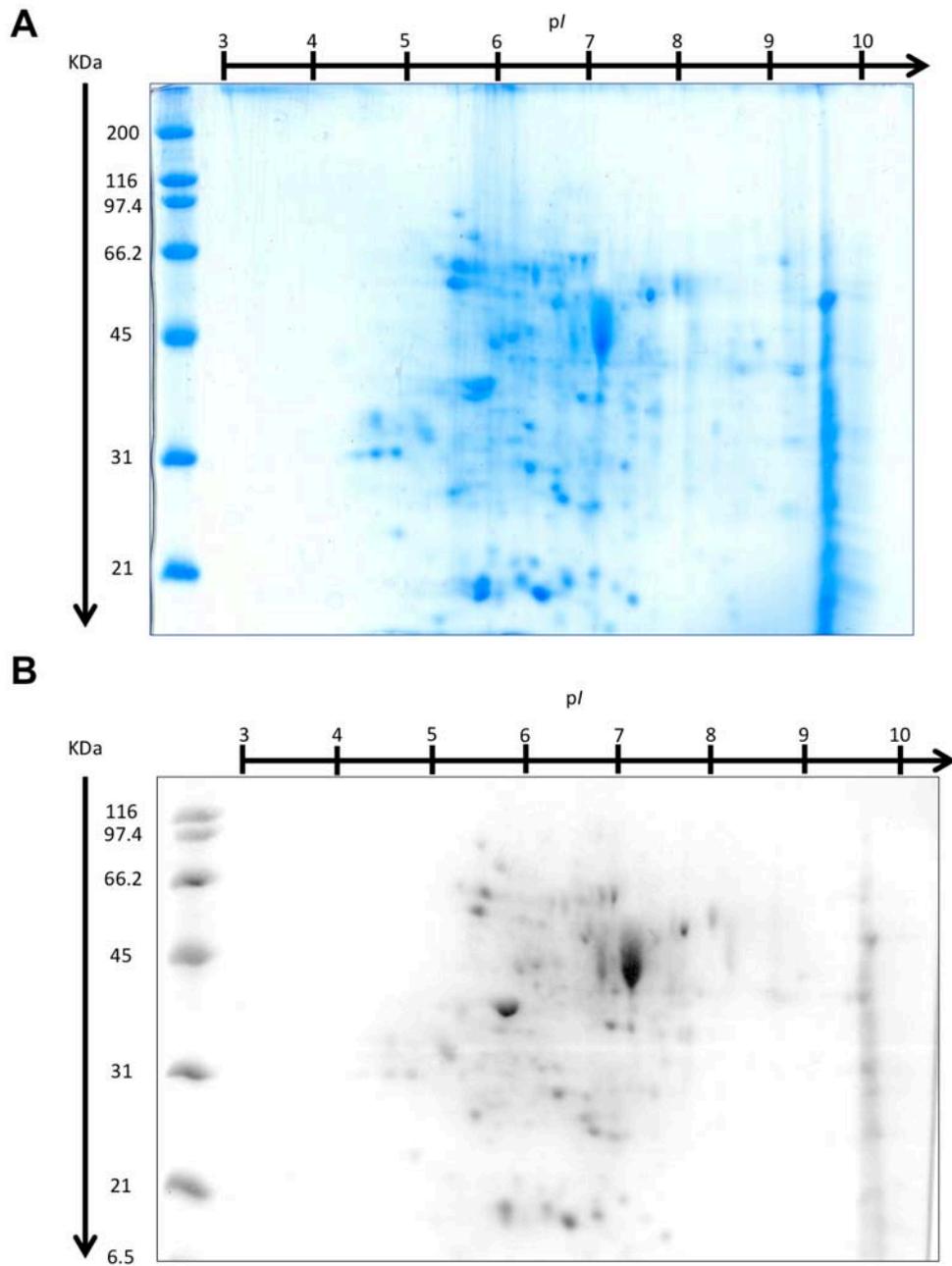


Figura 11. Electroforesis de dos dimensiones de proteínas de los extractos de pera en un gel de poliacrilamida al 12 % y glicerol al 13%; y transferencia a membrana revelada con colorante. Donde **A**, corresponde a la separación de proteínas de extractos de pulpa de pera (170 µg) mediante electroforesis de dos dimensiones teñido con azul de Coomassie coloidal. El panel **B**, corresponde a la electrotransferencia de proteínas en membranas de PVDF después del 2DE y teñidas con *amido black*.

Además, podemos observar en el panel **C** del anexo 6 el gel 2DE pasada la transferencia, mostrando a simple vista algunos de los *spots* los cuales no se lograron transferir durante el proceso.

6.7 ANÁLISIS PROTEICO EN GELES 2DE Y MEMBRANAS DE PVDF

Las figuras 12 y 13 muestran los geles maestro obtenidos por la superposición de los perfiles proteicos obtenidos de los geles 2DE y de las membranas de PVDF. Debido a esto, se obtuvo un emparejamiento automático de los puntos proteicos tanto para pera como para plátano.

Los círculos rojos muestran los puntos proteicos no detectados por el programa en las membranas de PVDF, puntos los cuales sí fueron detectados en los geles 2DE. Para el caso del perfil proteico de extractos de plátano que se muestra en la figura 12, se pueden cuantificar 9 manchas las cuales no fueron detectadas en la membrana, las cuales corresponden 16% de las 57 manchas proteicas totales presentes en el gel 2DE y cuantificadas por el programa computacional.

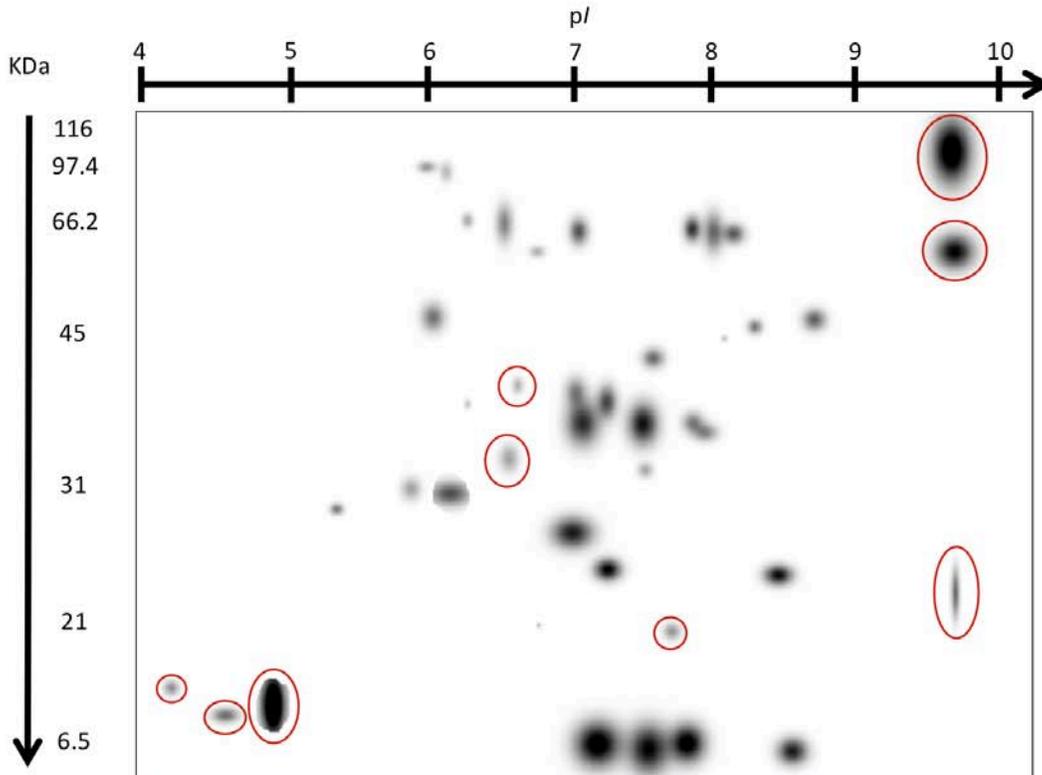


Figura 12. Análisis comparativo entre geles 2DE y membranas PVDF del perfil proteómico de extractos de pulpa de plátano. Gel maestro obtenido por la superposición de los perfiles proteicos de plátano entre 3 replicas de geles 2DE y sus respectivas transferencias a membranas de PVDF. Las marcas rojas encierran a los puntos proteicos no identificados por el programas PDQuest de Bio-Rad en las membranas de PVDF.

En la figura 13, podemos apreciar el gel maestro correspondiente a la comparación de geles 2DE y membranas de PVDF del perfil proteico de extractos de pulpa de pera, donde se pueden observar 18 puntos proteicos los cuales no fueron detectados en las membranas por el programa, por lo que corresponde 24% del de los 75 puntos totales presentes en los geles 2DE.

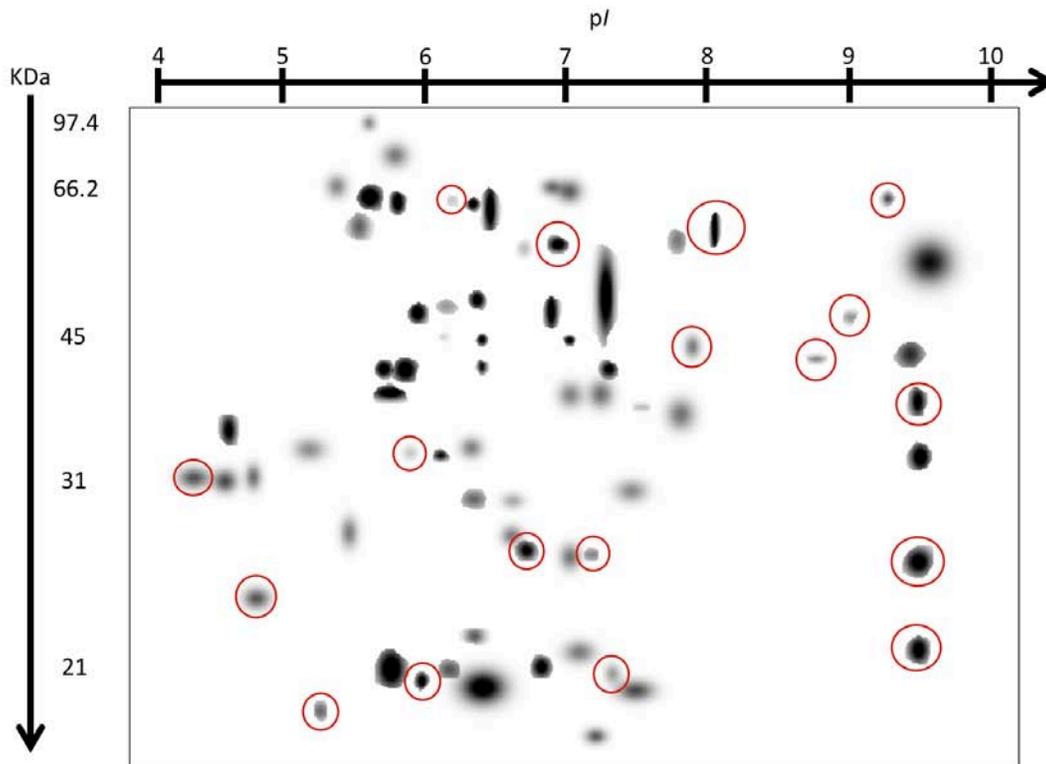


Figura 13. Análisis comparativo entre geles 2DE y membranas PVDF del perfil proteómico de extractos de pulpa de pera. Gel maestro obtenido por la superposición de los perfiles proteicos de extractos de pulpa de pera entre 3 imágenes de geles 2DE y 3 imágenes de sus respectivas transferencias a membranas de PVDF. Los círculos rojos encierran a los puntos proteicos no identificados por el programas PDQuest de Bio-Rad en las membranas de PVDF.

VII. DISCUSIÓN.

7.1 EXTRACCIÓN PROTEICA DE PLÁTANO Y PERA MEDIANTE SOLVENTES ORGÁNICOS

Una gran mayoría de tejidos vegetales no proporcionan una fuente de proteínas significativa y debido a esto, es necesario que se implementen nuevas técnicas que permitan extraer la mayor cantidad de dichas proteínas. La explicación a esto se debe a que la pared celular y la vacuola forman parte de la mayoría de la masa celular y el citosol representa solo el 1-2% del volumen total de la célula ⁶³. Los tejidos vegetales poseen un nivel relativamente bajo en el contenido de proteína/volumen en comparación con bacterias o tejidos animales.

La pared celular y la vacuola están asociadas con numerosas sustancias responsables de la baja reproducibilidad de los resultados y por tanto, de una reducida significancia estadística durante el proceso de la extracción proteica. Las sustancias más comunes que provocan mayor interferencia son compuestos fenólicos, enzimas proteolíticas y oxidativas, terpenos, pigmentos, ácidos orgánicos, iones e hidratos de carbono ^{69, 70}. Sin embargo, desde la década de los 80's se han realizado estudios para la extracción de proteínas en material vegetal, pero los protocolos implementados a partir de esa década son de un solo paso y están restringidos a muestras "limpias", por lo que no es adecuado para material vegetal crudo ⁷⁰.

La mayoría de los protocolos de extracción incluyen un paso de precipitación con TCA para incrementar la concentración de proteínas y ayudar a la eliminación de contaminantes ⁷¹, sin embargo, en ciertas ocasiones ocurre una co-extracción de contaminantes que resulta ser el principal problema de los tejidos de fruta carnosa, ya que presentan un alto nivel tanto de polisacáridos de pared

celular como de pectinas ⁷². Una alternativa ya descrita fue adoptada y modificada para la extracción de proteínas tanto de pera como de plátano y es el protocolo de extracción proteica mediante fenol saturado de Tris ^{73, 74}.

Basado en lo anterior, en el presente proyecto se modificaron y unificaron protocolos de extracción de tejidos frutales, introduciendo nuevos pasos como la precipitación, con el fin de concentrar el material proteico y así poder separarlo de los compuestos que causan interferencia. Las proteínas generalmente se precipitan mediante la adición de altas concentraciones de sales, aniones voluminosos ⁷⁵, solventes orgánicos ⁷⁶, o una combinación de disolventes e iones orgánicos ⁷⁷.

Este estudio se enfocó principalmente a la extracción proteica de especies vegetales que contienen una gran cantidad de elementos interferentes como lípidos, fibras y azúcares que dificultan la obtención de proteínas puras. El plátano (*Musa paradisiaca*) representante de la familia Musaceae y la pera (*Pyrus communis*) representante de la familia Pyrus, son ejemplares frutales que contienen muchos compuestos que interfieren en la extracción de proteínas y de los cuales existen escasas publicaciones que revelen su proteoma mediante 2DE. Estos ejemplares frutales contienen altos niveles de enzimas oxidativas como la polifenol oxidasa, compuestos fenólicos, carbohidratos, así como una gran cantidad de terpenos, suberina y ceras ^{78, 79}.

Con el objetivo de obtener un buen protocolo de extracción proteica para pequeñas cantidades de tejido vegetal y con la ayuda de métodos ya descritos, optimizamos el protocolo de extracción de proteínas de tejidos vegetales mediante compuestos fenólicos ^{63, 64}. Dentro de este método, la sacarosa juega un papel fundamental debido a que forma una fase acuosa de mayor densidad al entrar en

contacto con el fenol, conteniendo los carbohidratos, ácidos nucleicos y restos celulares insolubles; por otra parte, la fase superior rica en fenol contiene las proteínas citosólicas y de membrana así como lípidos y pigmentos ⁸⁰.

Con el fin de optimizar el ensayo se añadió SDS, el cual es un detergente aniónico que actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, generando su desnaturalización y provocando que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa; el mercaptoetanol es un agente reductor que se encarga de romper los enlaces disulfuro para asegurarse de desnaturalizar por completo a las proteínas ⁶⁵, mientras que los inhibidores de proteasa son agregados con el fin de inhibir dichas enzimas que se liberan tras la ruptura celular ⁷⁹.

Así como fueron añadidos elementos al optimizar el protocolo de extracción, también se eliminaron compuestos los cuales no mejoraban el protocolo o los cuales fueron sustituidos por otros. El polivinilpirrolidona (PVPP) es un fuerte aceptor de H⁺, por lo que es eficaz en la adsorción fenólica ⁸¹. Sin embargo, la adición de este compuesto resultó ineficiente para este protocolo debido al pH alto utilizado en el amortiguador de extracción, debido a que los fenoles son principalmente ionizados y no pueden ser adsorbidos en un pH menor. Al igual que el PVPP, otros agentes fueron eliminados después de diversas pruebas de “calidad y reproducibilidad”, tales como el EDTA y el DTT que a pesar de ser un considerado como un poderoso agente reductor, no previene la oxidación de fenoles en las muestras vegetales ⁷⁹.

Por su parte, el procedimiento de extracción tiene una alta capacidad de limpieza. El fenol como disolvente es uno de los más fuertes agentes disociadores que disminuyen las interacciones moleculares entre proteínas y otros materiales. Sin embargo, las desventajas del procedimiento de extracción por fenol es que

toma mucho más tiempo que otros métodos de preparación de muestras, además de que es un compuesto sumamente tóxico ⁶³.

Finalmente, mediante la optimización del protocolo de extracción se consiguió una alta calidad y cantidad de extracción de proteínas libres de contaminantes para ambos casos de muestras biológicas frutales como se muestra en la figura 9. Lo anterior se fundamenta debido a que el fenol ofrece una mayor estabilidad proteica al minimizar la proteólisis durante la extracción ⁸². A pesar de que el plátano y la pera no presentaron un comportamiento similar en la extracción de proteínas respecto a la cantidad obtenida de cada una, las 2DE de las figuras 10 y 11 demuestra la eficiencia en calidad proteica obtenida con este método para ambas frutas.

7.2 EFECTIVIDAD EN MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN SECUNDARIA DE PROTEÍNAS

Una vez realizada la extracción y solubilización de las proteínas, el siguiente paso fue evaluar la integridad de las mismas para ambas muestras, con el fin de obtener y visualizar un buen mapa proteico asegurando de que dichas proteínas no hayan sufrido degradación y así poder lograr la reproducibilidad de estos perfiles de expresión para cada muestra frutal.

Después de haberse empleado un SDS-PAGE, se observó que el amortiguador de lisis utilizado (Urea 8M, Tiourea 2M, SDS 1%), mostraba interferencias a lo largo de las bandas en cada una de las muestras como se muestra en la figura 7. Debido a lo anterior, se emplearon y pusieron a prueba diferentes técnicas de precipitación secundaria con el fin seleccionar cual de todas ellas proporcionaba mayor efectividad en la eliminación de interferencias y una mejor visualización proteica.

La necesidad de encontrar un protocolo de extracción de las proteínas apropiado es crucial, ya que la cantidad y número de proteínas solubilizadas depende fuertemente de los tejidos de partida ⁸³. Uno de los pasos críticos a la hora de plantear la separación de mezclas complejas de proteínas mediante la técnica electroforética es la preparación adecuada de las muestras ⁸⁴, ya que la finalidad de este trabajo es visualizar el mayor número de proteínas posible contenidas en nuestras muestras frutales de plátano y pera.

Sin embargo, algunas proteínas presentan solubilidades que varían con la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la constante dieléctrica del medio. Por lo tanto, estas propiedades pueden utilizarse para concentrar y purificar estos productos mediante la técnica de precipitación por solventes ⁸⁵. Por esta razón, se decidió purificar las proteínas del extracto frutal mediante cuatro métodos diferentes de precipitación, con el fin de seleccionar el mejor de estos para obtener un mejor perfil proteómico.

La precipitación con ácido tricloroacético (TCA) fue empleada como estrategia para la remoción de compuestos interferentes de TCA, así como la concentración de proteínas para ambas muestras frutales; sin embargo, una desventaja o limitación en la precipitación con este elemento se da en que las proteínas llegan a ser difíciles de resuspender o pueden resuspenderse de forma incompleta ⁸⁵. Es por ello que diferentes autores recomiendan remover los residuos de TCA con lavados exhaustivos de acetona o etanol.

La adición de solventes orgánicos neutros miscibles con el agua, tales como metanol, etanol o acetona, disminuye la solubilidad en agua de la mayor parte de las proteínas globulares de tal manera que precipitan en la solución. Este

tipo de solventes son capaces de precipitar proteínas a través de la reducción de la constante dieléctrica del medio en el cual están presentes ⁸⁶.

Sin embargo, estos solventes pueden llegar a distorsionar la estructura de las proteínas, posiblemente por acción a nivel de los enlaces hidrofóbicos, determinando la desnaturalización de las proteínas ⁸⁷. Como se muestra en la electroforesis de la figura 8, las pruebas de precipitación con solventes orgánicos como la acetona y el etanol muestran interferencias a lo largo de las bandas y esto puede deberse a la presencia de compuestos no solubles en solventes orgánicos como suele ser el caso de detergentes o lípidos que comúnmente pueden permanecer en solución ⁸⁸.

Con base en lo anterior, se pudo comprobar que la purificación con TCA-Etanol, resultó la más efectiva en comparación con el resto de los métodos probados, debido a que las bandas de proteína mostradas por el SDS-PAGE de la figura 8 muestran una mayor resolución, por lo tanto este método de precipitación secundaria resultó efectivo para el enriquecimiento y la purificación de las proteínas de las muestras.

7.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA

La cuantificación de proteínas de manera precisa es esencial para todos los experimentos relacionados a proteínas en una gran cantidad de temas de investigación. Se han desarrollado diferentes métodos para cuantificar proteínas totales. Sin embargo, debido a su efectividad se optó por utilizar el método colorimétrico de cuantificación proteica Lowry ⁸⁹.

El ensayo de Lowry, propuesto por Oliver H. Lowry en 1951, se basa en dos reacciones químicas. La primera reacción es la reducción de los iones de cobre en

condiciones alcalinas, los cuales forman un complejo con los enlaces peptídicos, mejor conocida como reacción de Biuret. La segunda es la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, el cual causa un cambio en el color de la solución a azulado con una absorción en el rango de 650 nm a 750 nm⁹⁰.

Este método de cuantificación proteica es muy efectivo ya que proporciona ventajas como la sensibilidad, y lo más importante, la exactitud del ensayo. Sin embargo, las altas concentraciones de compuestos como azúcares, detergentes, carbohidratos, glicerol, tricina, EDTA, Tris presentes en las muestras, pueden interferir con el ensayo de Lowry y forman precipitados⁹⁰.

No obstante, se cree que el efecto de estas sustancias puede ser reducido diluyendo la muestra, siempre y cuando la concentración de proteínas sea lo suficientemente alta⁹¹. En nuestro caso, con la utilización de nuestros extractos proteicos de pulpas frutales obtenidos mediante el protocolo optimizado de extracción mediante fenol saturado de Tris seguido de la precipitación por TCA-Etanol, se obtuvo una cantidad considerable de proteínas tanto para plátano como para pera, con las cuales se procedió a realizar la cuantificación proteica mediante dicho protocolo ya mencionado. El ensayo de Lowry proporcionó una concentración proteica para plátano de 6µg/µL y de 4µg/µL para pera.

7.4 EVALUACIÓN DEL PERFIL PROTEÓMICO DE PLÁTANO Y PERA MEDIANTE 2DE

Las técnicas proteómicas como la electroforesis de alta resolución en dos dimensiones son utilizadas a gran escala en la investigación con el fin de analizar la síntesis global de proteínas como un indicador de la expresión genética de diferentes organismos. Las proteínas se encuentran entre las moléculas más

estudiadas en plantas, incluyendo determinación de estructura, propiedades y función biológica ⁹².

La proteómica y el estudio de las variaciones cualitativas y cuantitativas en los patrones de expresión de proteínas han supuesto un gran avance en la identificación de proteínas y enzimas implicadas en los procesos moleculares y rutas metabólicas que se desarrollan en los organismos vegetales. La separación de proteínas vegetales por electroforesis bidimensional tiene las mismas limitaciones que las encontradas para proteínas de otros orígenes ⁹³.

Los tejidos vegetales a menudo representan un material de partida complicado para la extracción de proteínas y su estudio mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. En general los contenidos de proteínas son bajos comparados con cultivos de microorganismos y tejidos animales ^{84, 94}. Además, los tejidos vegetales son ricos en compuestos que producen interferencias y pérdida de reproducibilidad (contenido en sales, ácidos orgánicos, fenoles, proteasas, ligninas, pigmentos, terpenos, ceras, entre otros), que se acumulan en diferentes compartimentos y orgánulos que ocupan gran parte del volumen celular ⁹⁴.

En las extracciones de proteínas a partir de plantas a menudo se observan fenómenos de agregación y degradación de las proteínas como consecuencia del contenido en fenoles y proteasas en el material de partida, que causan modificaciones en peso molecular y punto isoeléctrico ⁹². Además, los tejidos vegetales suelen presentar una elevada concentración de iones y sales en disolución que pueden provocar efectos negativos tanto en la solubilización como en la migración de las proteínas en los diferentes pasos del análisis mediante 2DE

Por todas estas razones, un buen método de extracción de proteínas de los tejidos vegetales como el que se mostró y probó en este trabajo debe contemplar la eliminación de compuestos de naturaleza no proteica, así como la disociación completa de las interacciones entre diferentes proteínas. Una determinación precisa de la cantidad de proteína total en las muestras procesadas es de una importancia fundamental para la elaboración de los geles bidimensionales. La reproducibilidad y la comparación en los niveles de expresión de las proteínas dependen en gran medida de la cantidad y naturaleza de las mismas en la muestra analizada ⁹⁵.

El fraccionamiento de los extractos mediante la aplicación de diferentes métodos, previo a la separación por 2DE puede favorecer la recuperación de proteínas poco abundantes y/o difíciles de solubilizar ⁹⁶. Debido a esto, una vez obtenido un método exitoso de extracción proteica de pulpa frutal, tanto para plátano como para pera, fue necesario enriquecer las preparaciones de dichas proteínas modificando el amortiguador de Lisis con la adición del detergente Tritón X-100 ⁹⁷, lo que dio como resultado una gran variedad de especie proteicas bien definidas dentro de nuestro gel, como se puede apreciar en las figuras 10 y 11. El resultado fue satisfactorio tanto para proteínas de plátano como para proteínas de pera, mostrando una excelente distribución para ambas coordenadas, así como la del punto isoeléctrico (horizontal), como para el peso molecular (vertical).

El método utilizado para los estudios de comparación de perfiles proteicos (2DE), permitió la generación de datos fácilmente evaluables, así como su comparación cuantitativa como se muestra en las figuras 12 y 13. El análisis entre los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF mediante el paquete computacional PDQuest de Bio-Rad, permitió cuantificar la pérdida proteica

durante el proceso de la transferencia para ambos extractos de pulpa frutal; contando con un 24% (18 *spots* de los 75 totales) menos de proteínas en las membranas de PVDF para el caso del extracto proteico de pulpa de pera. Para el caso del extracto de pulpa de plátano se obtuvo una pérdida del 16% (9 *spots* de los 57 totales) durante la transferencia proteica de geles de poliacrilamida a membranas de PVDF.

Sin embargo, la pérdida proteica durante la transferencia de las mismas entre los geles de poliacrilamida a las membranas de PVDF a lo largo de este estudio, puede no considerarse una pérdida absoluta, debido a que durante la transferencia la cantidad proteica de algunos *spots* puede haberse visto reducida por debajo del límite de detección con el colorante *amido black* en las membranas de PVDF.

Finalmente, podemos llegar a resumir que a lo largo de este trabajo hemos logrado describir una metodología de extracción proteica de organismos frutales efectiva y con alto índice de reproducibilidad que permite el análisis proteómico mediante 2DE, tanto para frutos de la familia Rosaceae como para frutos de la familia Musaceae. Es importante mencionar que se obtuvo un perfil proteómico bastante limpio para cada una de las muestras, obteniendo un alto número de *spots* tanto para pera como para plátano gracias a la optimización del método de extracción de proteínas a base de solventes orgánicos y precipitación secundaria.

VIII. CONCLUSIONES.

En el análisis proteómico, la extracción, solubilización y cuantificación de las proteínas son factores claves para la obtención de resultado fiables y reproducibles. En este trabajo se logró optimizar un método de extracción proteica para tejidos frutales tales como el plátano (*Musa paradisiaca*) y la pera (*Pyrus communis*) mediante solventes orgánicos, proporcionándonos de esta manera, proteínas libres de compuestos interferentes presentes en dichos organismos frutales. Estos extractos proteicos permitieron la obtención de proteomas de alta calidad para ambas frutas.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán la realización de estudios posteriores relacionados con el análisis inmunoproteómico de proteínas alergénicas en pacientes pediátricos mexicanos con el fin de obtener un método diagnóstico eficaz y preciso.

IX. REFERENCIAS.

1. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. **“Contributions of proteomics to diagnosis, treatment and prevention of candidiasis”**. En: Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organisms (Humphery-Smith, I. & Hecker, M., Eds.). Wiley-Vch, New Jersey. (2006) pp. 331-361.
2. Graves, P. R. & Haystead, T. A. **“Molecular biologist’s guide to proteomics”**. Microbiol. Mol. Biol. (2002) Rev. 66: 9-63.
3. Lubec G, Krapfenbauer K, Fountoulakis M. **“Proteomics in brain research: potentials and limitations”**. Prog Neurobiol. (2003); 69(3): 193-211.
4. Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. **“Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds”**. Electrophoresis I (1997), 18, 1217-1242.
5. Righetti PG, Castagne A, Herbert B. **“Prefractionation techniques in proteome analysis”**. Anal Chem. (2001); 73 (11): 320.
6. Wilkins, M. R.; et al. **“High-throughput mass spectrometric discovery of protein posttranslational modifications”**. J Mol Biol (1999) 289, 645-57.
7. Wilkins, M. R.; et al. **“High-throughput mass spectrometric discovery of protein posttranslational modifications”**. J Mol Biol (1999) 289, 645-57.
8. Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA. **“Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain”**. Neuroscience. (2004) 124(4): 915-26.
9. Simpson, RJ. **“Proteins and proteomics. A laboratory manual”**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York (2003). pp. 1-3.
10. Siusdak, G. **“Mass spectrometry in biotechnology”**. MCC Press, San Diego (2003).
11. Castellanos-Serra L and Paz-Lago D. **“The inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation. Its evaluation in challenge experiments”**. Electrophoresis (2002); 23, 1745, 1753.
12. Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. **“Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic**

- fungus Candida albicans cell wall proteome**". Molecular and Cellular Proteomics (2002);1, 967-982.
13. Mackey AJ, Haystead TA, Pearson WR. **"Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences"**. Mol Cell Proteomics (2002); 1(2):139-47.
 14. Andreu, D. y Rivas L. **"Péptidos en biología y en biomedicina"**. Primera edición. RAYCAR S.A. Impresiones. España (1997). pp. 376-382.
 15. Walker, JM. **"The Protein Protocols Handbook"**. Third Edition. New York (NY): Springer-Verlag New York (2009) , LLC.
 16. Vallejo, FL., & Rinas, U. **"Strategies for recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins"**. Microb Cell Fact. (2004); 2:3(1):11.
 17. Ahmed, H. **"Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization"**. Primera edición. CRC Press LLC. Estados Unidos de América (2005). pp. 22-30.
 18. Gonzalez LJ, Castellanos-Serra L, Badock V, Diaz M, Moro A, Perea S, Santos A, Paz-Lago D, Otto A, Muller EC, Kostka S, Wittman-Liebold B, Padron G. **"Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved procedure for the analysis of silver-stained proteins"**. Electrophoresis (2003), 24, 237-252.
 19. O'Farrell, P H. **"High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins"**. J. Biol. Chem. (1975), 250, 4007-4021.
 20. Klose J. **"Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals"**. Humangenetik (1975), 26, 211-234.
 21. Yates JR. **"Mass spectrometry from genomics to proteomics"**. Trends in Genetics. (2000) 16:5-8.
 22. Mann, M.; Hojrup, P. and Roepstorff, P. **"Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases"**. Biol Mass Spectrom (1993) 22, 338-45.
 23. Gaskell, S. J. **"Electrospray: Principles and practice"**. J Mass Spectr (1997) 32, 677-688.

24. Tjalsma, H., Schaeps, R. M. J. & Swinkels, D. W. **“Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications”**. *Proteomics Clin. Appl.* (2008) 2: 167-180.
25. Caron, M., Choquet-Kastylevsky, G. & Joubert-Caron, R. **“Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery”**. *Mol. Cell Proteomics* (2007), 20: 1115-1122.
26. Kay AB. **“Allergy and Allergic Diseases”**. First of two parts. *N Engl J Med* (2001); 344 (1): 30-37.
27. Hee Soon Shin and Dong Hwa Shon. **“Food and Natural Materials Target Mechanisms to Effectively Regulate Allergic Responses”**. *J Nutr Sci Vitaminol* (2015), 61, S109-S111.
28. Álvarez B., Álvarez Caro. **“Reacciones adversas a alimentos e historia natural de la alergia alimentaria en la infancia”**. *Boletín de la sociedad de pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León. Biol. Pediatr.* (2008); 48: 21-36.
29. Moreira, V. y López, S. **“Alergia a Alimentos”**. *Revista Española de Enfermedades Digestivas. España* (2007). Vol. 99. N.º 3, pp. 172.
30. Romero Valdez JG, et al. **“Reacciones de hipersensibilidad”**. *Revista de posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* (2007) 168:11-17.
31. BruijnzeeL-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Björkstén B, Moneret-Vautrin D, Wüthrich B. **“Adverse reactions to food.”** *Allergy* (1995); 50: 623-35.
32. Johanson, S., Hourihane, J.O.B., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T. **“A revised nomenclature for allergy. An EAACI nomenclature task force”**. *Allergy* (2001); 56:813-824.
33. Sampson, H. **“Update on food allergy”**. *J Allergy Clin Immunol* (2004); 113: 805-819.
34. Taylor SJ, Hefle L. **“Food as allergen. In: Brostoff J, Challacombe S. Food allergy and intolerance”**. 2.a ed. Toronto, Canadá: Saunders (2002). p. 403-12.
35. Burks W, Helm R, Stanley S, Bannon G. **“Food allergens”**. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2001); 1:243-6.

36. Sierna, M. **“Alergia a Alimentos”**. Departamento de Alergia e Inmunología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, SSA, México, D.F. Gaceta Médica de Mexico, 147 Suppl (2011); 1:57-66.
37. Zuidmeer L, Goldhahn K, Roma RJ, et al. **“The prevalence of plant food allergy a systematic review”**. J Allergy Clin Immunol. (2008);121: 1210-8.
38. Snijders BE, Thijs C, Van Ree R, Van den Brand PA. **“Age at first introduction of cow milk products in relation to infant’s atopic manifestation in the first 2 year of life, the KOALA birth cohort study”**. Pediatrics (2008);122:e115-22.
39. Cuesta-Herranz, J., Lázaro, M., Figueredo, E., Igea, J.M., Umpiérrez, A., De las Heras, M. **“Allergy to plant derived fresh foods in a birch and ragweed free area”**. Clin Exp Allergy (2000); 30: 1.411-6.
40. Bircher, A.J., Van-Melle, G., Haller, E., Curty, B., Frei, P.C. **“IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy”**. Clin Exp Allergy (1994); 24: 367-74.
41. Fernández Rivas M. **“Alergia a los alimentos”**. En SEAIC. Alergológica 2005. Madrid: Luzán, 5S.A. de Ediciones (2006). p. 227-53.
42. Blanco, C., Carrillo, T., Castillo, R., Quiralte, J., Cuevas, M. **“Latex allergy: clinical features and crossreactivity with fruits”**. Ann Allergy (1994); 73: 309-314.
43. Peláez, H., y Dávila G. **“Tratado de Alergología, T. 2”**. Madrid, Ergon (2007).
44. Rodríguez Mireles KA, et al. **“Síndrome de alergia oral en adultos de un hospital de tercer nivel”**. Revista Alergia (2014); 61:65-72.
45. Yagami, T. **“Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome”**. Int Arch Allergy Immunol (2002); 128: 271-9.
46. Breiteneder, H. y Ebner, C. **“Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens”**. J Allergy Clin Immunol (2000); 106: 27-36.
47. Cisteró, B., y Miranda, E. **“Reactividad Cruzada en alergia a alimentos. Aplicación de las técnicas de la biología molecular”**. 1ª ed. Barcelona (2005): MRA Ediciones.

48. Vuitton DA. **“Allergic crossreactions. General and practical aspects”**. Clin Rev Allergy Immunol (1997); 15: 367-74.
49. Bernhisel-Broadbent J. **“Allergenic cross-reactivity of foods and characterization of food allergens and extracts”**. Ann Allergy Asthma Immunol (1995); 75: 295-303.
50. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. **“The oral allergy síndrome”**. Ann Allergy (1988); 61: 47-52.
51. Dreborg S, Foucard T. **“Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy”**. Allergy (1983); 38: 167-72.
52. Cisteró-Bahima, A., Bartolomé, B., Alonso, R., Moncín, M.M., Bartra, J., Martínez, A. **“Platanus acerifolia pollinosis and food allergy”**. Allergy (2002); 57: 351-6.
53. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kuby, J. **“Inmunología”**. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México (2004). pp. 372-373.
54. López Rubio A, Rodríguez J, Crespo JF, Vives R, Daroca P, Reaño M. **“Occupational asthma caused by exposure to asparagus: detection of allergens by immunoblotting”**. Allergy (1998); 53: 1.216-20.
55. Fernández Rivas M, Van Ree R, Martínez M, Cuevas M. **“Alergia a Rosáceas. Características clínicas y alérgenos implicados”**. Rev Esp Alergol Inmunol Clin (1996); 11 (Extr. 2): 50-9.
56. Van-Ree R. **“Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens”**. Biochem Soc Trans (2002); 30 (Pt. 6): 910-3.
57. Demoly P, Bousquet J, Romano A. **“In vivo methods for the study of allergy. Skin test techniques and interpretation. In: Middleton’s Allergy: Principles and Practice”**. Sixth edition Philadelphia, Pennsylvania: Mosby (2003); p.1268-1278.
58. Sussman G, Sussman A, Sussman D. **“Oral allergy síndrome”**. CMAJ (2010);182:1210-1211.
59. Sicherer SH. **“Clinical implications of cross-reactive food allergens”**. J Allergy Clin Immunol (2001); 108: 881-90.
60. Londo Y, Urisu A. **“Oral allergy síndrome”**. Allergol Int (2009); 58:485-491.

61. Ausucua M, Dublin I, Echebarria M, Aguirre J. **“Oral allergy syndrome (OAS)”**. General and stomatological aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* (2009);14:568-572.
62. Bock S. A. **“In vivo diagnosis: Skin testing and oral challenge procedures”**. In: Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA, eds. **“Food allergy. Adverse reactions to foods and food additives”**. 2nd ed. Cambridge, Mass. Blackwell Science (1997); p. 151-66.
63. Carpentier C. S., et al. **“Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis”**. *Proteomics* (2005), 5:2497-2507.
64. Jiang L., et al. **“Proteomic analysis of peach fruit during ripening upon post-harvest heat combined with 1-MCP treatment”**. *Journal of Proteomics* (2014), 98:31-43.
65. Garcia H.M. **“Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia”**. *Univ Diag* (2000); 1(2):31-41.
66. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. **“Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, farr and Randall”**. *Biol. Chem.* (1951).; 193, 265.
67. Alban A, et al. **“A novel experimental design for comparative two dimensional gel analysis: two dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard”**. *Proteomics* (2003) 36-44.
68. Medina E, et al. **“Manual de técnicas modernas en inmunología teoría y práctica”**. Secretaria de Salud (2000) 15-41.
69. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., de Vienne, D., in: Chrambach, A., Dunn, M. J., Radola, B. J. **“Advances in Electrophoresis”**. VCH, Weinheim, Germany (1988); pp. 265–280.
70. Meyer, Y., Grosset, J., Chartier, Y., Cleyetmarel, J. C. **“Electrophoresis”**. (1988) 9, 704–712.
71. Santoni V, Bellini C y Caboche M. **“Use Of 2-Dimensional Protein-Pattern Analysis For The Characterization Of Arabidopsis-Thaliana Mutants”**. *Plants* (1994); 192:557-566.
72. Saravanan RS y Rose JKC. **“A critical evaluation of simple extraction**

- techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues**". *Proteomics* (2004); 4:2522-2532.
73. Jun Song, et al. **"A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis"**. *Electrophoresis* (2006), 27: 3144–3151
 74. Yun Shi, et al. **"Dinamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage"**. *Horticulture Research* (2014) 1,6: 1-21.
 75. Wu, F. S., Wang, M. Y. **"Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissue"**. *Anal. Biochem.* (1984), 139, 100–103.
 76. Flengsrud, R., Kobro, G. **"A method for two dimensional electrophoresis of proteins from Green plants tissues"**. *Anal. Biochem.* (1989);177, 33–36.
 77. Damerval, C., Devienne, D., Zivy, M., Thiellement, H. **"Electrophoresis"**. (1986) 7, 52–54.
 78. Gooding, P. S., Bird, C., **"Robinson, S. P. Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase"**. *Plants* (2001), 213, 748–757.
 79. Loomis, W. D., Bataille, J. **"Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes"**. *Phytochem.* (1966); 5, 423–438.
 80. Hochstrasser, DF., Harrington, MG., Hochstrasser, AC., Miller, MJ., Merrill, CR. **"Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis"**. *Anal. Biochem.* (1988); 173, 424–435.
 81. Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A. et al. **"Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds"**. *Electrophoresis* 2003, 24, 2369–2375.
 82. Schuster, AM. y Davies, E. **"Ribonucleic-Acid And Protein-Metabolism In Pea Epicotyls"**. *The Aging Process. Plant Physiol* (1983);73:809-816.
 83. Stasyk, T.; Hellman U.; Souchelnytsyi, S. **"Optimising simple preparation for 2-D electrophoresis"**. *Life Science News* (2001); 9, 9-12.
 84. Casado, J. **"Aproximación enzimática, molecular y proteómica al**

- estudio de la podumbre apical de tomate. Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas oxidantes**". Departamento de Agroquímica y Bioquímica, Universidad de Alicante (2004); 85-115.
85. Nandakumar, M. P., Shen, J., Raman, B., Marten, M. R. "**Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis**". *Proteome Res.* (2003); 2, 89–93.
86. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I. et al. "**Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis**". *Electrophoresis* (1998); 19, 837–844.
87. Huerta, O. "**Análisis proteómico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía**". Instituto de investigación científica y tecnológica A.C. (2008); 21, 44-45.
88. Méchin, V.; Damerval, C.; Zivy, M. "**Total Protein Extraction with TCA-Acetone**". *Methods in Molecular Biology. Plant Proteomics: Methods and Protocols* (2007); 335.
89. Johnson, M. "**Protein quantification**". *Methods* (2012); 2:115.
90. Olson B, Markwell J. "**Assays for determination of protein concentration**". *Curr Protoc Protein Sci.* (2007); 0:Unit 3.4.
91. Waterborg J, Matthews H. "**The lowry method for protein quantitation**". *Methods Mol Biol.* (1984); 1:1-3.
92. Halloway, P. and Arundel, P. "**High-resolution two-dimensional electrophoresis of plant proteins. Anal. Biochem**". (1988); 172: 8-15.
93. Pandey, A.; Mann, M. "**Proteomics to study genes and genomes**". *Nature.* (2000); 405, 837-846.
94. Stasyk, T.; Hellman, U.; Souchelnytskyi, S. "**Optimising simple preparation for 2-D electrophoresis**". *Life Science News* (2001); 9, 9-12.
95. Tsugita, A.; Kamo, M.; Kawakami, T.; Ohki, Y. "**Two-dimensional electrophoresis of plant proteins and standardization of gel patterns**". *Electrophoresis.* (1996); 17, 855-865.
96. Bru, R.; Sánchez-Ferrer, A.; Pérez-Gilabert, M.; López-Nicolás, J.; García-Carmona, F. "**Plant protein purification using cloud point extraction**".

(CPE)". In surfactants in solution.; Chattopadhyay, A.; Mittal, K., Eds.; Marcel Dekker, Inc.; New York (1995).

97. Sanchez-Ferrer, A.; Bru, R.; García-Carmona, F. **"Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase" using temperatura-induced phase separation in Triton X-114"**. Plant Physiol. (1989);91, 1481-1487.

X. ANEXOS

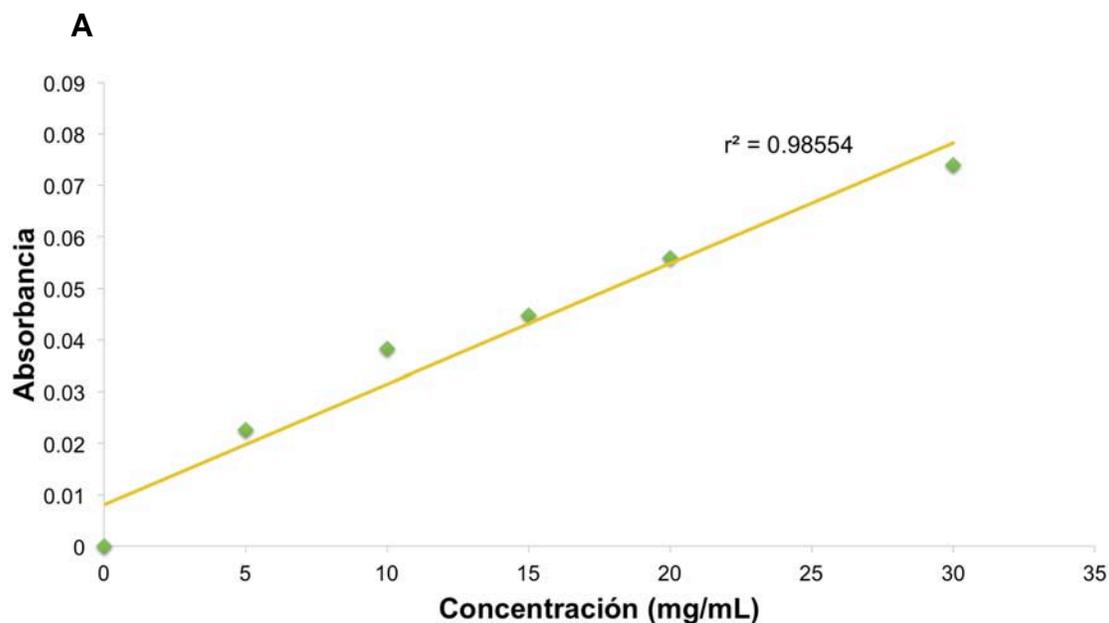
ANEXO 1

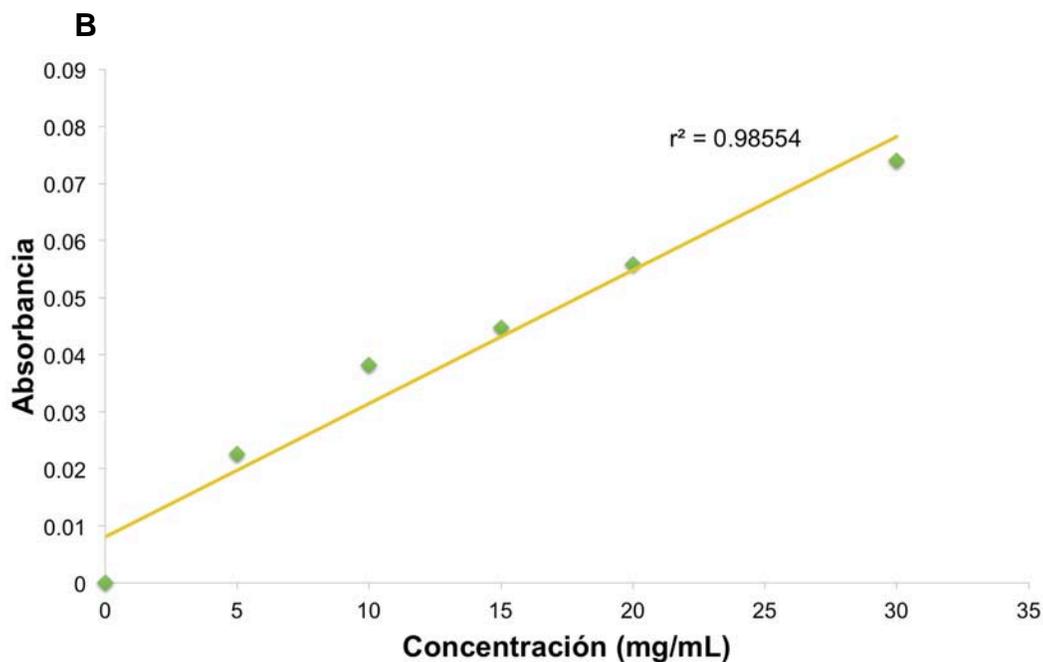
- Curva de muestras problema para el método de cuantificación Lowry-TCA utilizada en ambas frutas.

| # Tubo | Muestra Proteica | H ₂ O Milli Q |
|--------|------------------|--------------------------|
| 1 | 3 µl | 47 µl |
| 2 | 5 µl | 45 µl |
| 3 | 10 µl | 40 µl |

ANEXO 2

- **Curvas patrón obtenidas con BSA para la cuantificación proteica de plátano y pera mediante el método Lowry-TCA.** Panel A. Gráfica absorbancia vs concentración, obtenida mediante la prueba colorimétrica Lowry-TCA aplicada a las proteínas de pulpa de plátano. Mostrando además una correlación de 0.9855. Panel B. Gráfica absorbancia vs concentración de las muestras proteicas de la pulpa de pera, obtenidas obtenida mediante la prueba colorimétrica Lowry-TCA; mostrando una $r^2 = 0.9579$.





ANEXO 3

- Preparación de geles de Poliacrilamida/Glicerol

| Reactivo | Concentrador (4%) | Separador (12%) |
|--------------------------|-------------------|-----------------|
| | Cantidad | Cantidad |
| Acrilamida / BIS 30% | 330 λ | 1.995 mL |
| Amortiguador Tris pH 8.8 | 500 λ | 1.3 mL |
| H ₂ O | 784 λ | 784 λ |
| Glicerol (80%) | 316 λ | 316 λ |
| PSA 10% | 20 λ | 20 λ |
| Temed | 2 λ | 2 λ |

ANEXO 4

- Preparación del colorante azul de Coomassie coloidal

| Reactivo | Concentración | Cantidad para 1L |
|---|---------------|------------------|
| Sulfato de Amonio y Potasio | 5% p/v | 50gr |
| Etanol Absoluto | 10% | 100mL |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 (90%) | 0.02% | 0.222 g |
| Ácido Fosfórico | 5.5 % | 55mL |
| Agua Milli-Q | Cbp | Cbp 1L |

ANEXO 5

- **Residuos de Electrotransferencia de Proteínas de los extractos de Plátano en SDS-PAGE.** La figura corresponde al SDS-PAGE después de ser transferido a las membranas de PVDF.



ANEXO 6

- **Residuos de Electrotransferencia de Proteínas de los extractos de Pera en SDS-PAGE.** La figura corresponde al SDS-PAGE después de ser transferido a las membranas de PVDF.

